

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 radicicola* (5).

A aplicação prática dos conhecimentos veio lentamente. Os抗igos 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 sâo, 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 hypogaea</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 pintoi</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 cultívares 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>	
<i>by viciae</i>	<i>Pisum</i> , <i>Vicia</i> , <i>Lens</i> , <i>Lathyrus</i>
<i>by trifoli</i>	<i>Trifolium</i>
<i>by 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>Caragana</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 espécies de uma espécie e plantas de outras espécies, dependendo do grupo.

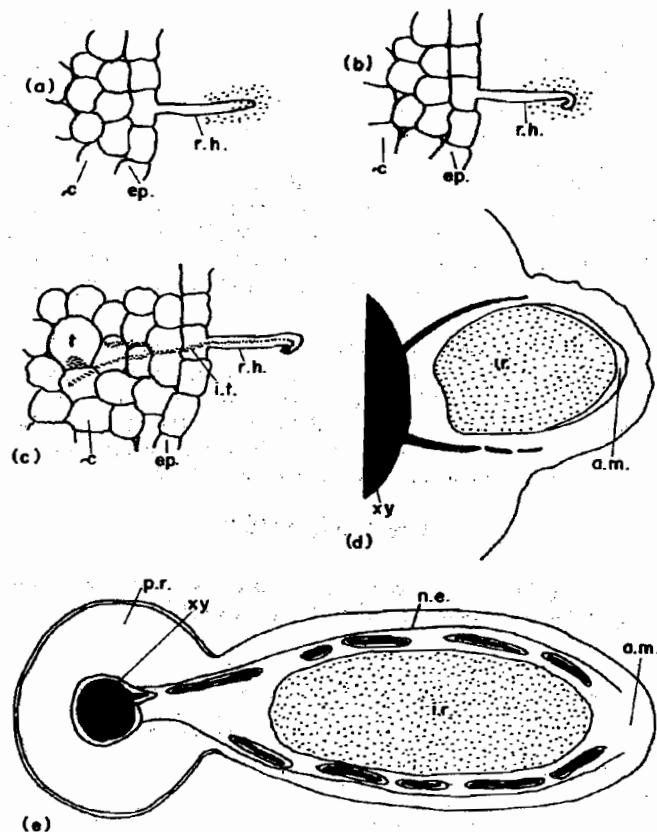


Figura 1. Formação e estrutura dos nódulos:

a) Reconhecimento e adesão das células do rizóbio a pelo radicular. b) Enrugamento do pelo radicular formando o "bastão de pastor". c) Infecção e penetração ao longo do pelo, córtex interno até penetração em célula tetrapólide é 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.t. – região infectada; i.t. – cordão infecioso; n.e. – endodermie do nódulo; p.r. – raiz primária; r.h. – pelo radicular; t – célula tetrapólide; 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 pelos radiculares, podendo ser específicos ou não. Com *R. leguminosarum* bv. *trifoli*, foi demonstrado que a proteína trifolina 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 pelo radicular e penetração;

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

e) **Formação do Cordão de Infecção** - A bactéria penetra o pelo radicular por invaginação da parede que pode ser devida à dissolução enzimática, abrindo a resistência da parede celular, ou devido à penetração entre espaços das microfibrilas celulósicas do pelo 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 pelo 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 N₂, conhecem-se também os nódulos de outras plantas, nos quais a fixação do N₂ 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 coralíde. 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 estípites 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 coralídeos. 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	Estípice 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	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.	Estípice 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.
A. Nódulos inefetivos	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-escuras.	Estípice infectiva e simbiose efetiva. Suficiente suprimento de nitrogênio à planta complementando o nitrogênio mineral do solo.
B. Nódulos efetivos		

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 N₂ e nodulação o mais possível uniforme para todas (devido, por exemplo, à falta de afinidade de uma delas pela estípice 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 N₂ 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 estípites. 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 estípites variam quanto à rapidez relativa em dominar os sítios de nodulação, quando em presença de outras estípites. Seja em ambiente estéril, seja no solo, a proporção de nódulos formados por uma das estípites 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 estípites formadoras de nódulos e não a real população daquela estípite junto às raízes.

Estípites 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 estípites inoculadas, em parcelas distintas, em 1973 na variedade de soja Bragg. Guaíba, RS*

Estípites recuperadas	1974						1975						1976						1977						1978									
	75	76	78	79	83		75	76	78	79	83		75	76	78	79	83		75	76	78	79	83		75	76	78	79	83					
Inoc. 527																																		
527	95	90	20	1	0	8	5	0	9	0	0		527	95	90	20	1	0	8	5	0	9	0	0		527	95	90	20	1	0	8		
566	0	0	17	4	8	32	2	0	16	23	10	22		566	0	0	17	4	8	32	2	0	16	23	10	22		566	0	0	17	4	8	32
586	0	0	15	3	0	14	10	7	12	3	42	2		586	0	0	15	3	0	14	10	7	12	3	42	2		586	0	0	15	3	0	14
587	5	10	35	24	40	20	82	90	55	29	20	34		587	5	10	35	24	40	20	82	90	55	29	20	34		587	5	10	35	24	40	20
S/RE**	0	0	2	57	45	24	1	1	6	33	27	22		S/RE**	0	0	2	57	45	24	1	1	6	33	27	22		S/RE**	0	0	2	57	45	24
Inoc. 586																																		
527	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	14		527	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	14		527	0	0	0	0	0	4
566	0	0	9	4	2	24	2	0	6	8	10	34		566	0	0	9	4	2	24	2	0	6	8	10	34		566	0	0	9	4	2	24
586	95	74	66	88	2	8	0	0	15	4	5	2		586	95	74	66	88	2	8	0	0	15	4	5	2		586	95	74	66	88	2	8
587	5	16	20	21	35	16	95	100	68	21	40	12		587	5	16	20	21	35	16	95	100	68	21	40	12		587	5	16	20	21	35	16
S/RE	0	6	0	62	50	40	3	0	2	48	23	30		S/RE	0	6	0	62	50	40	3	0	2	48	23	30		S/RE	0	6	0	62	50	40
Testesmunha																																		
527	5	1	0	0	0	6								527	5	1	0	0	0	6								527	5	1	0	0	0	6
566	5	0	17	6	8	14								566	5	0	17	6	8	14								566	5	0	17	6	8	14
586	5	30	22	3	12	4								586	5	30	22	3	12	4								586	5	30	22	3	12	4
587	32	50	47	13	52	28								587	32	50	47	13	52	28								587	32	50	47	13	52	28
S/RE	5	5	2	62	34	40								S/RE	5	5	2	62	34	40								S/RE	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 estípita 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 estípites 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 estípites. 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 estípites de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifoli* em três espécies de *Trifolium*, em areia e solução nutritiva. Secr. Agr. RGS

Espécies	Estípites				
	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 estípites 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 prevalecentes no local de emprego e competitivas frente à população nativa. Vários aspectos agronômicos 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, consequentemente, 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 agronômico 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 agronômicas, 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 senescênciam 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 N₂ pela associação rizóbio/leguminosas varia com a bactéria, a planta e as condições ambientais. 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>Melilotus</i> sp	125
Trevo, <i>Trifolium</i> sp	100-150
Caupi, <i>Vigna unguiculata</i>	85
Fava, <i>Vicia faba</i>	240-325
Lentilha, <i>Lens</i> sp	100
Lupinus, <i>Lupinus</i> sp	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</i> sp., <i>Lespedez</i> sp	100-140

Dentre os fatores do solo que condicionam a resposta da simbiose, resultando na nodulação e na fixação do N₂ (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 N₂ 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-

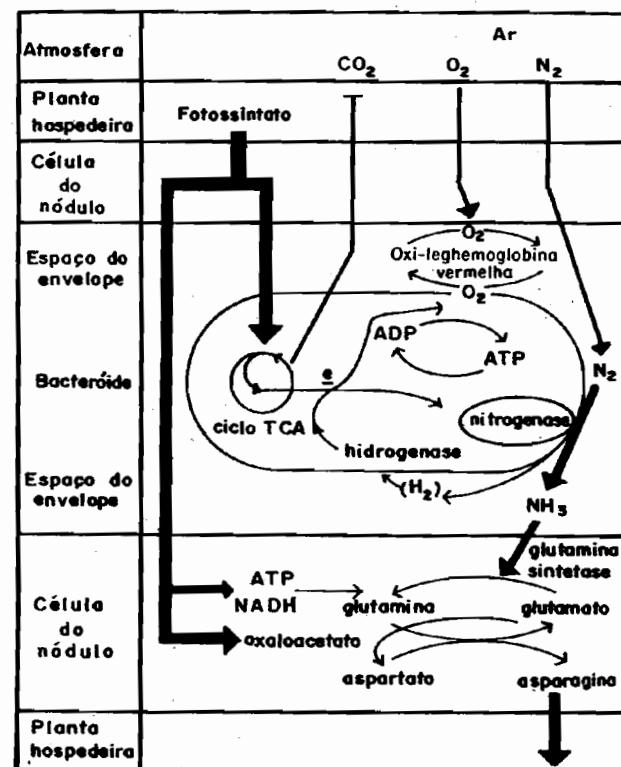


Figura 2. Principais caminhos metabólicos associados com a fixação do N₂ nos nódulos das leguminosas, especialmente referentes aos conhecimentos existentes para soja e tremoço. Segundo Bergersen.

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 macia 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	N nas sementes	N fixado	%
kg/ha					
Nodulifera	0	2.706	178	71	40
Não-nodulifera	0	1.848	106		
Nodulifera	56	2.686	178	57	32
Não-nodulifera	56	2.125	120		
Nodulifera	112	2.772	183	44	24
Não-nodulifera	112	2.343	138		
Nodulifera	168	2.765	185	24	13
Não-nodulifera	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 consociação 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 estípites e em obtenção de conhecimentos em fatores limitantes, por exemplo, se as estípites 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 estípites 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 Estípites de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros Microrganismos Fixadores de Nitrogênio (RELARE) indica as estípites a serem usadas, que são armazenadas no Laboratório do Centro de Fixação Biológica do Nitrogênio, do Instituto Agronômico 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

1. ALEXANDER, M. Ecology of *Rhizobium*. In: Alexander M. ed. Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. Plenum Press, New York, 1984. p. 39-50.
2. ALLEN, O.N. & ALLEN, E.K. The leguminosae. Univ. of Wisconsin Press, 1981. 812p.
3. BARNI, N.A.; KOLLING, J. & MINOR, H.C. Efeito de níveis de nitrogênio sobre o rendimento de grãos, nodulação e características agronômicas de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). Agron. Sulriograndense, Porto Alegre, 13:93-104, 1977.
4. 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. BERRINGER, 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 Nz. 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. Sobrevida e competição por sitios de nodulação de estípites 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 Pres, 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 estípulas de *Rhizobium* 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 Agronômico. 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 estípulas 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 Nifal Project and MIRCEN, 1985. 367p.
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 Wurzelanschwellungen. Mem Acad. Imp. Sci., St. Petersburgh, Ser. 7,10: no. 6, 1-13, 1886.

10

BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

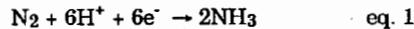
Maria Cristina P. Neves⁽¹⁾ & Norma G. Rumjaneck⁽¹⁾

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:

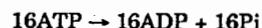


Esta reação ocorre com consumo de energia na forma de ATP, podendo ser assim equacionada:



⁽¹⁾ EMBRAPA/CNPB, 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 N₂ para obtenção de energia

Substrato	Função química	Substância
Álcool		Etilanol
Obxigenuado		Glicerol
Aldeído		Acetaldeído
Ácidos orgânicos		Malonato
		Succinato
		Piruvato
Açúcar		L-arabinose
		D-ribose
		Frutose
		Glicose
		Chiro-inositol
		Mio-inositol
		Sacarose
		Trelozose

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 nitroso, acetileno, azida, cianeto, metil isocianeto e também prótons como já foi mencionado anteriormente.

O próton e o óxido nitroso 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; mas 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 oxi-redução e reação de transferência de energia.

As reações de oxi-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, finalmente, para o nitrogênio. Nesta trajetória ocorreu uma série de reações de oxi-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 de *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 simbóticos, o controle genético é bem mais complexo. Já foram descritos pelo menos 50 genes que participam do processo simbótico. 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.

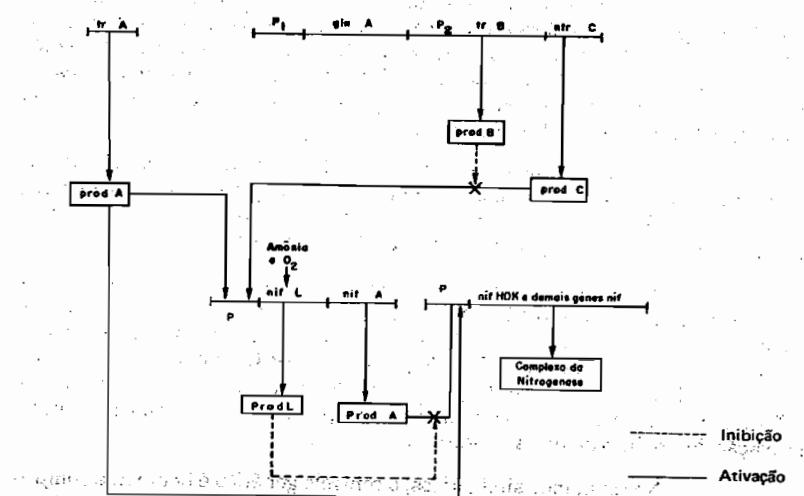


Figura 1. Controle genético da nitrogenase em *Klebsiella pneumoniae* (modificado de Merrick e Dixon, 1973).

Bactérias diazotróficas anaeróbias 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 aeróbios 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 aeróbias. 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 exopolissacáideos: a produção de exopolissacáideos (muco) tem sido apontada como uma forma de proteção ao oxigênio. Densa camada de muco se forma envolvendo as colônias de *Beijerinckia*, *Azotobacter* e *Dexia 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 exopolissacáideos necessita ser investigado.

Proteção Conformatacional 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 microaeróficas 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 microaeróficas 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 rizobio 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 bacterióides do rizobio são envolvidos por membranas de origem vegetal formando os envelopes 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 bacterídeo, 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 disperdiados 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 anaeróbios 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 diminuição).

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 quimiorgânicos 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 representam 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 excessões 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.

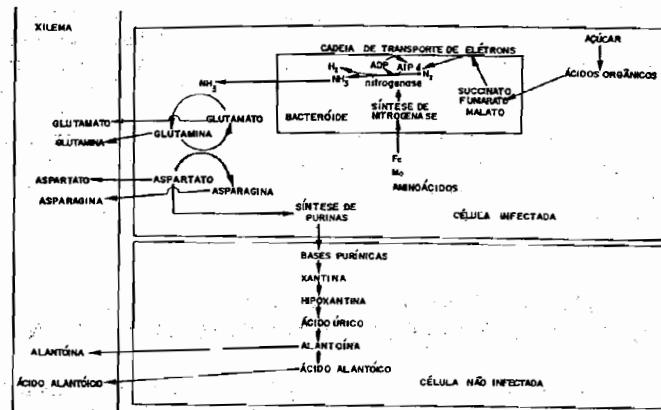


Figura 2. Vias metabólicas dos principais compostos nitrogenados produzidos pelos nódulos e exportados pelo xilema para nutrição da parte aérea da planta.

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 ureídos (alanina e ácido alantóico), que são os principais compostos exportados pelos nódulos, sendo que os ureídos predominam nas espécies pertencentes à tribo Phaseoleae (soja, feijão, feijão de corda, etc.) (10;20) e as amidas predominam nas espécies de clássico temperado, especialmente as pertencentes à tribo Vicieae e Trifolieae (ervilha, fava, lentilha, trevo, etc.) (28). A síntese de ureídos 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 alantofina 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 ureído, 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 ^{15}N fixation using ^{15}N . *Pl. Soil*, Hague, 88:333-343, 1985.
7. EADY, R.R.; KAHN, D. & BUCHANAN-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., BOTTMOLLEY, 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.197-218.
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 Arnald 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 N₂-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 Delhi, 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			
		Nodulíferas		Não 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 rafzes 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.

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS.

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

Subfamília	Gêneros	Número de espécies
Caesalpinoideae	<i>Dimorphandra</i> <i>Sclerolobium</i> <i>Tachigalia</i>	1 2 1
Mimosoideae	<i>Acacia</i> <i>Albizia</i> <i>Anadenanthera</i> <i>Ajfonsea</i> <i>Calliandra</i> <i>Enterolobium</i> <i>Inga</i> <i>Mimosa</i> <i>Newtonia</i> <i>Pipadenia</i> <i>Pithecellobium</i>	1 1 1 1 1 1 6 4 1 1 3
Papilionoideae	<i>Andira</i> <i>Centrolobium</i> <i>Ciclolobium</i> <i>Dalbergia</i> <i>Derris</i> <i>Erythrina</i> <i>Lonchocarpus</i> <i>Machaerium</i> <i>Ormocarpum</i> <i>Swartzia</i>	4 1 1 4 1 1 4 6 1 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 *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 xerófítica 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 elongamento dos nódulos. Os nódulos tornam-se coraloides, de forma similar aos de *Alnus-Frankia*, porém com forma mais irregular, nem sempre de ramificação dicotómica 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>Gliciridía sepium</i>	...	12,9
<i>Inga jinicuil</i>	Sombra para café	35,0
<i>Leucaena leucocephala</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).

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS

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 estípites da bactéria, reflexo da variabilidade genética, resulta na especificidade da 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. Dentro do 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	
Bacteroides 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

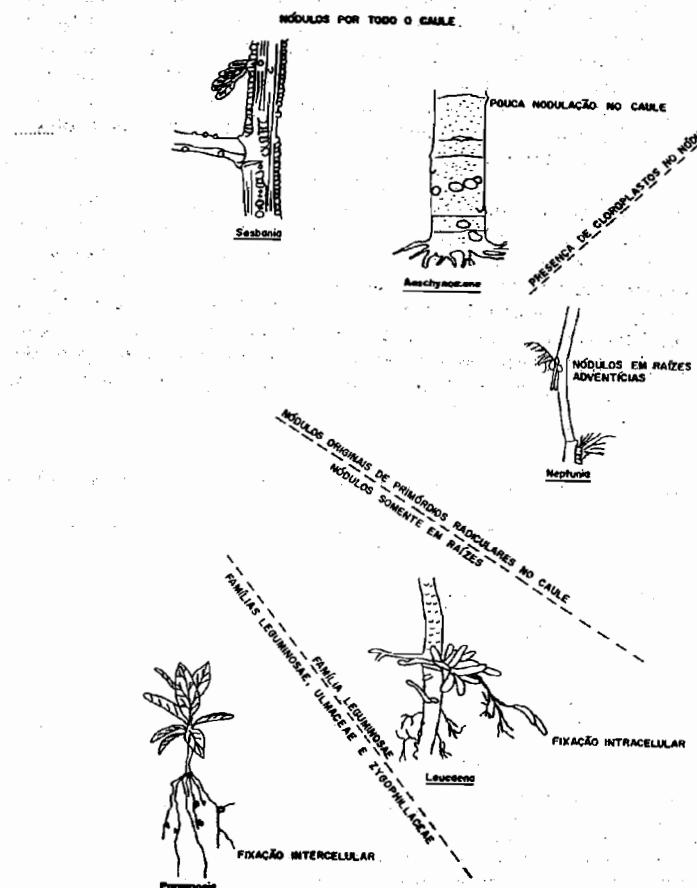


Figura 1. Adaptação de simbiose planta hospedeira - *Rhizobium*. Fonte: Faria et al. (23) e reimpressão da figura 1A, C e D - Dreyfuss et al. (17) com permissão da American Society for Microbiology.

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).

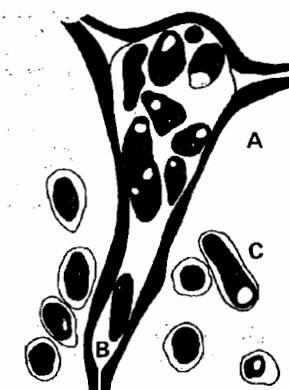


Figura 2. Distribuição da bactéria *Rhizobium* dentro do nódulo em leguminosas. Células de raiz (A) recebem a célula bacteriana liberada pelo cordão de infecção (B). A célula de *Rhizobium* é encapsulada individualmente (C) tornando-se em bacteróide. Fonte: Dreyfuss et al. (18).

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).

Família	Gênero
Betulaceae	<i>Alnus</i> Mill.
Casuarinaceae	<i>Casuarina</i> Adans.
Coriariaceae	<i>Coraria</i> Hook.
Datisaceae	<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> Suess. & Overkott <i>Talguenea</i> Miers <i>Trevou</i> Miers ex Hook. <i>Dryas</i> L.
Rosaceae	<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).

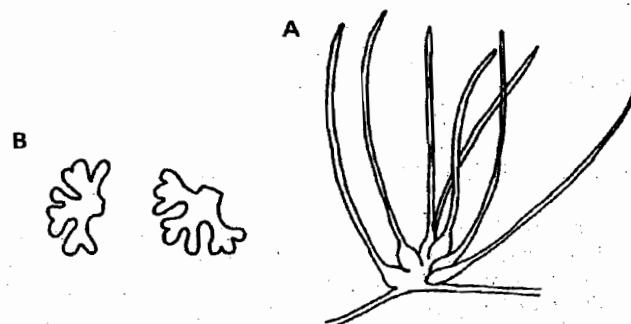


Figura 3. Tipo de nódulos em raízes de plantas não-leguminosas: (A) tipo *Alnus* e (B) tipo *Casuarina*/*Myrica*. Fonte: Becking (5).

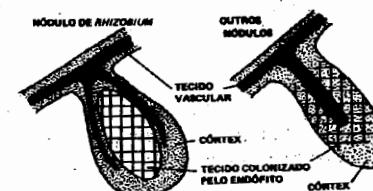


Figura 4. Corte longitudinal de nódulos de *Rhizobium* e de *Frankia* mostrando a distribuição interna dos tecidos colonizados. Fonte: Mosse (33).

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 pelos radiculares e epiderme (raro)	via pelo radicular
Sítio de início do nódulo	côrtex da raiz	um nódulo primário a partir do côrtex e nódulo fixador a partir do pericílio
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 rafzes de árvores auxilia no processo de fixação biológica do nitrogênio. Rose & Youngberg (37), estudando os efeitos da

FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM ESPÉCIES ARBÓREAS

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).

endomicorras 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 consorciamento 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 consorciamento (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 actinorrízicas. 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 arbusativas 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 substomática 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 lámina 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 simbiontes, 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 plástideos degenerados, armazenadores de lipídios (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 unâimes 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. GLAM 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, Macmillian 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. & SIMÓES, J.W. Crescimento das árvores e deposição de folhado 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. 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 estípites 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. & DONELLY, 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 colleters 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 estípites 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.; DREYFUS, 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-nodulated 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.

12

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 simbiose 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 utilizáveis pelas plantas.

A identificação de uma associação entre plantas e bactérias fixadoras de N₂ depende da demonstração de interações bactéria-planta 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/CNPB, 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. paspalii*, 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 ecótipos 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 movemativamente, atraídas por um mecanismo de quimiotaxia 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 brasiliense*, *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 seropediae* (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. brasiliense* 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)]

	Azoto-bacter paspalii	Beijerinckia indica, B. flumi-nensis	Azospirillum brasilense, A. lipoferum	A. amazone-nese	A. halo-praeferans	Herbas-pirillum serope-dicæ	Aceto-bacter diazotropi-cus	Bacillus azoto-fixans
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 rizof.	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 abixo de *Digitaria*, multiplicada e veiculada em turfa.

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

FIXAÇÃO DE NITROGÉNIO EM ASSOCIAÇÃO COM GRAMÍNEAS.

177

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* nitrito redutase negativas que não tiveram o mesmo efeito, confirmando, dessa forma, o papel da nitrito 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 no 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

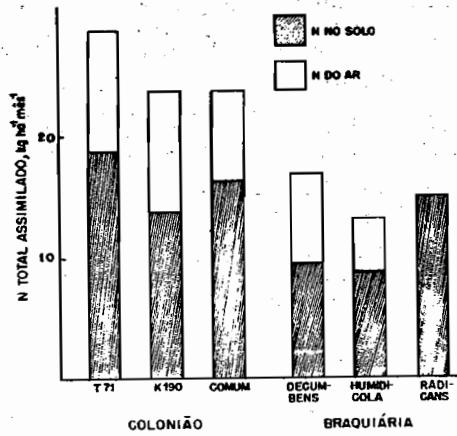


Figura 1. Fixação de N em variedades de capim-colonião e espécies de braquiária (7 e 20). N total na planta proveniente do solo e do ar através da fixação biológica de N₂ por bactérias naturalmente existentes no solo. Valores médios dos meses janeiro a abril.

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 agronômicas.

LITERATURA CITADA

1. APP, A.; SANTIAGO, T.; MENGUITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I.; DE DATTA, 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.
2. BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L. & DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov. a root-associated nitrogen-fixing bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 36:86-93, 1986.
3. BALDANI, V.L.D.; ALVAREZ, M.A.B.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, 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.
4. BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; MANDEL, J.; ROCHA, & DÖBEREINER, J. Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum brasiliense* inoculants in peat and oil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NITROGEN FIXATION WITH NON-LEGUMES, 4., Rio de Janeiro, EMBRAPA, 1987. (poster)
5. 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.
6. BODDEY, R.M.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. *Pl. Soil*, Hague, 95:109-121, 1986.
7. 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.
8. BULOW, J.F.W. von & DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Washington, 72(6):2389-2393, 1975.
9. CAVALCANTE, V.A. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Pl. Soil*, Hague, 108:23-31, 1988
10. DÖBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *R. bras. Biol.*, Rio de Janeiro, 19:251-258, 1959.
11. DÖBEREINER, J. Nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Pl. Soil*, Hague, 15:211-216, 1961.
12. DÖBEREINER, J. *Azotobacter paspali* sp.n., uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. Agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 1:357-365, 1966.
13. DÖBEREINER, 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.
14. DÖBEREINER, 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.
15. DÖBEREINER, J.; MARRIEL, I.E. & NERY, M. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 22:1464-1473, 1976.
16. GILLES, M.; KERSTERS, K.; HOSTE, E.; JANSSENS D.D.; KROPPENSJEDT, R.N.; STEPHAN, M.P.; TEIXEIRA, K.R.S.; DÖBEREINER, 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.
17. LIMA, E.; BODDEY, R.M. & DÖBEREINER, J. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using on ¹⁵N aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 19:165-170, 1987.
18. MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Bras. Ciênc.*, Rio de Janeiro, 55:417-430, 1983.
19. 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.
20. OKON, Y. *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.*, Amsterdam, 3:223-228, 1985.
21. 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.
22. 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.
23. TARRAND, J.J.; KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum brasiliense* 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 (CNPAF), 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)
Quimiororganotróficos		
Estritamente anaeróbios	<i>Clostridium</i>	<i>C. pasteurianum</i>
	<i>Desulfobivrio</i>	<i>D. vulgaris</i>
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>D. ruminis</i>
Anaerób. facultativos (quando em aerobiose não fixam N)	<i>Klebsiella</i>	<i>K. oxydoca</i>
	<i>Bacillus</i>	<i>B. polymyxa; B. macerans; B. azotofixans</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. winia herbicola</i>
	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>E. intermedia</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermanii</i>
Microaerófilos		
	<i>Xanthobacter</i>	<i>X. flavum; X. autotrophicum</i>
	<i>Azospirillum</i>	<i>A. brasiliensis; A. amazonensis</i>
	<i>Aguaspirillum</i>	<i>A. lipoferum</i>
	<i>Azotobacter</i>	<i>A. peregrinum</i>
	<i>Azotococcus</i>	<i>A. chroococcum</i>
	<i>Azomonas</i>	<i>A. vinelandii</i>
	<i>Beijerinckia</i>	<i>A. agilis</i>
	<i>Derxia</i>	<i>A. macrocytogenes</i>
	<i>Herbaspirillum</i>	<i>B. indica; B. fluminensis</i>
	<i>Acetobacter</i>	<i>D. gummosa</i>
Fototróficos		
Anaeróbios	<i>Chromatium</i>	<i>H. seropediae</i>
	<i>Chlorobium</i>	<i>A. diazotrophus</i>
	<i>Ectothiopira</i>	<i>C. vinosum</i>
Anaerób. facultativo	<i>Rhodospirillum</i>	<i>C. limicola</i>
	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>E. shapovnikovii</i>
	<i>Rhodospirillum</i>	<i>R. rubrum</i>
	<i>Rhodopseudomonas</i>	<i>R. palustris</i>
Microaerófilos		
	<i>Plectonema</i>	<i>P. boryanum</i>
	<i>Lyngbia</i>	<i>L. aestuariae</i>
	<i>Oscillatoria</i>	
Aeróbios		
	<i>Anabaena, Nostoc</i>	

Outros fixadores anaeróbios são redutores de sulfato, *Desulfobivrio* 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 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 microaerófilas 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 microaerófilas 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 elemental e tiossulfatos, transformando-os em sulfatos. Podem ser verdes, vermelhos, ou purpúreos. Outros anaeróbios facultativos, *Rhodospirillum rubrum* e *Rodopseudomonas palustris* não liberam oxigênio em seu processo fotossintético. Estas bactérias podem crescer heterotróficamente e sob presença de oxigênio no escuro, fixando N microaerófilicamente.

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 peritrfíquo	-	aeróbio.	Cresce melhor em meio deficiente de N
<i>Bacillus</i>	Bastonetes	+	+ ou - flagelo peritrfíquo	+	anaeróbio facultativo	Metabolismo fermentativo. Geralmente proteolítico
<i>Clostridium</i>	Bastonetes	+	+ flagelo peritrfíquo	+	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 *Beijerinckia*.

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 significante (28,73).

Outro sistema que contribui sobremaneira em regiões alagadas é 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 assímbioticas 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 assímbioticos, 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 agronômico, 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.

CIANOBACTÉRIAS

INTRODUÇÃO

Cianobactérias, cianoficeas 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 *Berger's Manual of Determinative Bacteriology*, em 1974, está contida, pela primeira vez a Divisão Cianobactéria dentro do Reino Prokariota. A utilização dos termos "algas verde-azuladas" ou "cianofítas" 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 consequentemente 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 pecticos 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 ósmotico 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 tilacoides 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 périfericamente 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 desoxirribonucleico (DNA) pode ocorrer acumulado em uma única região ou em pequenos bastonetes. O ácido ribonucleico (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

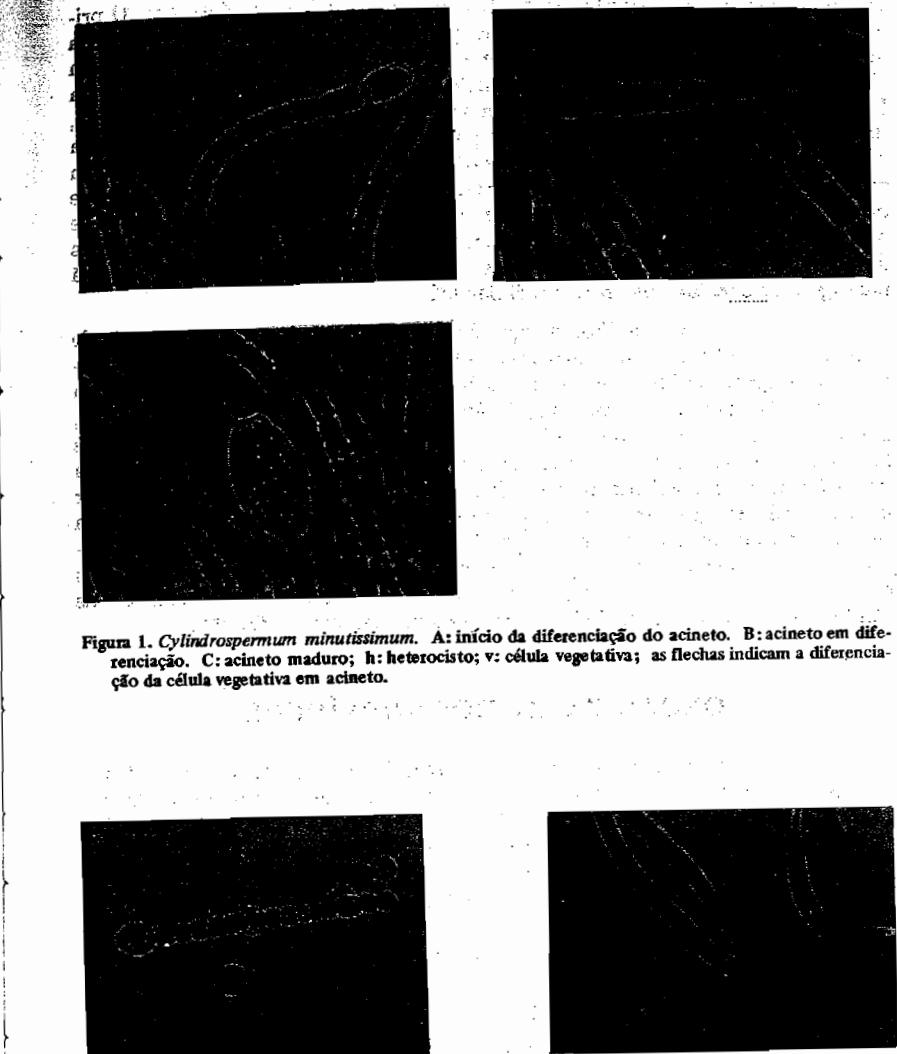


Figura 1. *Cylindrospermum minutissimum*. A: início da diferenciação do acineto. B: acineto em diferenciação. C: acineto maduro; h: heterocisto; v: célula vegetativa; as flechas indicam a diferenciação da célula vegetativa em acineto.



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, Scytonemataceae 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. *Merismopedia*); três planos de divisão celular regulares formar-se-ão colônias cúbicas (por ex. *Eucapsis*). A ocorrência de planos irregulares, ao acaso, leva à formação de colônicas 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. *Anabaena*,

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. *Tolyphothrix*; 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 CIANOBICTÉRIAS 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 0,416 µg N₂/h.cm², ou equivalente a 0,05 g N₂/dia.m², 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 Kulsooriya (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:

- 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, NO, 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 ppm ⁽¹⁾	Matéria Seca g		
		7,6a ⁽²⁾	11,3b
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 Gorkom (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 heterocistadassão 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 N₂ 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.

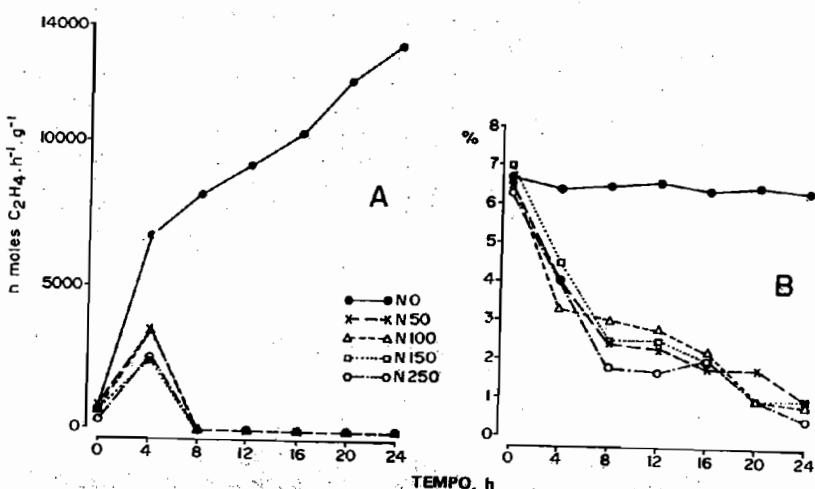


Figura 5. A: atividade da nitrogenase (nmoles C₂H₄/h.g) e B: frequência de heterocistos (%) em *Anabaena variabilis* durante o período de 24 horas de medida, em crescimento em meio de cultura com diferentes concentrações de nitrogênio. NO sem nitrogênio; N50, N100, N150 e N250 com 50, 100, 150 e 250 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 consequentemente, 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, 84: 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 nitrrogenasique des microorganismes fixateurs libres d'azote de la rhizosphère 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 (*Encyclopedia 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: 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. Ultrastr. 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. *Doil 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. *Pochvovedeni* (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 Doutoramento).
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 symbiotic 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 symbiotic nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 13:829-836, 1967.
50. RINAUDO, G.; HAMAD-FARES, I.; DOMMERGUES, Y.R. Nitrogen fixation in the rice rhizosphere. Methods of measurement and practices suggested to enhance the process. In: A.YANABA & 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 rhizosphere 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 N_2 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.

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-CNPS, 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.

16

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 ambientais 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/CNPB, 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 N₂ 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 ureídios (alantoina, ácido alantônico 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 N₂. 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° C, tendo grande importância ecológica como desbravadoras de regiões inhóspitas.

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 e 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 rúmen e intestino de ruminantes.	quimiorganotrófico anaeróbio.
<i>Klebsiella, Enterobacter</i>	isolados da flora intestinal, porém encontrados em vários habitats, superfície de folhas, fezes, rúmen, 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. Battatais.	quimiorganotrófico de vida livre, aeróbio.
<i>Azospirillum e 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 e Bradyrhizobium</i>	nódulos radiculares em leguminosas.	quimiorganotrófico aeróbio, quando em vida livre usa nitrogênio combinado ou fixa nitrogênio em simbiose com leguminosas; algumas espécies 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° 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° C ou mais. Enquanto a algaroba tem um ótimo de temperatura para a fixação de nitrogênio em torno de 35° C, o feijoeiro não fixa nitrogênio acima de 34-35° C, exceto com algumas estírpes 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° C podem causar a perda de plasmídios (que podem inclusive conter os genes *Nif*), e as acima de 46° 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).

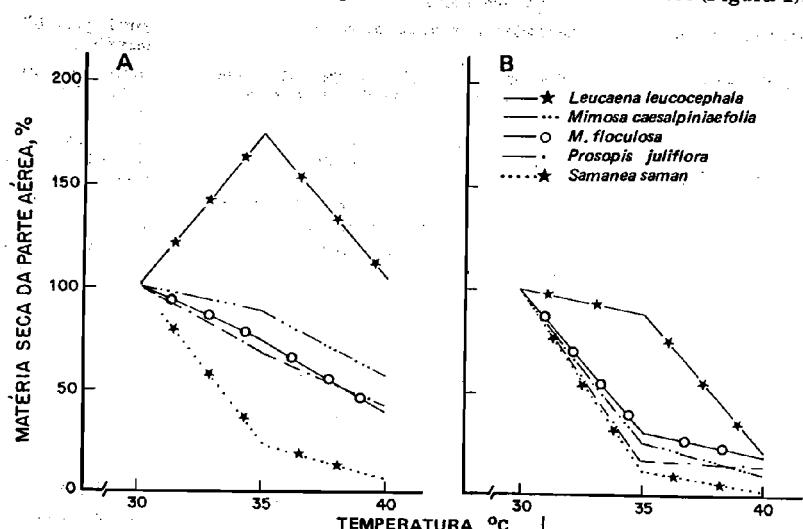


Figura 1. Efeito de altas temperaturas do substrato na produção de matéria seca, em relação à testemunha mantida a 28°C, de plantas adubadas com (A) N mineral ou (B) crescendo com N simbiótico.

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 lenticelas 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 antagonistas. 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 *Bdellouibrio*) 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 estreptomicina), 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 estreptomicetos 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 estreptomicina ou mais, e maior resistência natural a antibióticos foi também observada, quando se comparavam estirpes nativas de rizóbio isolados de *Stylosanthes* crescendo em áreas cultivadas, 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 N₂. É importante salientar que só há fixação de N₂ 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 N₂. 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 N₂. 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, consequentemente, podem aumentar a massa de nódulos produzidos. O excesso de nitrato diminui a intensidade na deformação dos pêlos 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 N₂ 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 Al³⁺ 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 Al³⁺, em condições de baixa disponibilidade de Ca²⁺, 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

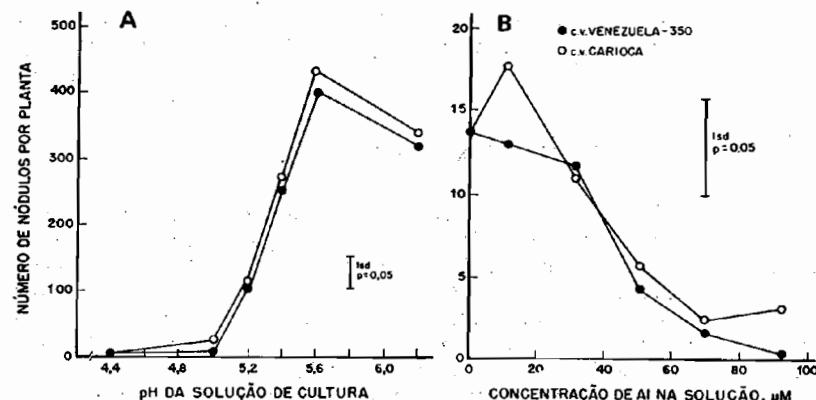


Figura 2. Efeito do (A) pH e (B) Al^{3+} na nodulação do feijoeiro em solução (dados de Franco & Munns, 6.)

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 estípites de rizobio 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 coloides 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 microrga-

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 simbótico 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 simbiontes e pelo regime de temperatura.

Na etapa seguinte, a bactéria sofre modificações morfológicas e fisiológicas, transformando-se em bacterióide. 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. brás. 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.

17

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.