

VARIAÇÃO ESTACIONAL DA DENITRIFICAÇÃO EM GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS TROPICAIS¹

SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO e JOHANNA DÖBEREINER²

RESUMO - Foi feito um experimento de campo com a finalidade de estudar a variação estacional da denitrificação associada a raízes de gramíneas forrageiras tropicais adubadas com nitrato. As gramíneas usadas foram *Hyparrhenia rufa*, *Digitaria decumbens* (cvs. Pangola A-21 e Transvala) e *Pennisetum purpureum* (cvs. Napier e Cameron). A denitrificação potencial foi determinada através do método de acúmulo de N₂O, numa atmosfera contendo C₂H₂, dezessete horas após a aplicação de 20 ml de uma solução de 20 mM N-NO₃. O efeito do genótipo e da adubação nitrogenada na capacidade de denitrificar foi observado até quatro semanas após o corte das gramíneas e aplicação de N. A denitrificação variou com o genótipo e com a estação do ano. A de *Pennisetum* foi maior no início da estação chuvosa, e a de *Digitaria* foi máxima no período mais seco do ano, quando todo o NO₃ aplicado para teste se perdeu como N₂O, dentro de 17 horas.

Termos para indexação: raízes, adubação nitrogenada, *Hyparrhenia rufa*, *Digitaria decumbens*, *Pennisetum purpureum*.

SEASONAL VARIATION OF DENITRIFICATION IN TROPICAL FORAGE GRASSES

ABSTRACT - A field experiment was carried out to study the seasonal pattern of nitrate dissimilation on roots of tropical forage grasses under frequent nitrate applications. The grasses used were: *Hyparrhenia rufa*, *Digitaria decumbens* (cvs. Pangola A-21 and Transvala) and *Pennisetum purpureum* (cvs. Napier and Cameron). Denitrification was determined by the accumulation of N₂O in an atmosphere containing C₂H₂. 17 h after the application of 20 ml of a 20 mM N-NO₃ solution. Genotype and N fertilization effects on denitrification were observed up to 4 weeks after each cutting of the grasses and N addition. Denitrification varied with the plant genotypes and the season. The *Pennisetum* spp. denitrified more at the beginning of the rainy season while denitrification associated with the *Digitaria* spp. was highest during the dry season, when all NO₃ applied for the test was lost as N₂O within 17 hours.

Index terms: roots, fertilisation, *Hyparrhenia rufa*, *Digitaria decumbens*, *Pennisetum purpureum*.

INTRODUÇÃO

Como consequência da adubação nitrogenada há sempre perdas devidas à denitrificação, que é a redução desassimilatória do nitrato em que N retorna à atmosfera como N₂O e N₂ (Payne 1973, García 1975, Firestone et al. 1979). Esta denitrificação é feita por uma grande variedade de microrganismos. Recentemente, foi demonstrado por Neyra & Berkum (1977) e Neyra et al. (1977) que algumas bactérias fixadoras de N₂, encontradas em raízes, também denitrificam. *Azospirillum* spp. pertencem a este grupo e representam o primeiro grupo de bactérias encontrado que, simultaneamente, fixa N₂ e desassimila o ni-

trato para gás (Day & Döbereiner 1976, Neyra & Döbereiner 1977).

Devido à importância dos fatos citados na perda de N para gramíneas forrageiras tropicais, objetivou-se, com este experimento, estudar a variação de denitrificação em algumas dessas gramíneas mais importantes.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi feito em campo, num solo Podzólico Vermelho-Amarelo (Ultissolo) série Itaguaí, localizado próximo ao Setor de Solos da EMBRAPA, RJ. A análise química do solo revelou a seguinte composição (camada superficial de 20 cm): N, 0,09%; P, 2 ppm; K, 72 ppm; Ca + Mg, 2,7 meq/100 cm³; Al⁺⁺⁺, 0,1 meq/100 cm³; pH 5,7. Determinou-se a curva de neutralização do solo e fez-se calagem com 2,0 t de calcário dolomítico (CaO, 29,22%; MgO, 13,37%) por hectare, para elevar o pH de 5,7 para 6,7.

Fez-se uma adubação básica em toda a área experimental, compreendendo, por hectare: 100 kg P₂O₅ (metade na forma solúvel e metade na forma de fosfato de rocha);

¹ Aceito para publicação em 17 de novembro de 1983. Parte da tese apresentada pelo primeiro autor à Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Doutoramento em Agronomia.

² Eng^o - Agr^o, Dr. - Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo - EMBRAPA, km 47 - CEP 23460 - Seropédica - RJ.

50 kg K₂O e 40 kg de micronutrientes (FTE Br-12). O calcário e a adubação básica foram misturados uniformemente ao solo, através de gradagens com grade de discos, em agosto e setembro de 1979, respectivamente.

Foram usadas as seguintes gramíneas: jaraguá (*Hyparrhenia rufa* cv. Deodoro), pangola (*Digitaria decumbens*), transvala (*Digitaria decumbens* cv. Transvala UF 547), napier (*Pennisetum purpureum* cv. Napier) e cameron (*Pennisetum purpureum* cv. Cameron).

As cultivares introduzidas, Transvala e Cameron, têm demonstrado, em experimento de campo, ganhos marcantes de proteína/ha durante o período seco, quando comparados com suas respectivas testemunhas (pangola e napier), normalmente exploradas em pastagens brasileiras (Souto 1978). O jaraguá entrou como controle, pois domina toda a área onde foi realizado este experimento.

O esquema experimental foi de blocos ao acaso com quatro repetições, cinco cultivares e três níveis de N, obtendo-se, assim, quinze tratamentos. A área bruta de cada parcela mediu 20 m² (4 m x 5 m).

As mudas com raízes, no caso do jaraguá, pangola e transvala, e as estacas com três gemas, no caso do 'Napier' e 'Cameron', foram plantadas em outubro de 1979, de maneira que o stand final por parcela contivesse o mesmo número de plantas.

A adubação com nitrogênio foi feita em cobertura com Ca (NO₃)₂ (27% N). Os três níveis de N foram: 0, 25 e 50 kg N/ha, e sua aplicação foi efetuada imediatamente após cortes das forrageiras nos dias 15.10.80, 15.01.81, 15.04.81 e 15.07.81.

As avaliações da desnitrificação foram feitas em intervalos de quinze dias, a partir de 30.10.80 até 15.10.81.

Determinou-se a desnitrificação através do método de acúmulo de N₂O pela inibição da atividade da N₂O-reductase pelo C₂H₂, como usado por Federova et al. (1973), Balderston et al. (1976) e Yoshinari & Knowles (1976).

Após o último tempo de incubação (8 h) usado para determinar a atividade de nitrogenase em raízes extraídas (Souto 1982), injetaram-se, através do 'suba-seal', 20 ml de uma sol. 20 mM de KNO₃ em cada frasco (3 l). Os frascos foram agitados de modo que toda a solução entrasse em contato com as raízes. Logo após, os frascos foram deixados incubar em sala com temperatura controlada a 32°C, durante 17 horas.

A produção de N₂O foi avaliada injetando-se 0,5 ml da mistura de gases num cromatógrafo de gás, modelo Varian, com detetor de condutividade térmica. A coluna usada foi de 3 m de comprimento e 0,32 cm de diâmetro externo, preenchida com Poropak Q (80 - 100 mesh) e operada isotermicamente a 70°C, com um carregador de gás (He), num fluxo de 35 ml/minuto.

Um padrão de 1% N₂O (v/v) foi usado junto a todas as medições de N₂O nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em virtude de a medida do acúmulo de N₂O ter

sido feita nos mesmos frascos após a avaliação da atividade da nitrogenase, algumas indagações poderiam ser feitas sobre a validade do método: 1) a desnitrificação com o tempo de incubação de 25 horas (8 para redução de C₂H₂ e 17 de acúmulo de N₂O) poderia ser influenciada pela multiplicação de bactérias desnitrificadoras; 2) o longo tempo de exposição dessas bactérias ao C₂H₂ ou C₂H₄ poderia, ao contrário, provocar um decréscimo nas taxas de desnitrificação. Os resultados altos do presente experimento e as taxas geralmente lineares obtidas nos ensaios preliminares (dados não apresentados) sugerem, entretanto, que o método é válido, como estimativa do potencial e, certamente, para fins comparativos.

Efeito da época de coleta e adubação nitrogenada

Os resultados relativos aos efeitos da época e da adubação são vistos na Fig. 1. As diferenças entre os coeficientes de regressão lineares pelo teste t, ao nível p = 0,05, mostram que o efeito de N, na primeira coleta (duas semanas após a aplicação do adubo nitrogenado), nos três primeiros períodos, foi maior que nos demais, e que, no quarto período, nas duas primeiras coletas, o efeito do N foi maior que nas demais coletas. Estes efeitos no acúmulo de N₂O somente nas coletas iniciais, após o corte das forrageiras e adubação nitrogenada, parecem realmente ocorrer "in situ" já que, mesmo com nitrato (400 μmoles N-NO₃/frasco⁻¹) usado no meio de incubação nas outras coletas, não se observou acúmulo significativo de N₂O.

Provavelmente, a disponibilidade de nitrato proveniente da adubação estimulou a multiplicação de bactérias desnitrificadoras "in situ". Além disto, pode haver a limitação por algum outro fator, talvez, carbono, pois a disponibilidade de C nas raízes depende, entre outros fatores, principalmente da idade da planta. O teor de C disponível na raiz de *Panicum maximum* decresce com a idade da planta a partir dos quatorze dias de rebrota (Gomide et al. 1979). Ryden et al. (1979) e Ryden & Lund (Prelo) têm mostrado, em seus estudos de campo, em que foi aplicado adubo nitrogenado, que o carbono disponível passou a ser o fator limitante mais importante nas perdas de nitrogênio por desnitrificação. O efeito da adubação nitrogenada no campo, na desnitrificação "in vitro",

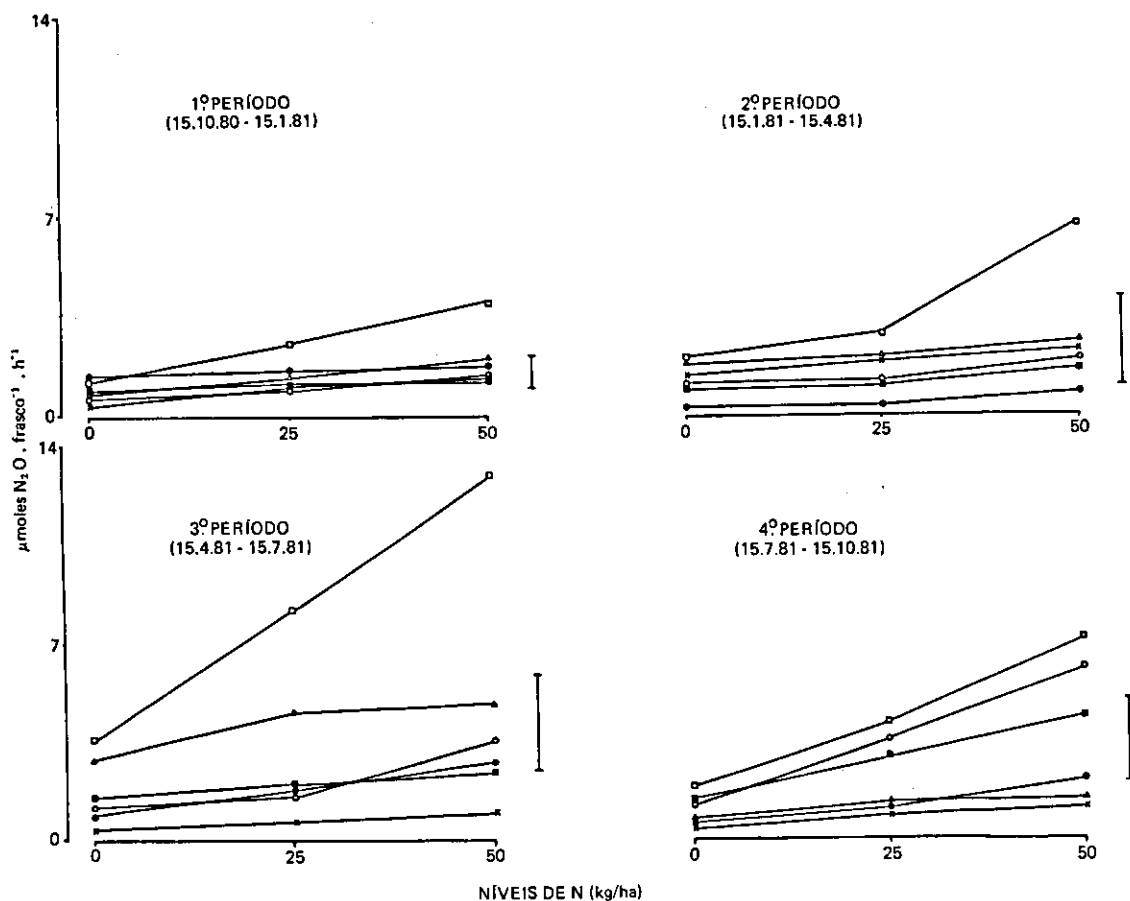


FIG. 1. Efeito das épocas de coleta e adubação nitrogenada no acúmulo de N_2O (= denitrificação) em quatro períodos experimentais. As plantas foram cortadas e adubadas com N no início de cada período. Coletas: 2 semanas (□—□), 4 semanas (○—○), 6 semanas (■—■), 8 semanas (●—●), 10 semanas (△—△), 12 semanas (X—X). Cada dado é média de 10 amostras (5 espécies planta x 2 repetições). As barras verticais representam os valores do teste Tukey, ao nível $p < 0,05$.

e, mais ainda, a falta de produção de N_2O , quatro semanas após a adubação, em raízes supridas de NO_3 , confirmam a validade do método usado.

Os aumentos no acúmulo de N_2O , proporcionados pela adubação nitrogenada em coletas de duas semanas após o corte das forrageiras, foram bem definidos com 50 kg N/ha^{-1} , em todos os períodos do ano, e com 25 kg N/ha^{-1} , só para o terceiro período. A aplicação de nitrato no campo tem aumentado a produção de N_2O , mesmo sem uso de C_2H_2 (Nömmik 1956, Blackmer & Bremner 1978, Ryden et al. 1979, Terry & Tate 1980), o que, neste caso, foi atribuído à inibição da óxido nítrico redutase pelo nitrato ou por este ser prefe-

rido como receptor de elétrons (Bethlach & Tiedje 1981).

Efeitos de níveis tão baixos, como 25 kg N/ha^{-1} , que podem causar denitrificação no período de menor crescimento das forrageiras (terceiro período), devem ser considerados nas práticas de fertilização das pastagens.

Efeito do genótipo

Os resultados apresentados na Tabela 1 permitem avaliar o potencial de denitrificação em comparação com o total de nitrato aplicado para o teste. Observam-se valores surpreendentemente altos, sendo perdida a maior parte ou até todo o nitrato

TABELA 1. Efeito do genótipo da planta no acúmulo de N_2O (denitrificação), no meio de incubação com C_2H_2 , 2 semanas após o corte e adubação nitrogenada.

Gramíneas	primeiro período (15 out/80 - 15 jan/81)		segundo período (15 jan/81 - 15 abr/81)		terceiro período (15 abr/81 - 15 jul/81)		quarto período (15 jul/81 - 15 out/81)	
	$\mu\text{moles N-N}_2\text{O/lh}^{-1}$	Porcentagem do $N-NO_3$ aplicado denitrificado em 17h	$\mu\text{moles N-N}_2\text{O/lh}^{-1}$	Porcentagem do $N-NO_3$ aplicado denitrificado em 17h	$\mu\text{moles N-N}_2\text{O/lh}^{-1}$	Porcentagem do $N-NO_3$ aplicado denitrificado em 17h	$\mu\text{moles N-N}_2\text{O/lh}^{-1}$	Porcentagem do $N-NO_3$ aplicado denitrificado em 17h
Jaraguá	4,44 ^b	18,9	9,02 ^a	38,3	16,74 ^{ab}	71,1	18,70 ^a	79,5
Pangola	3,78 ^b	16,1	12,62 ^a	53,6	19,86 ^{ab}	84,4	9,18 ^b	38,9
Transvala	4,96 ^{ab}	21,1	6,26 ^a	26,6	23,2 ^a	99,0	8,30 ^b	35,3
Napier	7,96 ^a	33,8	5,94 ^a	24,8	10,76 ^b	45,7	4,94 ^b	21,0
Cameron	5,40 ^{ab}	23,0	5,96 ^a	25,3	11,92 ^b	50,7	2,84 ^b	12,1

* O acúmulo de N_2O (= denitrificação) foi medido por cromatografia de gás (cromatógrafo de gás Varian com detector de condutibilidade térmica, operado isotermicamente à temperatura de 70°C, com coluna Poropak Q, Helium foi usado como gás de arraste num fluxo de 35 ml.mm.-1) após 17h de incubação da amostra (raiz com ± 10 cm de parte aérea) na temperatura de 32°C em presença de C_2H_2 (Yoshinari & Knowles 1976), mais 20 ml de KNO_3 20 mM (= 400 $\mu\text{moles N-NO}_3/\text{frasco}$). Cada valor é média de seis parcelas (3N x duas repetições).

As médias nas colunas verticais com mesma letra não diferenciaram estatisticamente, segundo o teste Tukey, ao nível $P < 0,05$. Não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os genótipos nas demais coletas dentro de cada período.

aplicado (400 $\mu\text{moles.frascos}^{-1}$) num período de 17 h.

Observam-se diferenças entre cultivares e períodos do ano, sendo que o jaraguá e as digitárias mostraram as taxas mais altas de denitrificação no segundo (jan/81 - abr/81) e terceiro (abr/81 - jul/81) período. No primeiro (out/80 - jan/81) período, quando a denitrificação foi mais baixa, estas diferenças estavam invertidas. É surpreendente que os maiores acúmulos de N_2O fossem encontrados no período mais seco e de menor temperatura, quando, nas raízes das digitárias, houve denitrificação, em 17 horas de incubação, de 84 e 99% do nitrato aplicado. Isto é de considerável importância econômica durante o período de menor crescimento do ano, quando as gramíneas forrageiras assimilam menos nitrogênio do solo.

Os microrganismos associados às raízes de cameron denitrificaram menos (Tabela 1) e fixaram mais N_2 atmosférico (Souto 1982), tornando-se, com isso, um material genético desejável para futuros trabalhos em pastagem.

Os resultados altos de denitrificação obtidos neste experimento, aliados às indicações, em nossos laboratórios, de que algumas estirpes de *Azospirillum* spp. são muito ativas no processo de denitrificação (Neyra & Berkum 1977, Neyra et al. 1977), sugerem que os estudos de seleção de *Azospirillum* spp. para possível inoculação de gramíneas forrageiras devem visar a característica de não-denitrificação, nas condições de campo. É interessante que, entre as estirpes de *A. lipoferum* isoladas de 'Pangola' e 'Napier', mais que nas outras espécies de forrageiras, havia formas nir⁺ (denitrificantes) (Baldani et al. 1981).

CONCLUSÃO

O efeito do genótipo e da adubação nitrogenada na denitrificação perdura por até quatro semanas, após o corte e adubação nitrogenada das forrageiras, sendo a denitrificação mais intensa no período mais seco do ano.

REFERÊNCIAS

- BALDANI, J.I.; PEREIRA, P.A.A.; ROCHA, R.E.M. & DOBEREINER, J. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C_3 e C_4 . *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 16(3):325-30, 1981.

- BALDERSTON, W.L.; SHERR, R. & PAYNE, W.J. Blockage by acetylene of nitrous oxide reduction in *Pseudomonas perfectomarinus*. Appl. Environ. Microbiol., 31:504-8, 1976.
- BETHLACH, M.R. & TIEDJE, J.M. Kinetic explanation for accumulation of nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide during bacterial denitrification. Appl. Environ. Microbiol., 42:1074-84, 1981.
- BLACKMER, A.M. & BREMNER, J.M. Inhibitory effect of nitrate on reduction of N_2O to N_2 by soil microorganisms. Soil Biol. Biochem., 10:187-91, 1978.
- DAY, J.M. & DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N_2 -fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil Biol. Biochem., 8:45-50, 1976.
- FEDEROVA, R.I.; MILEKLINA, E.I. & IL'YUKLINA, N. I. Evaluation of the method of "gas metabolism" for detecting extraterrestrial life. Identification of nitrogen-fixing microorganisms. Izv. Akad. Nank. S. S.S.R. Sér. Biol., 6:797-806, 1973.
- FIRESTONE, M.K., FIRESTONE, R.B. & TIEDJE, J.M. Nitrous oxide as an intermediate in denitrification: evidence from nitrogen-13 isotope exchange. Biochem. Biophys. Res. Commun., 91:810-6, 1979.
- GARCIA, J.L. La dénitrification dans les sols. Bull. Inst. Pasteur, Paris, 73:167-93, 1975.
- GOMIDE, J.A.; OBEID, J.A. & RODRIGUEZ, L.R.A. Fatores morfofisiológicos de rebrota do capim-colonião (*Panicum maximum*). Rev. Soc. Bras., Zoot., 8:532-62, 1979.
- NEYRA, C.A. & BERKUM, P. van. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol., 23:306-10, 1977.
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. Adv. Agron., 29:1-38, 1977.
- NEYRA, C.A.; DÖBEREINER, J.; LALANDE, R. & KNOWLES, R. Denitrification by N_2 -fixing *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol., 23:300-5, 1977.
- NÖMMIK, H. Investigations on denitrification in soil. Acta Agric. Scand., 6:195-228, 1956.
- PAYNE, W.J. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Rev., 37:409-52, 1973.
- RYDEN, J.C. & LUND, L.J. Nitrous oxide evolution from irrigated land. J. Environ. Qual., Prelo.
- RYDEN, J.C.; LUND, L.J. & FOCHT, D.D. Direct measurement of denitrification loss from soils. I. Laboratory evaluation of acetylene inhibition of nitrous oxide reduction. Soil Sci. Soc. Am. J., 43:104-10, 1979.
- SOUTO, S.M. Competição de forrageiras. II. Período seco. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 15, Belém, 1978. Anais ... Belém, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1978.
- SOUTO, S.M. Variação estacional de fixação de N_2 e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Rio de Janeiro, UFRRJ, 1982. 268p. Tese Doutorado.
- TERRY, R.E. & TATE, R.L. The effect of nitrate on nitrous oxide reduction in organic soils and sediments. Soil Sci. Soc. Am. J., 44:744-6, 1980.
- YOSHINARI, T. & KNOWLES, R. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem. Biophys. Res. Commun., 69:705-10, 1976.