

Johanna DÖBEREINER*

* Ph.D., CNP Biologia do Solo, EMBRAPA,
23851, Seropédica, RJ, Brasil.

INTRODUÇÃO

Mesmo que haja uma reserva ilimitada de nitrogênio na atmosfera este elemento representa o fator principal limitante da produção agrícola e nos países em desenvolvimento representa mais que 70% dos custos dos fertilizantes. A pesquisa agropecuária brasileira, mais que a de outros países, devido aos elevados preços de fertilizantes nitrogenados, tem buscado as mais variadas alternativas para utilização de nitrogênio molecular da atmosfera (Döbereiner & Pedrosa, 1987). É privativo de alguns grupos de microrganismos procariontes a capacidade de transformar este N_2 molecular em formas utilizáveis pelos vegetais e assim retornar o nitrogênio perdido ao sistema solo planta. A engenharia genética até hoje não conseguiu transferir todas as informações necessárias para a

SUMMARY

*One of the most important factors affecting sustainability of agricultural systems is the supply of nitrogen through biological N_2 fixation in rotations including forage and grain legumes. Recent findings indicate highly promising possibilities of complementing legumes with productive forage grasses, ie. certain *Brachiaria* spp., *Panicum maxicum* and *Pennisetum purpureum* genotypes that are capable of obtaining a large portion of their N needs from biological N_2 fixation in association with bacteria.*

*The inclusion of sugar cane in rotation systems for regions with good conditions for this crop, could become an attractive production alternative.. Several new bacteria that form endophytic associations with this crop were isolated. Nitrogen balance and ^{15}N experiments demonstrated that over 100 kg N/ha/yr could be obtained in associations with certain sugar cane genotypes and more than 200 kg N/ha/yr with a *Saccharum spontaneum* variety used as forage in Philippines.*

AVANÇOS E PERSPECTIVAS NA PESQUISA SOBRE FIXAÇÃO BIOLOGICA DE NITROGÊNIO EM PLANTAS NÃO LEGUMINOSAS

expressão dos genes "nif e fix" para eucariontes, nem mesmo para fungos. Assim o sistema mais perfeito, capaz de substituir os processos químicos de fixação de nitrogênio e produção de fertilizantes, é a simbiose das leguminosas. Nos últimos 15 anos, a extensão da capacidade de fixar N_2 para cereais e outras gramíneas tem se tornado um dos maiores desafios da pesquisa agropecuária. Ao lado das tentativas de transferir a capacidade de fixar N_2 diretamente para plantas superiores, a aproximação mais conservadora tem sido a de identificar e manipular associações já existentes de bactérias fixadoras de N_2 com gramíneas.

AVANÇOS NA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO EM GRAMINEAS

A pesquisa sobre fixação de nitrogênio associada às gramíneas recentemente tem feito progressos na elucidação dos vários sistemas, como ainda na quantificação da fixação de nitrogênio avaliada pelo método de diluição isotópica ^{15}N complementado por balanços de N. Estes experimentos mostraram que valores de 10 a 50% do N incorporado podem ser provenientes do $^{14}N_2$ atmosférico, em arroz e gramíneas forrageiras (Boddey & Döbereiner, 1988; Boddey & Victoria, 1986; Miranda e Boddey, 1987). Experimentos em cilindros sob condições de campo usando este método mostraram

Quadro 1. Fixação de N₂ associada a 5 ecotipos de *Panicum maximum* avaliada pelo método de diluição isotópica de ¹⁵N (Miranda et al., 1987).

Ecotipo	N total acumulado kg/ha/mês	N proveniente da fixação de N ₂	% N proveniente da fixação biológica
T 71	29.2	10.0	33
Colonião	22.4	6.4	29
K190B	22.8	8.8	39
K 249	18.0	5.2	27
KK29	12.8	7.2	47

que *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* obtiveram em média anual 30 e 40% do N da fixação biológica, correspondentes a 29 e 45 kg N/ha. *B. radicans* nestes experimentos não obteve nitrogênio considerável desta fonte sendo usado como controle (Boddey e Victoria, 1986). Comparando vários ecotipos de *Panicum maximum* pelo mesmo método, Miranda e Boddey (1987) mostraram que na época de crescimento rápido esta forrageira obteve até 10 kg N/ha por mês, mais que 30% de N total acumulado (quadro 1).

Parece menos adiantada a identificação das bactérias diazotróficas responsáveis pela fixação de N₂ observada. Contrário às observações iniciais que indicaram *Azospirillum* spp. como as bactérias responsáveis, têm sido descobertas várias novas bactérias que se multiplicam seletivamente na superfície ou no interior das raízes de gramíneas (quadro 2). Estirpes de *Azospirillum* spp. selecionadas, marcadas com resistência a antibióticos, puderam ser estabelecidas no interior de raízes de trigo e sorgo, no campo (Baldani et al., 1986a;

RESUMO

Um dos fatores mais importantes para a sustentabilidade de sistemas agrícolas é o fornecimento de nitrogênio através da fixação biológica de N₂ pela rotação de culturas com leguminosas de grão e forrageiras. Pesquisas recentes indicam possibilidades altamente promissoras de complementar as leguminosas com gramíneas forrageiras produtivas, e.g. certos genótipos de *Brachiaria* spp., *Panicum maximum* e *Pennisetum purpureum* que são capazes de cobrir grande parte das suas necessidades de N pela fixação biológica de N₂ em associação com bactérias. Para as áreas onde há condições do cultivo da cana-de-açúcar, a introdução desta cultura na rotação de culturas poderá representar uma novidade altamente atrativa. Foram recentemente isoladas várias bactérias novas que formam associações endófitas com esta cultura e experimentos de balanço de N e de diluição isotópica de ¹⁵N mostraram que mais que 100 kg N/ha.ano podem ser obtidas em associação com alguns genótipos de cana-de-açúcar e mais que 200 kg N/ha com uma variedade de *Saccharum spontaneum* usada nas Filipinas como forrageira.

Baldani et al., 1987) e aumentos estatisticamente significativos da incorporação de nitrogênio e da produção foram obtidos com a sua inoculação. Não há, entretanto, ainda, comprovação de que estes efeitos da inoculação se devem à fixação de N₂. Observações com o método de diluição isotópica indicam papel mais importante de certas estirpes de *A. brasiliense* numa assimilação mais eficiente do nitrato aplicado como adubo (Boddey et al., 1986) causado pela atividade de nitrato redutase das bactérias. Isto foi demonstrado com mutantes nitrato-redutase negativas que, em cultura monoxênica, proporcionaram aumento do transporte de N nitrato para a parte aérea de trigo, enquanto as estirpes originais o diminuiram (quadro 3). Recentemente novos isolados de *Azospirillum* spp. obtidos de campos de trigo no Rio Grande do Sul onde não se aduba com nitrogênio, mostraram potencial de fixar N₂ em associação com trigo in vitro e se mostraram promissores também em experimentos de vasos (quadro 2).

Recentes descobertas mostram ainda potencial de fixação de N₂, semelhante ou maior do que o da soja, na cultura de cana-de-açúcar (Urquiaga et al., 1989a e b). O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar no mundo e esta cultura é plantada em 22 dos 26 estados do Brasil, ocupando quase 4.000.000 de hectares. Os estados mais importantes São Paulo (48% da área nacional), Pernambuco (12%), Alagoas (11%), Minas Gerais (6%), Rio de Janeiro (5%). Em 1986 a cana ocupou 8% da área cultivada nacional (52.000.000 ha), ficando em quinto lugar entre as principais culturas.

A cana-de-açúcar hoje consome cerca da quinta parte do total de adubos vendidos no Brasil. Não obstante esta cultura ser altamente extrativa em nitrogênio (100-200 kg/ha/ano), quando as condições hídricas são adequadas, raras são as vezes em que responde à adubação nitrogenada, mesmo nas soqueiras (fig. 1). No Brasil existem áreas com cana que, por mais de 70 anos, vêm produzindo razoavelmente bem, sem ou com baixa adubação, sem que o solo tenha diminuído sua fertilidade de nitrogênio.

Nos anos 70 vários experimentos foram conduzidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (Ruschel et al., 1981) utilizando-se nitrogênio gás marcado com o isótopo ¹⁵N₂, e foi detectada contribuição de fixação de nitrogênio considerável à cana-de-açúcar. Entretanto, devido às dificuldades envolvidas em expor no campo plantas de

Quadro 2. Comparação de novas bactérias fixadoras de N₂ que ocorrem em associação com raízes (Baldani et al., 1986b, Barraquio et al., 1983, Cavalcante & Döbereiner, 1988, Reinhold et al., 1987, Seldin et al., 1984, Tarrand et al., 1978).

	<i>A. brasilense, A. lipoferum</i>	<i>A. amazonense</i>	<i>A. halopraeferans</i>	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	<i>Bacillus azotofixans</i>	<i>P. diazotrophicus</i>
Crescimento sob ar	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento com N ₂ como única fonte de N	+	+	+	+	+	+	-
Fixação de N ₂ não afetada por 10 mMNO ₃	-	-	-	-	+	+	-
Usa sacarose	-	+	-	-	+	±	-
Temperatura ótima (C)	35	35	41	35	30	32	30
Isolada do interior de raízes	+	+	-	+	+	+	+
Isolada de colmos	+	+	-	-	+	-	+

cana-de-açúcar ao gás marcado com o isótopo, não foi possível concluir sobre a significância agrônômica desta contribuição.

Nesta década, na EMBRAPA, os estudos microbiológicos e de quantificação da

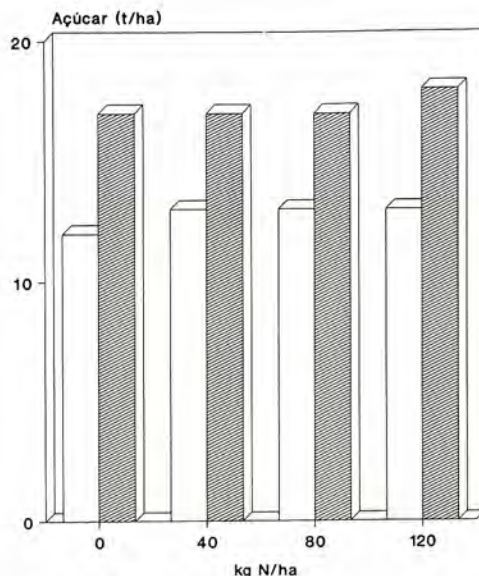
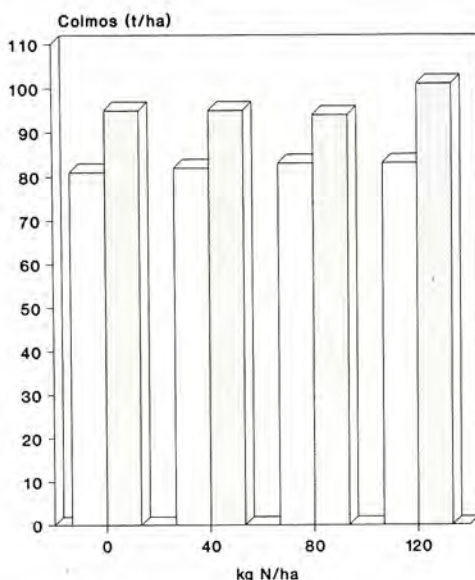
fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar foram novamente intensificados. Num primeiro experimento, a técnica utilizada foi a de balanço de nitrogênio em plantas crescidas em vasos de 50 kg de solo durante 22 meses (Lima et al., 1987). Com a variedade

Quadro 3. Efeito do nitrato redutase (NR) de *Azospirillum brasilense* na incorporação de NO₂ pelo trigo (Boddey et al., 1986; Ferreira et al., 1987).

Inoculante	Plantas crecidas in vitro com 10 mM NO ₃			Plantas crecidas em cilindros com solo marcado com ¹⁵ N		
	peso da planta g/tubo	NR Raiz*	NR parte* aérea	peso da planta g/vaso	% ¹⁵ N excesso	Recuperação do ¹⁵ N excesso
Sp 245	0.68a	0.18a	1.60d	87.7	0.151	2.33
Sp 107	0.52b	0.25a	1.35d	92.0	0.153	2.63
Sp 7	0.48b	0.06b	2.45b	89.3	0.140	2.22
Sp 245 NR	0.53b	0.17a	5.68a	--	---	--
Testemunha	0.52b	0.04b	2.11c	85.6	0.133	2.10

*M - moles NO₂/h/g peso fresco

Figura 1. Efeito da adubação nitrogenada na produção de colmos o cana de açúcar em cana planta (Var. CB 45-8), em 9 localidades de Alagoas (colunas brancas) a em 5 localidades em Sergipe (colunas pretas) (Informação da empresa Planalsucar, 1989).



de cana CB 47-89, no final do experimento o sistema solo/planta acumulou 25 g de N/planta além do que foi retirado do solo e do fornecido no adubo, no início do estudo. Estes resultados mostram que a variedade CB 47-89 acumulou o equivalente a mais de 150 kg de nitrogênio por hectare/ano derivado de fixação biológica de nitrogênio por microrganismos associados às plantas. Medidas de diluição isotópica ^{15}N confirmaram que mais que 60% do N na planta eram provenientes do ar.

Subsequentemente confirmaram-se estes resultados utilizando 10 variedades de cana plantadas num tanque de concreto preenchido com 85 toneladas de solo com 0.09% de N marcado com o isótopo ^{15}N (Urquiaga et al., 1989b). A variedade CB 47-89 novamente incorporou 46% de seu nitrogênio total assimilado através da fixação biológica (95 kg N/ha por ano em média de 3 cortes). Três outras variedades, entretanto, receberam contribuições ainda maiores de fixação de nitrogênio. Foram elas a CB 45-3 (a variedade mais plantada no Nordeste), SP 70-1143 (uma variedade nova desenvolvida pela Coopersucar, resistente à doença de fungos chamada carvão, e agora a variedade mais plantada no estado de São Paulo) e a variedade Krakatau da espécie selvagem *Saccharum spontaneum* (um dos pais dos híbridos modernos de cana-de-açúcar usada nas Filipinas como forrageira). As duas primeiras variedades em três cortes consecutivos produziram (colmos) 219, 277, 326 t/ha e 175, 184 e 186 t/ha respectivamente, incorporando do ar em média dos três cortes, 164 e 148 kg N/

ha/ano enquanto a variedade forrageira obteve em média 233 kg N/ha/ano do ar, 68% do N total incorporado (Urquiaga et al., 1989a e b). A produção das variedades tradicionais, como a NA 56-79 e a SP 79-2312, caiu de 229 para 135 e de 214 para 74 t/ha respectivamente no 3º corte. Estes resultados mostram que em certas variedades de cana, a fixação de nitrogênio pelas bactérias pode ser suficiente para produções três vezes maiores que a média atual de produção de cana no Brasil (60 t/ha), se os outros nutrientes são supridos de acordo com a análise do solo e se a tecnologia é adequada usando, entre outras, a irrigação.

Tão elevadas contribuições da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar abrem a questão de possíveis prejuízos, para a produção do açúcar, para cobrir as necessidades energéticas para a redução do N_2 em NH_3 pelas bactérias. Cálculos teóricos indicam que até 30% do total do açúcar na planta seriam necessários para isto. Os dados na figura 1, entretanto, mostram que, além de não aumentar a produção de cana, a adubação nitrogenada não aumentou a produção de açúcar. Isto pode ser explicado pela elevada capacidade fotossintética da cana que é maior que a sua capacidade de armazenar açúcar. Dados recentes do Prof. E. Malavolta (com. pessoal) da ESALQ, também vêm em apoio de àqueles resultados, já que mostraram que a aplicação foliar de molibdênio, micronutriente essencial para a fixação de nitrogênio e amplamente usado na soja, aumentou a produção de cana de 120 para 150 t/ha em São Paulo. Estudos recentes

Quadro 4. Seleção in vitro pela redução de C_2H_2 , de estirpes de *Azospirillum* spp para inoculação de trigo (A. Didonet, J. Mandel e J. Döbereiner, dados não publicados).

Inóculo de <i>Azospirillum</i>	Origem	ARA (n moles) C_2H_4/h	Peso da planta g/parte aérea	% aumento em relação a testemunha
A. brasilense				
Sp 245	Raízes est.	17	2.58	16
JA 13	Raízes lavadas ^a	136	3.42	53
A. lipoferum				
JA 4	Raízes lavadas ^a	292	4.54	104
JA 18	Raízes lavadas ^a	145	4.13	85
JA 2	Raízes lavadas ^a	136	6.02	169
JA 3	Raízes lavadas ^a	54	3.52	58
JA 4	Raízes est. ^a	64	3.37	51
Testemunha	-	1	2.33	0
60 ppm N	-		4.36	140

^a Raízes de cultivares de trigo selecionados para baixa fertilidade no Rio Grande do Sul. Trigo crescido 30 dias em vasos com areia irrigada com solução nutritiva sem N.

sobre o manejo da cultura de cana apontam vantagens econômicas, além dos ecológicos, da eliminação da queima das folhas na colheita (Urquiaga et al., 1991) e a utilização das folhas como forragem já é feito amplamente no Cuba.

Baseado nestes resultados, começaram-se a estudar os microorganismos fixadores de nitrogênio associados às raízes, colmos e folhas de cana. Utilizando as técnicas desenvolvidas na EMBRAPA-CNPBS nos últimos 20 anos, foi descoberta em 1988 uma nova bactéria fixadora de nitrogênio identificada como *Acetobacter diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner, 1988; Gillis et al., 1989). Esta bactéria é a primeira espécie do gênero *Acetobacter* capaz de fixar nitrogênio do ar, e criou muito interesse internacional por ser resistente às condições ácidas (ela cresce e fixa nitrogênio até em pH 2,5), por crescer em soluções de até 30% de açúcar, e ser incapaz de utilizar nitrato como fonte de nitrogênio. Estas características singulares permitem à bactéria crescimento no interior do colmo da cana e possibilitam a fixação de nitrogênio mesmo na presença de nitrato absorvido do solo. A bactéria é raramente encontrada no solo e não coloniza raízes de

outras plantas ou mesmo ervas daninhas crescidas entre ou dentro das fileiras de cana num canavial (Döbereiner et al., 1988). Os dados obtidos até agora indicam que a bactéria propaga-se de um canavial para outro através dos toletes plantados no solo. A bactéria também foi encontrada nas raízes e colmos de batata-doce e capim cameroon (*Pennisetum purpureum*), duas outras plantas que são multiplicadas vegetativamente, mas não em outras plantas, como sorgo sacarino (que também acumula altas concentrações de açúcar) propagadas por sementes.

PERSPECTIVAS

A eliminação da adubação nitrogenada na cultura da cana, como já foi feita na soja, ajudará a tornar esta cultura e, principalmente, o Programa Nacional de Alcool brasileiro mais econômico em termos energéticos (mais energia será produzida por unidade investida) e terá papel importante na redução do efeito estufa, já que a cultura da cana, através da fotossíntese, retira mais gás carbônico da atmosfera, do que retorna

com o uso de álcool combustível. Isto contrasta com a queima de combustíveis fósseis que retornam à atmosfera, em poucas décadas, reservas de carbono acumuladas no subsolo em milhões de anos.

Estes resultados recentes indicam várias alternativas novas para suprir o nitrogênio necessário para sistemas de rotação de culturas e que podem desde já ser melhor explorados.

REFERENCIAS

- BALDANI, V. L. D.; ALVAREZ, M. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. 1986a. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant & Soil*, 90:35-46.
- BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. J.; DÖBEREINER, J. 1987. Inoculation of field grown wheat with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biol. Fert. Soils*, 4:37-40.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SAMPAIO, M. J. A. M.; DÖBEREINER, J. 1986b. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a root-associated nitrogen fixing-bacterium. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36:86-93.
- BARRAQUIO, N. I.; LADHA, J. K.; WATANABE, I. 1983. Isolation and identification of N_2 -fixing *Pseudomonas* associated with wetland rice. *Can. J. Microbiol.*, 29:867-873.
- BODDEY, R. M.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* spp. on the nitrogen assimilation of field grown wheat. *Plant & Soil*, 95:109-121.
- BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1988. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: Recent results and perspectives for future research. *Plant & Soil*, 108:53-65.
- BODDEY, R. M.; VICTORIA, R. L. 1986. Estimation of biological nitrogen fixation associated with *Brachiaria* and *Paspalum* grasses using ^{15}N labelled organic matter and fertilizer. *Plant & Soil*, 90:265-292.
- CAVALCANTE, V. A.; DÖBEREINER, J. 1988. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant & Soil*, 108:23-31.
- DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F. D. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants. Madison: Science Tech Publishers. Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience. 155p.
- DÖBEREINER, J.; REIS, V.; LAZARINI, A. C. 1988. New N_2 -fixing bacteria in association with cereals and sugar cane. In: Bothe, M., De Bruijn, F. J. & Newton, W. E., ed. Nitrogen Fixation: Hundred Years After. Stuttgart, Gustav Fischer, p. 717-722.
- FERREIRA, M. C. B.; FERNANDES, M. S.; DÖBEREINER, J. 1987. Role of *Azospirillum brasilense* nitrate reductase in nitrate assimilation by wheat plants. *Biol. Fert. Soils*, 4(1):47-53.
- GILLIS, M.; KERSTER, S. K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPENSTEDT, R. M.; STEPHAN, M. P.; TEIXEIRA, K. R. S.; DÖBEREINER, J.; DELIEY, J. 1989. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39(3):361-364.
- LIMA, E.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1987. Quantification of biological nitrogen fixation associated with sugar cane using a ^{15}N aided nitrogen balance. *Soil Biol. Biochem.*, 19(2):165-70.
- MIRANDA, C. H. B.; BODDEY, R. M. 1987. Estimation of biological nitrogen fixation associated with 11 ecotypes of *Panicum maximum* grown in nitrogen-15-labeled soil. *Agron. J.*, 79:558-563.
- REINHOLD, B.; HUREK, T.; FENDRICK, I.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; THIELMANS, S.; DE LEY, J. 1987. *Azospirillum lipoferum* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of kallar grass [*Leptochloa fusca* (L.) Kunth.]. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37:43-51.
- RUSCHEL, A. P.; MATSUI, E.; SALATI, E.; VOSE, P. B. 1981. Potential N_2 -fixation by sugar cane (*Saccharum* sp.) in solution culture. II. Effect of inoculation, and dinitrogen fixation as directly measured by ^{15}N . In: Vose, P. B. & Ruschel, A. P. Associative N_2 -fixation. Boca Raton: CRC Press. p.127-140.
- SELDIN, L.; VAN ELSAS, J. D.; PENIDO, E. G. C. 1984. *Bacillus azotofixans* sp. nov. a nitrogen-fixing specie from Brazilian soils and grass roots. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34:451-456.

- TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24:967-980.
- URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1989a. Fijación biológica de nitrógeno con gramíneas, con énfasis en caña de azúcar. In: Paper presented at Symposium Interferon and Biotechnology. Havana, Cuba. 17-21 April.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, H. S.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. 1989b. Fixação biológica de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar; estimativa da contribuição na cana-soca. In: SEMINÁRIO DE PESQUISA, ENSINO E PRODUÇÃO, 1, Rio de Janeiro, 1988. Resumos. Rio de Janeiro, UFRRJ. Departamento de Pesquisa e Pós-graduação. p. 62.
- URQUIAGA, S.; BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C.; LIMA, E.; GUIMARÃES, D. H. V. 1991. A importância de não queimar a palha na cultura da cana-de-açúcar. Com. Tec. CNPDS/EMBRAPA nº 5:1-12.