

CONSIDERAÇÕES SÔBRE O CICLO DO NITROGÊNIO

DR. A. BARCELLOS FAGUNDES (*)

Importância biológica do Nitrogênio — A noção do papel fundamental desempenhado pelo Nitrogênio na existência dos reinos vegetal e animal não escapa aos estudantes de qualquer ramo de biologia.

Um componente obrigatório das moléculas de proteína, matéria prima das complexas estruturas responsáveis pelas reações que se processam no interior das células vivas, representa o azoto, apesar do seu nome paradoxal, um elemento indispensável a qualquer manifestação vital. Justifica-se, portanto, o interesse com que os investigadores dos fenômenos bioquímicos, os fisiologistas, os botânicos, os bacteriologistas e os agrônomos em geral se dedicam aos estudos sôbre a economia dêsse elemento na natureza.

A atmosfera como um grande depósito de azoto — Em cada 100 partes, em volume, da enorme massa de ar que envolve o globo terrestre existem 78 partes de nitrogênio, 21 partes de oxigênio e 1 parte de outros gases. A quantidade de azoto existente na crosta terrestre se aproxima, segundo Erdtman, citado por Clark (Data of Geochemistry), de 0.016%. Esta partilha do elemento nobre parece muito desfavorável ao substrato onde vivem e de onde se nutrem os seres animais e vegetais. Graças, no entanto, a intenso intercâmbio entre a crosta e a atmosfera, vem se mantendo, na distribuição dêsse elemento, uma condição de equilíbrio que tem garantido o teor mínimo de nitrogênio indispensável à preservação da vida animal e vegetal sôbre a terra.

Nitrogênio presente nas terras cultivadas — O teor em azoto das terras cultivadas é variável, de acôrdo com a influência de alguns fatores, dentre os quais de destacam o calor e a umidade, pelos estudos que já existem a seu respeito.

Jenny, em "Factors of Soil Formation", reuniu uma série de dados sôbre a porcentagem de azoto presente na camada superficial do solo em diversos pontos dos Estados Unidos, sujeitos a condições distintas de temperatura e umi-

(*) Do Instituto de Biologia Vegetal do Ministério da Agricultura.

dade. De acôrdo com êstes dados, na zona úmida, a leste das Montanhas Rochosas, os solos florestais de Mississipi, com uma temperatura média anual de perto de 21°C.. têm um teor médio de 0,1% de nitrogênio, enquanto que solos semelhantes, em Wisconsin, com uma temperatura média anual de 7° C. contêm perto de 0,3% do mesmo elemento.

Em relação ao fator umidade, os dados examinados por Jenny indicam que, sob condições constantes de temperatura, o teor em azoto do solo acompanha, em uma proporção logarítmica, a elevação do índice N S de Meyer, quociente da precipitação anual, (em milímetros) sôbre o déficit de saturação de ar, (em milímetros de mercúrio).

Esta relação, no entanto, se verifica em condições médias de umidade (com índices N S inferiores a 400). Não sabemos se, em regiões tropicais de grande pluviosidade, com índices N S muito superiores a 400, continuará se manifestando o mesmo tipo de relação entre umidade e teor em nitrogênio do solo.

Nos solos do Brasil, os teores em azoto são, em geral, inferiores aos indicados por Jenny, embora se encontrem ocasionalmente, valores superiores a 0,1%.

Infelizmente não dispomos de número suficiente de análises de solos das diversas regiões do país, sob condições climáticas bem definidas, afim de verificar se aqui também ocorrem as relações apontadas por Jenny.

As quantidades acima indicadas representam um estado de equilíbrio entre os processos de adição de nitrogênio ao solo e os processos que resultam na perda do mesmo elemento.

Os fatores climáticos, umidade e temperatura, afetam naturalmente de modo diferente cada um destes processos ou grupos de processos, desta forma elevando ou baixando o nível final de azoto no solo.

Perdas de Nitrogênio — Entre as causas de perda do nitrogênio do solo poderemos citar:

- 1 — Remoção pelas culturas.
- 2 — Perda pelas águas de drenagem e pela erosão.
- 3 — Evolução, sob a forma de amônia ou de azoto elementar, em virtude de processos biológicos favorecidos por condições anormais de solo.
- 4 — Perda pelas queimadas.

A remoção de nitrogênio do solo pelas culturas varia com a natureza do produto colhido. Assim, uma safra de milho (considerando o grão e a espiga) poderá remover aproximadamente 70 kg de nitrogênio de cada hectare de terra; uma de aveia 55, uma de cevada 52, — uma de batatas 50 e uma de centeio 42.

Uma colheita de algodão, se só fosse exportado da fazenda o linter, removeria apenas 1 kg de nitrogênio de cada hectare. Com a exportação das sementes, contudo, e com a queima dos restos da cultura, como se pratica, para evitar o desenvolvimento das pragas, a cultura remove de cada hectare de terra, aproximadamente, 75 kg de azoto.

Segundo Lyon e Buckman, pode-se admitir como estimativa média para remoção de azoto do solo por uma rotação de culturas, 70 kg por hectare, por ano.

Êsses autores citam os resultados obtidos nos lisímetros da Universidade de Cornell, durante 10 anos de observação, os quais indicam que as perdas médias de azoto, em um solo Dunkirk franco limoso, se aproximam de:

75 kg por hectare, por ano, em terreno descoberto,

8,6 kg por hectare, por ano, em terreno ocupado por uma rotação

2,5 kg por hectare, por ano, em terreno coberto por pasto.

A perda de nitrogênio do solo, através das águas de drenagem, no caso do terreno descoberto, supera, como se vê, as quantidades removidas por algumas culturas.

Êstes dados indicam a importância que pode desempenhar a manutenção da cobertura vegetal permanente na conservação da fertilidade do solo.

A perda de azoto do solo, por evolução sob a forma amoniacal, ou como azoto elementar, resultante dos processos de redução — dos nitratos, é normalmente bastante limitada e só se acentua em condições especiais, tais como nos casos em que se aplica ao solo um grande excesso de material nitrogenado (perda como NH_3 ou quando a deficiência de arejamento do solo favorece processos microbiológicos de redução de nitratos (perda de N elementar).

As quantidades de azoto perdidas do solo pelas queimadas variam consideravelmente de acôrdo com a exuberância da vegetação — destruída.

Embora não possuamos dados seguros a respeito da magnitude dessas perdas, admitimos que elas sejam enor-

mes no caso da queima de uma capoeira ou mata para estabelecimento de novas culturas.

Adições de Nitrogênio ao Solo — O enriquecimento do solo em nitrogênio se processa, principalmente, através das seguintes causas:

- 1 — Água das chuvas, tendo em solução compostos nitrogenados.
- 2 — Aplicação, pelo homem, de adubos nitrogenados.
- 3 — Fixação biológica do nitrogênio, por meios simbióticos e assimbióticos.

Existem em estado gasoso, na atmosfera, traços de amônia e de ácido nítrico, resultantes de combinações, entre o nitrogênio, o oxigênio e o hidrogênio, provocadas por descargas elétricas, ou provenientes de gases lançados à atmosfera pelas chaminés das fábricas, e pelas decomposições biológicas de resíduos orgânicos.

Pelos dados colhidos em um pequeno número de localidades (Harpندن e Garford, na Inglaterra; Flahult, na Suécia; Groningen, na Holanda; Bloeimfontein, na África do Sul; Ottawa, no Canadá e Ithaca, nos Estados Unidos) pode-se admitir que as quantidades de azoto nítrico, incorporadas ao solo, por meio das águas de chuva, se aproximam geralmente de 2 kg por hectare, por ano, enquanto que as quantidades de azoto amoniacal podem variar entre 3 a 8 kg por hectare, por ano.

Se estes dados puderem ser generalizados, é provável que a quantidade média de azoto incorporado ao solo, em dissolução nas águas das chuvas, se aproxime de 6 kg por hectare, por ano.

A incorporação de nitrogênio ao solo, por meio das práticas de adubação é extremamente variável, em função da cultura, da região, da natureza do solo e dos graus de progresso e de possibilidades materiais do agricultor. Sabemos, no entretanto, como é diminuta, no Brasil, a média de incorporação de azoto ao solo pela adubação.

Sob as condições a que está atualmente sujeita a crosta terrestre, a maior parte do azoto incorporado ao solo resulta de processos de fixação biológica.

Tais processos podem ser simbióticos ou assimbióticos.

Os principais organismos responsáveis pela fixação assimbiótica do azoto pertencem a espécies dos gêneros *Azotobacter* (aeróbias) e *Clostridium* (anaeróbias).

Segundo Waksman, apoiado nos resultados de vários investigadores, as quantidades anuais de azoto fixadas ao solo por intermédio de processos biológicos assimbióticos, são em geral próximas de 10 kg por hectare, podendo atingir, em condições especiais, até 50 kg por hectare.

Quantidades maiores de nitrogênio são incorporadas ao solo por intermédio da fixação simbiótica. As indicações dadas por diversos autores sobre as quantidades fixadas por essa agência variam muito. Segundo Lyon e Bizzell, baseados em uma experimentação que durou 10 anos, em Ithaca, no Estado de New York, a fixação de azoto atmosférico pela alfafa atinge a 276 kg por hectare, por ano.

Com a mesma planta, são os seguintes os dados de fixação, obtidos por outros autores, citados por Fred e seus colaboradores no excelente trabalho sobre o assunto, intitulado "Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants":

Arny e Thatcher (1945)	em Minnesota	124	kg.	p. ha.	p. a.
Hopkins (1902)	em Illinois	44	«	«	«
Whiting (1915)	em Illinois	145	«	«	«
Lipman e Blair (1917)	em New Jersey	178	«	«	«
Fred e Graul (1916)	em Wisconsin	70	«	«	«
(1922)	em Wisconsin	103	«	«	«

A mesma variação se verifica em relação às outras espécies de leguminosas. Fred e seus colaboradores em face de um grande volume de dados experimentais, seus e de outros investigadores, são de opinião que as quantidades de azoto atmosférico fixadas pelas leguminosas se enquadram geralmente entre 55 e 110 kg. p. ha, p. ano.

As referidas quantidades são apreciáveis, embora incapazes de balançar as perdas de nitrogênio, que pelas diversas agências anteriormente apontadas, sofre o solo anualmente.

Há, por consequente, todo interesse em precisar as condições em que se intensificam os processos de fixação e em procurar a reprodução das mesmas na prática agrícola.

Organismos responsáveis pela fixação simbiótica de nitrogênio — Vários investigadores têm, em diversas épocas, relatado indícios de fixação de azoto através de processos de simbiose entre certos microorganismos e espécies das famílias das rubiáceas, mircináceas, dioscoráceas, casuarináceas, cicadáceas, miricáceas, eleagnáceas, betuláceas, etc.

E', no entretanto, no caso das leguminosas que o fenô-

meno se tem se revelado de maneira mais positiva e com maior intensidade. A propriedade não se estende a tôdas as leguminosas, contudo. Há muitas espécies, principalmente na sub-família das *Cesalpinoideae*, que não apresentam capacidade de fixação de azoto.

Os microorganismos que, em simbiose com as leguminosas, são responsáveis pela fixação de azoto atmosférico são atualmente classificados no gênero *Rhizobium*.

Ainda não parecem suficientemente esclarecidos os problemas relativos à sistemática dêste gênero. Fred e seus colaboradores admitem como válidas as seguintes espécies:

- I — *Rhizobium melilote*, produzindo nódulos em espécies dos gêneros *Medicago*, *Melilotus*, e *Trigonella*.
- II — *R. trifolii*, produzindo nódulos em espécies do gênero *Trifolium*.
- III — *R. leguminosarum*, produzindo nódulos em espécies dos gêneros *Pisum*, *Lathyrus*, *Vicia*, *Lens* e *Cicer*.
- IV — *R. Phaseoli*, produzindo nódulos em espécies do gênero *Phaseolus*.
- V — *R. lupini*, produzindo nódulos em espécies dos gêneros *Lupinus* e *Ornithopus*.
- VI — *R. japonicum*, produzindo nódulos exclusivamente na soja.

Além dos grupos de inoculação correspondentes a cada uma destas espécies, isto é, do conjunto de leguminosas em cujas raízes podem os respectivos microorganismos determinar a formação de nódulos, admitem Fred e seus colaboradores, os seguintes grupos, para cujas bactérias, também pertencentes ao gênero *Rhizobium*, ainda não houve batismo específico.

- VII — Bactérias causando nódulos em espécies dos gêneros *Vigna*, *Cassia*, *Arachis*, *Lespedeza*, *Stizolobium*, *Baptisia*, *Desmodium*, *Acacia*, *Albizzia*, *Genista*, *Cytisus*, *Phaseolus*, *Canavalia*, *Pueraria*, *Cajanus*, *Cyamopsis*, *Dolichos* e *Crotalaria*.
- VIII — Idem dos gêneros *Lotus* e *Anathyllis*.
- IX — Idem do gênero *Dalea*.
- X — Idem do gênero *Onobrychis*

- XI — Idem do gênero *Strophostylis*
- XII — Idem do gênero *Robinia*
- XIII — Idem do gênero *Amphicarpa*
- XIV — Idem do gênero *Amorpha*
- XV — Idem do gênero *Coronilla*
- XVI — Idem do gênero *Caragana*

Em contraposição à crença primitiva de que uma só espécie de bactéria era responsável pelas nodosidades observadas nas diferentes espécies de leguminosas, desenvolveu-se posteriormente o conceito de especificidade dentro dos diferentes grupos. Assim, o *Rhizobium* do grupo da alfafa (*R. meliloti*) não poderia produzir nódulos em espécies pertencentes a outros grupos, nem as espécies de *Rhizobium* correspondentes a estes últimos grupos poderiam produzir nódulos em plantas do grupo da alfafa, e assim por diante.

Ultimamente, porém, se tem verificado que, para alguns grupos, esta especificidade não é absoluta.

Leonard, em 1923, bem como Sears e Caroll, em 1927, estudaram detalhadamente os casos de inoculação cruzadas entre os grupos da *Soja* e da *Vigna*.

Wilson, em 1945, usando diversas culturas de *Rhizobium japonicum*, isoladas de nódulos de soja, conseguiu produção de nódulos em vinte espécies do gênero *Crotalaria* e em algumas espécies dos gêneros *Acacia*, *Alysicarpus*, *Amorpha*, *Astragalus*, *Cajanus*, *Desmodium*, *Dolichos*, *Galatea*, *Genista*, *Indigofera*, *Lespedeza*, *Phaseolus Rhynchosia*, *Vigna* e *Wisteria*.

E' razoável admitir que a possibilidade de simbiose entre uma espécie de leguminosa e uma determinada espécie de *Rhizobium* é regulada, por um lado, pela habilidade da bactéria em invadir a raiz da planta e ali se fixar e multiplicar e, por outro lado, pela capacidade da planta em resistir a esta invasão. Em condições normais, estas capacidades de invasão e de reação limitam as formas de bactéria e de planta, capazes de estabelecer simbiose, dando lugar aos chamados grupos de inoculação.

E' de se aceitar, no entanto, que sob condições que alterem a fisiologia da bactéria ou da planta leguminosa, modifiquem-se aquelas capacidades de invasão e reação, ao ponto de tornar possível o estabelecimento de simbiose entre representantes de grupos estranhos.

Desta forma é admissível que em certas espécies de leguminosas, em cujas raízes não foram, até agora, obser-

vadas as nodosidades denunciadoras da simbiose, possam, quando sob a influência de determinadas condições, ainda desconhecidas, ser invadidas por uma determinada espécie, ou linhagem de *Rhizobium*, formar nódulos e fixar nitrogênio, como o fariam uma alfafa, um feijão ou uma soja.

Relações entre a bactéria e a leguminosa — Diversos autores têm verificado que, quando germina uma semente de leguminosa e a respectiva radícula penetra no solo, estabelece-se, no sentido da mesma, uma migração das bactérias fixadoras de nitrogênio existentes naquele substrato. Ludwig e Albion (1935) sugeriram que aquela migração não passa de uma quemotaxia, provocada pela presença de hidratos de carbono, de compostos azotados, e de fatores específicos de crescimento, secretados pelas raízes da planta em desenvolvimento.

Esta aglomeração de microorganismos em torno das raízes não é, aliás, provocada apenas no caso das leguminosas. A proliferação de microorganismos em torno das raízes de plantas superiores já era atribuída por Hiltner, em 1921, à secreção, por aqueles órgãos, de substâncias necessárias à vida bacteriana.

Aquele autor designou "rizosfera" à região, em torno da raiz, no seio da qual se verificavam tais influências. Starkey constatou o fenômeno em diversas plantas cultivadas, não leguminosas.

No caso das bactérias fixadoras de azoto, sabe-se que os rizóbios se mantêm móveis na rizosfera. A velocidade deste movimento, já foi determinada por vários investigadores e parece variar entre 0,5 e 2,5 cm. em 24 horas, de acordo com as condições do meio.

Quando estes microorganismos se aproximam dos pêlos radiculares, estes últimos apresentam uma reação característica, recurvando sua extremidade.

O mecanismo de entrada do rizóbio através da parede celular do pêlo radicular ainda é obscuro.

Alguns autores admitem que os microorganismos secretam uma substância que dissolve aquela parede, apesar de não se ter confirmado a ocorrência de citase em estratos de culturas destas bactérias.

Transposta a parede, forma-se um cordão de infecção, constituído por uma cadeia de bactérias, que atravessa o pêlo radicular e penetra no córtex da raiz, no sentido do cilindro central.

Segundo as investigações de Mc Coy as bactérias deste cordão de infecção estão embebidas em uma mucilagem, secretada por elas próprias, e envoltas em uma bainha de material celulósico, hemicelulósico e péctico, formada pela planta.

O cordão de infecção estimula as divisões celulares nos tecidos por onde penetra, principalmente nas camadas corticais da raiz. Tais divisões provocam o aumento destes tecidos e a consequente formação do nódulo. As investigações de Wipf e de Cooper revelaram que, com a presença do cordão de infecção é induzida a poliploidia em algumas células do córtex.

Admite-se, por isto, que os rizóbios secretem qualquer substância com ação semelhante à da colchicina.

As células poliploides são penetradas pelo cordão de infecção. No seu interior, os rizóbios podem se manter ainda envoltos pela bainha hemicelulósica ou podem se libertar da mesma e ficar livres no citoplasma da célula hospedeira. Neste caso, os rizóbios se modificam, alongando-se, vacuolando-se, ramificando-se, e passam a constituir os bacteroides, assim batizados por Brunchorst em 1885.

Uma parte das células meristemáticas do córtex do nódulo se diferenciam, formando feixes vasculares que se ligam ao sistema vascular da raiz e possibilitam as trocas entre esta e o nódulo, trazendo para este último os materiais hidrocarbonados de que necessita e recebendo dele compostos nitrogenados.

Segundo os resultados de Brenchley e Thornton, o desenvolvimento deste sistema vascular do nódulo torna-se deficiente nas plantas que sofrem da carência de boro, o que talvez explique a exigência deste elemento verificada com mais intensidade nas leguminosas do que nas espécies de outras famílias botânicas.

Em várias épocas têm aparecido, na literatura científica, contribuições em que é sustentada a fixação de nitrogênio *in vitro* por algumas culturas de rizóbio independentes das respectivas leguminosas. A repetição destes ensaios por outros investigadores, sob condições experimentais mais rigorosamente controladas e usando métodos analíticos mais precisos, tem sempre revelado serem inexatas as teses propostas.

Têm havido, igualmente, algumas apresentações de resultados experimentais que comprovariam a fixação de nitrogênio por plântulas de leguminosas independentes dos respectivos rizóbios. Também neste caso a repetição dos

ensaios sob condições mais críticas e a análise estatística dos resultados tem revelado sua falta de significação.

Admite-se, por isto, que a fixação do nitrogênio atmosférico é uma característica fisiológica do complexo planta-bactéria que não se manifesta por um dos seus componentes na ausência do outro, pelo menos dentro das condições experimentais até agora observadas.

Relação entre hidratos de carbono e azoto — Diversos investigadores têm observado que a adição de compostos nitrogenados aos substratos em que crescem as plantas leguminosas inoculadas com os respectivos rizóbios, diminui ou impede a fixação de azoto e reduz o desenvolvimento dos nódulos.

Diversas hipóteses têm sido apontadas para explicar ditos efeitos.

Hiltner sugeriu que a presença de nitratos dificultava ou impedia a invasão das raízes pelos rizóbios.

Tal hipótese não é apoiada pelas observações posteriores, tais como as de Thornton e Giêbel, que revelam não só a invasão da raiz em presença de quantidades moderadas de azoto combinado, mas um início de formação de nódulo, que apenas deixa de se desenvolver normalmente.

Os investigadores da escola de Wisconsin têm procurado estudar estes fenômenos em função das proporções entre hidratos de carbono e nitrogênio combinado, à disposição do sistema planta-bactéria.

Este assunto, como os demais problemas químicos da fixação simbiótica do azoto, é amplamente discutido no interessante livro de Wilson, intitulado "The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation".

As modificações da relação hidratos de carbono-nitrogênio, provocadas artificialmente para investigar a influência daquela relação sobre o mecanismo de fixação, podem ser alcançadas por meio de uma elevação do teor em azoto do meio, ou de redução do nível de hidratos de carbono na planta.

Foram feitas, por Hopkins e seus colaboradores (1932) e por Giêbel ensaios para verificar que influência poderia um pequeno suprimento de nitratos exercer sobre o fenômeno, no caso de plantas de trevo e de soja inoculadas.

Seus resultados, no entretanto, não permitem afirmar ou negar que tenha havido fixação de azoto em presença de pequenas doses de nitrato. Acontece que, sendo as quantidades de nitrato adicionadas, apenas suficientes para as ne-

cessidades da planta, sua absorção poderá ser seguida por sua utilização imediata, de forma que fique sempre o ambiente da raiz com deficiência de compostos solúveis de nitrogênio.

A elevação do teor em hidratos de carbono no sistema bactéria planta tem sido obtida de duas formas: aumentando a concentração de CO₂ na atmosfera em que se encontra o sistema, ou aumentando o teor em açúcares do substrato.

Wilson, Fred e Salmon, (1933) adotaram o primeiro processo, cultivando trevo vermelho em atmosfera com a pressão parcial de CO₂ acima do normal. Seus resultados indicaram uma proporção direta entre o teor em CO₂, até 0,8% e a quantidade de azoto fixado, embora o aumento em azoto fosse menos marcado, ou intenso do que o aumento em peso seco das plantas. Georgi, Orcutt e Wilson adotaram a técnica de aumentar o teor em hidratos de carbono do substrato, adicionando-lhe sacarose e glucose, e verificaram uma elevação na quantidade de nitrogênio fixado, à medida que o teor em açúcar crescia de 0 a 0,5%. É difícil estabelecer se este efeito será realmente consequência de uma absorção do carboidrato pelas raízes ou se será indireto, em virtude da sua decomposição do açúcar pelos microorganismos existentes no substrato e consequente aumento do CO₂ da atmosfera à disposição das plantas.

Diversos investigadores têm constatado que a formação de nódulos e a fixação de azoto aumentam à medida que aumenta a intensidade da luz fornecida às plantas, até certos limites.

Baseados no grande volume de dados existentes sobre o assunto, Fred e Wilson formularam uma hipótese, segundo a qual é através de alterações da relação carboidrato-nitrogênio do sistema planta-bactéria que o fenômeno da fixação sofre a influência dos fatores externos.

Desta forma o comportamento do sistema simbiótico de fixação está em função dos suprimentos de hidratos de carbono e de nitrogênio, medidos pela relação que guardam entre si.

Wilson em (The Biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation) representa estas relações por dois diagramas no espaço, em que as duas coordenadas horizontais representam as concentrações em carboidratos e em azoto e a coordenada vertical em um caso, a intensidade de invasão (número de nódulos) e, em outro, a quantidade de nitrogênio fixado.

Esta hipótese tem resistido a todas as provas a que tem sido submetida e constitui valioso instrumento para interpretação do grande volume de resultados até hoje obtidos pelos investigadores do fenômeno de fixação simbiótica do azoto.