

# FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO NA RIZOSFERA DE *Paspalum notatum* E DA CANA-DE-AÇÚCAR<sup>1</sup>

JOHANNA DÖBEREINER<sup>2</sup>, JOHN M. DAY<sup>3</sup> e PETER J. DART<sup>3</sup>

**SINOPSE.**— Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum*, cultivar Batatais, e de cana-de-açúcar, colhidos no campo, foi estudada pelo método de redução de acetileno que avalia a atividade da nitrogenase, enzima responsável pela fixação biológica de N<sub>2</sub>. Na associação *P. notatum*-*Azotobacter paspali*, valores equivalentes a uma fixação de 15 a 93 kg de N/ha/ano foram obtidos e quase toda a atividade se concentrou na superfície das raízes, não sendo fixadas quantidades de N consideráveis no solo. Na cana-de-açúcar associada com *Beijerinckia* houve, além de fixação na superfície das raízes, ainda fixação de N<sub>2</sub> no solo, somando a atividade do conjunto planta — solo até 50 kg de N/ha/ano.

A atividade da nitrogenase de ambos os sistemas foi muito sensível à pressão parcial de oxigênio, sendo 0,04 atm de O<sub>2</sub> o valor ótimo para raízes retiradas do solo. No sistema intato planta — solo, a pO<sub>2</sub> da atmosfera acima do solo não teve interferência, parecendo estabelecer a planta, em torno das raízes, uma pressão parcial de oxigênio adequada à atividade da nitrogenase.

No *P. notatum* a fixação de nitrogênio foi estreitamente ligada à fotossíntese da planta. Num ciclo diurno de 16 horas a atividade da nitrogenase continuou linearmente também durante a noite, mas quando o período escuro foi prolongado, a atividade diminuiu gradativamente. Ao retornar as plantas à luz, dentro de horas houve um aumento da atividade, sendo as taxas iniciais atingidas após 15 horas de luz.

## INTRODUÇÃO

O efeito da cana-de-açúcar e de algumas outras gramináceas tropicais no desenvolvimento de *Beijerinckia* spp tem sido relatado há muitos anos (Döbereiner 1959, 1961, Ruschel & Britto 1966, Ruschel & Döbereiner 1965). Foi ainda encontrada uma associação específica entre *Paspalum notatum*, cultivar Batatais, e *Azotobacter paspali* (Döbereiner 1966, 1970) e recentemente foram focalizadas diferenças entre as condições tropicais e as de clima temperado no que se refere à ocorrência de bactérias fixadoras de nitrogênio na rizosfera (Döbereiner 1968, Döbereiner & Campêlo 1971). O mecanismo fotossintético diferente (Hatch & Slack 1970) das gramináceas tropicais, que permite uso mais eficiente das intensidades maiores de luz com temperaturas elevadas, foi sugerido como uma das causas destas diferenças (Döbereiner *et al.* 1971).

O método da redução de acetileno, baseado na observação de que a nitrogenase, além de catalisar a redução de N<sub>2</sub> em NH<sub>3</sub>, ainda catalisa uma série de outras reações entre elas a redução de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> em C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> (Dilworth 1966), abriu caminho para avaliar a fixação de nitrogênio em sistemas naturais *in situ* com precisão 1.000 vezes maior que a dos métodos até então conhecidos. Este método, relativamente simples e muito rápido, mede, através de cromatografia de gás, a quantidade de etileno produzido,

que corresponde à atividade da nitrogenase no momento da tomada da amostra.

Os primeiros resultados relatando fixação de nitrogênio na rizosfera do arroz com o método de redução de acetileno foram apresentados por Rinaudo (1970), Rinaudo *et al.* (1971) e Yoshida e Ancajas (1971). O presente trabalho visou obter dados sobre fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum* e cana-de-açúcar, com o mesmo método.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Paspalum notatum*, cultivar Batatais, foi obtido dos gramados da área do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), no Km 47, e transportado de avião para Rothamsted Experimental Station na Inglaterra. Foram retirados com latas de 1 litro, blocos intatos do sistema planta — solo; essas latas foram colocadas durante uma a três semanas em casa de vegetação, após o transporte. Estes blocos foram usados ora inteiros, colocados em dessecadores nos quais a atmosfera foi substituída três vezes pela mistura de gás desejada, ora desintegrados debaixo de atmosfera de nitrogênio, e solo ou pedaços de rizomas com raízes foram colocados em frascos de McCarty de 30 ml. O nitrogênio nos frascos foi substituído por misturas de argônio oxigênio na pO<sub>2</sub> desejada. Tanto nos frascos como nos dessecadores, foram acrescentados 6 ou 10% de acetileno após retirada de qualidades correspondentes da mistura de gases, incubando-se a 20°C.

O etileno produzido pela atividade da nitrogenase foi avaliado em amostras consecutivas de 1 ml num Perkin Elmer (F11), cromatógrafo de gás com uma coluna Poropak N de 2 m × 5 mm, numa temperatura de 90°C, nitrogênio como gás carregador (25 ml/min.) e ioni-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 14 jun. 1972.

<sup>2</sup> Trabalho realizado na Rothamsted Experimental Station, Inglaterra, onde o primeiro autor gozou bolsa do Ministério do Desenvolvimento Ultramarino da Inglaterra.

<sup>3</sup> Eng.º Agrônomo do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul, (IPEACS), Km 47, Campo Grande, GB, ZC-26, e Pesquisador Conferencista, bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq).

<sup>4</sup> Técnico da Rothamsted Experimental Station, Harpenden Herts, Inglaterra.

zação de chama de hidrogênio. Misturas conhecidas de etileno em argônio foram usadas para calibrar, sendo que todos os valores foram corrigidos subtraindo-se a contaminação de etileno no acetileno usado. Acetileno também foi determinado em todas as amostras para servir de testemunha para erros de amostragem ou injeção.

Raízes e solo de cana-de-açúcar foram retirados do campo também da área do IPEACS e enviados de avião, em sacos de polietileno, para Rothamsted, onde foram analisados dentro de 24 a 48 horas após a colheita, da mesma maneira como as amostras de *P. notatum*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Paspalum notatum*

O Quadro I dá um exemplo da distribuição da atividade da nitrogenase nas diversas partes do sistema solo — planta de *P. notatum*. Verifica-se que rizomas com raízes apresentaram a maior atividade, enquanto raízes cortadas ou rizomas foram menos ativos, os primeiros devido provavelmente ao esgotamento rápido de reservas e os últimos, devido à menor superfície/peso. Solo do rizoplan apresentou uma atividade 100 vezes menor e solo da rizosfera menor ainda. É interessante observar que a lavagem das raízes em água não removeu os organismos fixadores de  $N_2$ , indicando isto que estes microrganismos se encontram diretamente concentrados na superfície das raízes e rizomas.

QUADRO I. Atividade da nitrogenase nos componentes da rizosfera de *P. notatum* sob  $pO_2 = 0,04$  atm (médias de 4 repetições)

Materiais examinados	n-Moles $C_2H_4/h/g$
Raízes com solo de rizoplan	6,44
Rizomas com solo de rizoplan	2,44
Rizomas com raízes com solo de rizoplan	8,53
Rizomas com raízes lavadas	7,60
Solo de rizoplan	0,18
Solo de rizosfera	0,072

Resultados preliminares indicaram que a pressão parcial de oxigênio interfere severamente na atividade da nitrogenase na rizosfera. Na Fig. 1 são apresentados os resultados de um experimento visando estabelecer os valores ideais de  $pO_2$ . Verifica-se uma atividade máxima com  $pO_2 = 0,04$  atm, o que vem de encontro aos achados recentes de Drozd e Postgate (1970a) que obtiveram taxas máximas de redução de acetileno com  $pO_2 = 0,06$  atm com culturas contínuas sob  $pO_2 = 0,09$  atm de *Azotobacter chroococcum*. As curvas obtidas por estes autores foram semelhantes às apresentadas na Fig. 1, o que leva a crer que a pressão parcial de  $O_2$  na rizosfera seja muito mais baixa que a do ar. A sensibilidade de *Azotobacter* contra pressões de  $O_2$  do ar explica-se pela inibição da nitrogenase, enzima extremamente sensível ao oxigênio e que em meio de cultura onde as células são supridas com abundante açúcar é protegida pela respiração mais intensa destes microrganismos (Drozd & Postgate 1970a,b). Os resultados da Fig. 1, entretanto, mostram que na rizosfera onde as fontes de carbono são limitadas o oxigênio do ar inibe a atividade da nitrogenase.

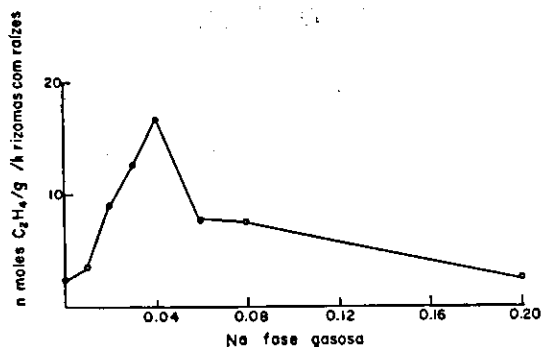


FIG. 1. Efeito da pressão parcial de oxigênio na atividade da nitrogenase na rizosfera de raízes retiradas do solo. Blocos de solo com *P. notatum* desmanchados debaixo de nitrogênio e rizomas com raízes distribuídos em frascos de McCarty contendo 30 ml de uma mistura argônio/oxigênio ( $pO_2 = 0,0, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,08$  ou  $0,20$ ) com 6% de acetileno. Valores representam médias de 4 a 7 repetições.

No experimento apresentado na Fig. 2 vê-se confirmado o efeito pronunciado do oxigênio sobre raízes extraídas do solo. Quando foi substituída a atmosfera de  $pO_2 = 0,04$  por uma de  $0,20$  atm, a fixação de nitrogênio parou imediatamente e quando após 24 horas a atmosfera foi novamente substituída por uma com  $pO_2 = 0,04$ , após uma fase latente, houve reinício da fixação mas que não atingiu as taxas iniciais.

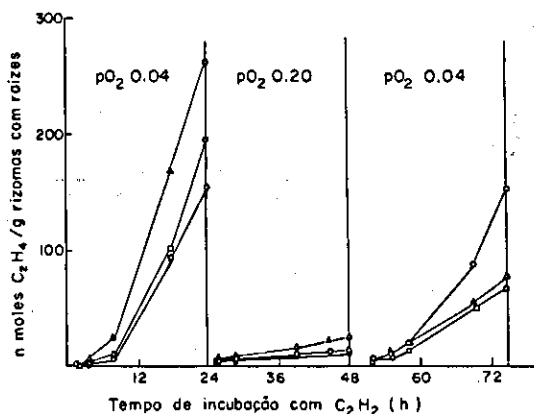


FIG. 2. Efeito da troca da pressão parcial de oxigênio na atividade da nitrogenase na rizosfera de raízes retiradas do solo. Raízes obtidas como na Fig. 1 mas incubação com acetileno (6%) primeiro 24 h sob pressão  $pO_2 = 0,04$ , depois de 24 h sob  $pO_2 = 0,20$  e depois, novamente 24 h sob  $pO_2 = 0,04$ . 6 horas de pré-incubação sem acetileno sob  $pO_2 = 0,04$  ( $\Delta$ — $\Delta$ ) sob  $pO_2 = 0,20$  (O—O) ou sem oxigênio ( $\square$ — $\square$ ). Valores representam médias de 4 repetições.

Comprovada a importância da pressão parcial de oxigênio na fixação de nitrogênio na rizosfera, impôs-se a questão de como se aplicariam estes resultados no sistema planta — solo intato, no campo, onde a atmosfera contém 21% de oxigênio. Na Fig. 3 pode-se observar o efeito da troca da pressão parcial de oxigênio na atividade da nitrogenase em 5 blocos de solo com *Paspalum notatum* retirados do campo sem perturbar o sistema.

Os diversos blocos, como eram retirados de áreas diferentes, apresentavam atividades diferentes, mas quando após 24 horas a atmosfera foi trocada de  $pO_2 = 0,20$  para  $0,04$  atm ou vice-versa, praticamente não se nota efeito, continuando todos os blocos na atividade anterior. Isto indica que na rizosfera a pressão parcial de oxigênio está sendo mantida perto dos valores ótimos para a atividade da nitrogenase independentemente da atmosfera acima do solo. Estudos recentes (Greenwood 1970) com aparelhagem desenvolvida especificamente para medir a pressão parcial do oxigênio na rizosfera, revelaram que a  $pO_2$  em volta de raízes de mostarda com as folhas no ar, decresceu gradativamente com o tempo até que atingiu  $0,06$  atm onde nivelou. Estes autores atribuíram este nivelamento ao fato de que a difusão de oxigênio através do tecido dependia tanto do oxigênio em volta das raízes como do em volta das folhas; que quanto maior a diferença entre a pressão parcial em volta das folhas e a em volta das raízes, mais rapidamente o oxigênio é transportado das folhas às raízes, e menos as raízes o obtêm do solo.

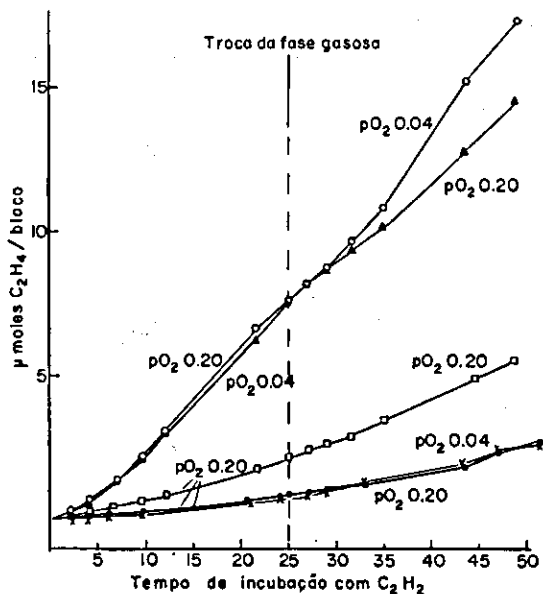


FIG. 3. Efeito da troca da pressão parcial de oxigênio na atividade da nitrogenase do sistema planta - solo intato. Cada linha representa um bloco de solo com *Paspalum* colhido no campo.

Estas observações modificam consideravelmente os conceitos clássicos sobre a fixação de nitrogênio na rizosfera, uma vez que a eficiência no uso de fontes de carbono para a fixação de  $N_2$  aumenta consideravelmente com  $pO_2$  de  $0,04$  atm (Parker & Scutt 1960) devido a ser desnecessária a respiração intensa para a proteção da nitrogenase (Drozd & Postgate 1970b). Explicam-se, portanto, os valores bastante altos de atividade de nitrogenase obtidos.

Se se tentar extrapolar dos blocos de solo com *P. notatum* para nitrogênio fixado por ha, valores entre 15 e 93 kg N/ha/ano são obtidos baseando-se na relação molar  $C_2H_2 \rightarrow C_2H_4 ; N_2 \rightarrow 2NH_3 = 3:1$ .

Ainda com *P. notatum* estudou-se a dependência da atividade da nitrogenase de material energético prove-

niente da fotossíntese da planta. A Fig. 4 mostra que num ciclo diurno de 16 horas de luz e 8 horas de noite houve atividade constante em taxa linear. Se o período escuro, entretanto, foi prolongado, a atividade baixou gradativamente chegando à paralização completa num dos blocos. Ao retornarem as plantas à luz iniciou-se rapidamente a atividade da nitrogenase atingindo as taxas iniciais após 15 horas.

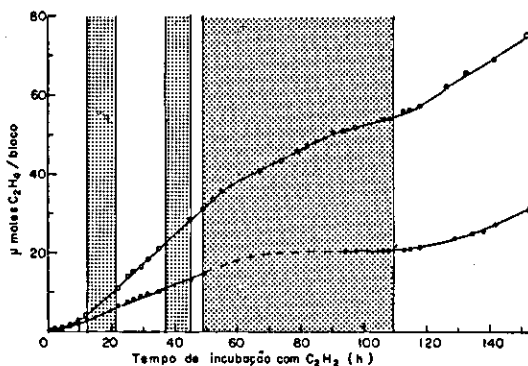


FIG. 4. Efeito do ciclo diurno e do escurecimento prolongado na atividade da nitrogenase do sistema intato planta - solo. As duas linhas representam dois blocos de solo com *P. notatum* colhidos no campo. Sombra representa períodos escuros. A temperatura foi uniforme ( $20^\circ C$ ) durante todo o experimento (câmara de crescimento). Um dos blocos no intervalo 50 a 90 dias foi mantido sem acetileno e a linha interrompida (—) foi traçada por interpolação.

Os efeitos da intensidade da luz no número de *A. paspali* na rizosfera de *P. notatum* (Döbereiner & Campêlo 1971) e sobre a atividade da nitrogenase na rizosfera de arroz (Rinaudo 1970) já foram demonstrados. Indicam eles a dependência direta da fixação de nitrogênio na rizosfera de material energético proveniente da fotossíntese da planta.

Esta dependência de material energético foi ainda demonstrada num ensaio onde solo da rizosfera de *P. notatum* que continha *A. paspali* mas não apresentou atividade de nitrogenase foi acrescentado de 1,33% de sacarose (Fig. 5). Após um período latente iniciou-se vigorosa atividade de nitrogenase sem ter havido multiplicação de *A. paspali*. Tendo sido o nitrogênio da atmosfera substituído por argônio contendo 10% de acetileno, a adição de um material energético induziu atividade da nitrogenase que, entretanto, devido à ausência de nitrogênio, não foi acompanhada de síntese de proteínas impossibilitando assim a multiplicação das células.

A atividade da nitrogenase no solo acrescentado de sacarose, ao contrário da atividade sobre raízes, não foi praticamente afetada pela pressão parcial de  $O_2$  (Fig. 5). Verifica-se uma fase latente um pouco mais longa com  $pO_2$  de  $0,20$  atm mas as taxas finais foram idênticas. É isto explicável pela teoria de Drozd e Postgate (1970b), pois com material energético disponível em abundância as células de *Azotobacter* presentes no solo em forma inativa, não somente ativarão a nitrogenase mas ainda induzirão o mecanismo de proteção da nitrogenase através de respiração mais intensa. Daí se explicaria ainda a fase latente mais longa sob atmosfera com  $pO_2$  de  $0,20$  atm.

O microrganismo responsável pela fixação de  $N_2$  na rizosfera de *P. notatum* muito provavelmente é *Azotobacter paspali*, que foi encontrado sempre em abundância naquela rizosfera.

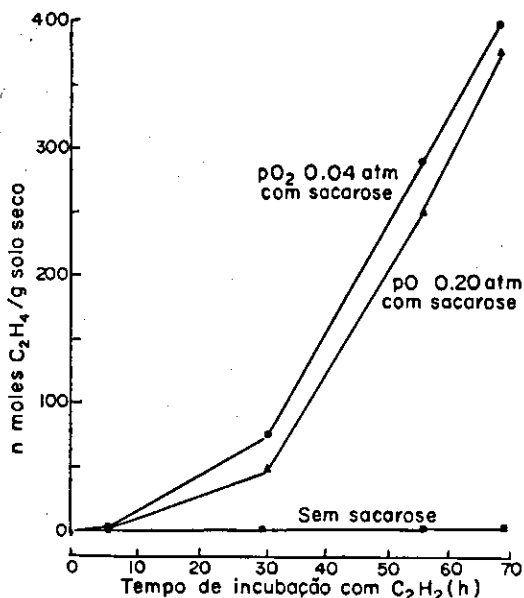


FIG. 5. Efeito da pressão parcial de oxigênio (misturas de argônio e oxigênio com 10% de acetileno) e da sacarose (1,33%) na atividade do solo contendo *A. paspali* em estado inativo. O número de *A. paspali* foi 1.600 microrganismos/g antes e 1.600 e 2.110 após a inoculação, para  $pO_2 = 0,04$  e  $0,20$  atm, respectivamente. Valores representam médias de 4 repetições.

#### Cana-de-açúcar

Sendo demonstrada a possibilidade de uma fixação de nitrogênio de importância econômica na rizosfera de *P. notatum*, abre-se o caminho para outras gramíneas tropicais de maior importância agrônoma. Resultados preliminares com a cana-de-açúcar são apresentados no Quadro 2. Raízes retiradas do solo demonstram sensibilidade ao oxigênio semelhante à de *P. notatum*. A lavagem das raízes também não removeu a atividade da nitrogenase na rizosfera. Há, entretanto, uma atividade maior no solo da rizosfera da cana do que na do *P. notatum*, que ainda foi menos afetada pela pressão parcial do oxigênio.

Estudos mais detalhados *in situ* são necessários para poder avaliar as quantidades de N fixadas numa cultura de cana-de-açúcar, que parecem, entretanto, consideráveis. As raízes retiradas do solo e expostas ao ar durante o período de transporte foram menos ativas que as de *P. notatum*, o que provavelmente representa uma estimativa falsa. Mesmo assim, somando-se a atividade no solo da rizosfera à das raízes (admitindo-se 1/3 do solo de um canalial como rizosfera), chega-se a valores correspondentes a uma fixação em torno de 50 kg de N/ha/ano.

Os microrganismos responsáveis pela fixação de  $N_2$  nos canaisiais devem pertencer ao gênero *Beijerinckia*, que aí foi encontrado em número elevado e que ainda aumentou com a proximidade das touceiras de cana.

QUADRO 2. Atividade da nitrogenase nos componentes da rizosfera de cana-de-açúcar (médias de 4 repetições)\*

Materiais examinados	n-Moles $C_2H_4$ /h/g raízes ou solo		
	$pO_2 = 0,00$ atm	$pO_2 = 0,04$ atm	$pO_2 = 0,20$ atm
Canas	0	0	0
Brotos novos	0	0,28	0,45
Raízes com solo de rizoplan	0,41	3,17	0,19
Raízes lavadas	0,10	5,55	0,17
Solo da rizosfera	0,340	1,645	0,331

\* O efeito do oxigênio foi significativo ao nível de 1% e a interação ao nível de 5%.

#### REFERÊNCIAS

- Döbereiner, J. 1959. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. *Revta bras. Biol.* 19:251-258.
- Döbereiner, J. 1961. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* Derk in the rhizosphere of sugar cane. *Pl. Soil* 15:211-217.
- Döbereiner, J. 1966. *Azotobacter paspali* sp.n. uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. *Pesq. agropec. bras.* 1:357-365.
- Döbereiner, J. 1968. Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. *Pesq. agropec. bras.* 2:1-6.
- Döbereiner, J. 1970. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the rhizosphere of *Paspalum notatum* Flügge. *Zentbl. Bakt. ParasitKde.* 124: 224-230.
- Döbereiner, J., & Campêlo, A.B. 1971. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in tropical soils. *Pl. Soil Special Volume:* 457-470.
- Döbereiner, J., Day, J.M. & Dart, P.J. 1971. Nitrogenase activity of the *Paspalum notatum* - *Azotobacter paspali* association and oxygen sensitivity. *J. gen. Microbiol.* 71:103-116.
- Dilworth, M.H. 1966. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta* 127:285-294.
- Droz, J. & Postgate, J.R. 1970a. Interference by oxygen in the acetylene reduction test for aerobic nitrogen fixing bacteria. *J. gen. Microbiol.* 60:427-429.
- Droz, J., & Postgate, J.R. 1970b. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiration activity of *Azotobacter chroococcum*. *J. gen. Microbiol.* 63:63-72.
- Greenwood, D.J. 1970. Studies on the distribution of oxygen around roots of mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). *New Phytol.* 70:97-101.
- Hatch, M.D. & Slack, C.R. 1970. Photosynthetic  $CO_2$ -fixation pathways. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 21:141-162.
- Parker, A.C. 1954. Effect of oxygen on the fixation of nitrogen by *Azotobacter*. *Nature, Lond.*, 173:780-781.
- Parker, C.A. & Scutt, P.E. 1960. The effect of oxygen on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Biochem. biophys. Acta* 38: 230-238.
- Rinaudo, G. 1970. Fixation biologique de l'azote dans trois types de sols de rizières de cote D'Ivoire. *These de Docteur Ingenieur, Faculté des Sciences, Montpellier*, p. 1-121.
- Rinaudo, G., Balandreau, J., & Dommergues, Y. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Pl. Soil Special Volume:* 471-480.
- Ruschel, A.P. & Döbereiner, J. 1965. Bactérias assimiladoras de N na rizosfera de gramíneas forrageiras. *IX Int. Grassl. Congr. Proc.* 2:1103-1108.
- Ruschel, A.P., & Britto, D.P.P. de S. 1966. Fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca, pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. *Pesq. agropec. bras.* 1:65-69.
- Yoshida, T. & Ancajas, R.R. 1971. Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 35:156-157.

ABSTRACT.- Döbereiner, J.; Day, J.M.; Dart, P.J. [Nitrogen fixation in the rhizosphere of *Paspalum notatum* and sugar cane.]. Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum* e da cana-de-açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Agronomia* (1973) 8, 153-157 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

Nitrogen fixation in the rhizosphere of *Paspalum notatum*, variety "Batatais"; associated with *Azotobacter paspali* and sugar cane associated with *Beijerinckia* sp., both grown in the field, was studied by the acetylene reduction method. In the association *P. notatum* - *A. paspali* values equivalent to a Nitrogen fixation of 15 to 93 kg/ha/year were obtained (ratio  $C_2H_2:N_2 = 3:1$ ). Almost all of the nitrogenase activity was concentrated on the root surface and very little was found in rhizosphere soil.

Nitrogenase activity of both systems was very sensitive to oxygen. On roots separated from soil a  $pO_2$  of 0.04 atm was optimal while in the intact systems the oxygen tension above the soil had little effect.

Nitrogenase activity in the rhizosphere of *P. notatum* seemed directly dependent upon photosynthetic activity of the plant. Normal 8 hour night periods did not change nitrogenase activity but when the dark period was extended the activity slowed down. On returning the plants into light, within hours the original activity was reached.