

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

QUANTIFICAÇÃO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE
NITROGÊNIO ASSOCIADA À CULTURA DA
CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum officinarum* L.)

EDUARDO LIMA

SOB ORIENTAÇÃO DO PROFESSOR

ROBERT MICHAEL BODDEY

Tese submetida como requisito
parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Agronomia,
Área de Concentração em
Ciência do Solo.

Itaguaí, Rio de Janeiro

Abril, 1988

Às minhas filhas e à(o)
que está por vir,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Robert Michael Boddey, pela segura orientação e pela amizade nestes anos de convívio.

À Dra. Johanna Dobereiner pelo apoio e sugestões durante o desenvolvimento do trabalho.

À Mercedes pelo incentivo, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

Aos colegas do Departamento de Solos e da EMBRAPA-UAPNPBS pelo apoio e incentivo durante todo o decorrer do trabalho.

À Dra. Giselle Machline de Oliveira e Silva pelo auxílio na preparação do manuscrito.

Ao Departamento de Solos da UFRRJ pela oportunidade.

Ao CNPq pela bolsa de estudos oferecida durante os primeiros anos de trabalho.

À Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à National Academy of Sciences (NAS - USA) pelo apoio financeiro.

À Mariângela pelo estímulo e apoio.

Aos estudantes do curso de Agronomia da UFRRJ pelo auxílio no preparo de material.

À Conceição e Graça pelo auxílio na datilografia.

À todos que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

	pág.
1 - Introdução	01
2 - Revisão de Literatura	05
2.1. Métodos de quantificação da fixação biológica de nitrogênio	05
2.1.1. Método da redução do acetileno	06
2.1.2. Métodos isotópicos	12
2.1.2.1. Atmosfera enriquecida com ^{15}N	13
2.1.2.2. Diluição isotópica de ^{15}N	14
2.1.2.3. Técnica da abundância natural de ^{15}N	17
2.1.3. Balanço de nitrogênio	20
2.2. O processo da fixação biológica de nitrogênio associada à gramíneas	23
2.3. O nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar	26
2.3.1. Fixação biológica de nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar	35

2.3.1.1.	Ocorrência de bactérias fixadoras de N ₂ na cultura da cana-de-açúcar	36
2.3.1.2.	Técnica da redução do acetileno	41
2.3.1.3.	Método da incorporação de ¹⁵ N ₂	43
2.3.1.4.	Técnica da diluição isotópica	45
2.3.1.5.	Balanco de N	46
3 -	Materiais e métodos	48
3.1.	Experimento 1 - Balanco de N-total e diluição isotópica de ¹⁵ N	48
3.1.1.	Material vegetal e de solo	48
3.1.2.	Delineamento experimental e sistema de cultivo	50
3.1.3.	Colheita	51
3.1.4.	Métodos de determinação	52
3.2.	Experimento 2 - Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada à cana-de-açúcar através da diluição isotópica de ¹⁵ N.	55
3.2.1.	Material vegetal e de solo	55
3.2.2.	Delineamento experimental e sistema de cultivo	56
3.2.3.	Colheitas	59
3.2.4.	Métodos de determinação	59
4 -	Resultados e discussão	61
4.1.	Experimento 1 - Balanco de N-total e diluição isotópica de ¹⁵ N	61
4.1.1.	Produção de matéria seca	61

4.1.2. Acúmulo de N-total	66
4.1.3. Diluição isotópica e recuperação de ^{15}N	71
4.1.4. Balanço de N-total	74
4.2. Experimento 2 - Quantificação da FBN através da diluição isotópica de ^{15}N - ontogenia	78
4.2.1. Produção de matéria seca	78
4.2.2. Teor de nitrogênio e acúmulo de N-total	80
4.2.4. Colheita final aos 16 meses	87
4.3. Avaliação final e perspectivas	91
5 - Conclusões	95
6 - Literatura citada	97

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 - Variação dos teores e quantidades de N adsorvido por 4 touceiras de cana-de-açúcar (Co 419) em função da idade da planta. CATANI et al., 1959.	28
Tabela 2 - Algumas propriedades químicas do material de solo utilizado (Cambissolo eutrófico) antes da adição de fertilizante.	49
Tabela 3 - Algumas propriedades químicas do material de solo utilizado no experimento, antes da adição de fertilizante.	56
Tabela 4 - Efeito da vinhaça na produção de matéria seca de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 kg de solo. Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições.	63

- Tabela 5 - Efeito da vinhaça na produção de matéria seca de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 kg de solo. Segunda colheita aos 9 meses de idade. Médias de 10 repetições. 65
- Tabela 6 - Efeito da vinhaça no acúmulo de N - total de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 kg de solo. Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições. 67
- Tabela 7 - Efeito da vinhaça no acúmulo de N - total de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 kg de solo. Segunda colheita aos 9 meses de idade e no somatório da primeira e segunda colheitas. Média de 10 repetições. 69
- Tabela 8 - Efeito da vinhaça no enriquecimento de 15N de quatro cultivares de cana de açúcar crescidas em vasos de 64 kg de solo adubado com uréia marcada com 15N. Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições. 72
- Tabela 9 - Balanço de N- total em quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas por 21 meses em vasos contendo 64 kg de solo. Médias de 5 repetições. 75
- Tabela 10 - Peso da matéria seca produzida pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N em 4 épocas de colheita

(4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições. 79

Tabela 11 - Teor de nitrogênio encontrado na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições. 81

Tabela 12 - Acúmulo de N-total pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições. 82

Tabela 13 - Enriquecimento de 15N na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições. 84

Tabela 14 - Recuperação de N marcado pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições. 85

Tabela 15 - Coeficientes de variação para o enriquecimento de 15N em cana-de-açúcar cultivada em vasos comparando 2 fontes de 15N, em 4 épocas de colheita. 87

Tabela 16 - Peso da matéria seca, teor de nitrogênio e acúmulo de N-total na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de 15N aos 16 meses de idade. Médias de 5 repetições. 90

Tabela 17 - Enriquecimento de ^{15}N e recuperação de nitrogênio marcado pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N aos 16 meses de idade. Médias de 5 repetições.

ÍNDICE DE FIGURAS

	pág.
Figura 1 - Variação temporal do enriquecimento de ^{15}N na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos de 100 kg de solo, utilizando peletes de gesso marcado como fonte de ^{15}N . Média ponderada de 5 repetições.	88
Figura 2 - Variação temporal do enriquecimento de ^{15}N na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos de 100 kg de solo, utilizando matéria orgânica marcada como fonte de ^{15}N . Média ponderada de 5 repetições.	89

RESUMO

Um estudo com balanço de nitrogênio foi realizado em quatro cultivares comerciais de cana-de-açúcar crescidos em vasos contendo 64 kg de solo, com o objetivo de quantificar possíveis contribuições da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para as plantas. Vinhaça foi adicionada na metade dos vasos e todos os tratamentos foram repetidos 10 vezes. Os vasos foram mantidos no campo e adubados com o equivalente a 80 kg de N/ha com fertilizante uréia marcada com ^{15}N .

Após 12 meses de crescimento as plantas acumularam entre 10 e 24 % do N total do solo + fertilizante adicionado. Nos nove meses de crescimento seguintes, sem qualquer nova adição de fertilizante nitrogenado, as plantas acumularam o equivalente a 8,5 até 19 % do N original do solo + fertilizante. O cultivar CB 47-89 acumulou significativamente mais N do que os demais cultivares. Esta diferença foi maior na ausência de vinhaça e, neste tratamento, o enriquecimento de ^{15}N no cultivar CB 47-89 foi a metade do que o dos outros cultivares, sugerindo que houve uma contribuição de N não marcado do ar para este cultivar via FBN.

Decorridos 21 meses de cultivo o conteúdo de N do solo e das raízes foi determinado em 5 repetições. Estas análises revelaram que os vasos plantados perderam entre 7,5 e 12,5 g de N do solo + fertilizante, mas todos acumularam

mais do que isto nos tecidos das plantas. No caso do cultivar CB 47-89, na ausência de vinhaça, as plantas removeram aproximadamente 10 g de N do solo e do fertilizante mas acumularam cerca de 35 g de N.

Em um segundo experimento, cultivares de cana-de-açúcar foram plantados em vasos contendo 100 kg de solo, utilizando-se duas fontes fornecedoras de ^{15}N - matéria orgânica marcada e peletes de gesso - com o objetivo de quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio em diferentes fases da cultura, através da técnica da diluição isotópica de ^{15}N . Foram realizadas colheitas aos 4, 8, 12 e 16 meses de crescimento das plantas. Não houve um bom desenvolvimento das plantas que foi atribuído a problemas de aeração do solo em função de forte compactação, não ocorrendo diferenças significativas no enriquecimento de ^{15}N dos cultivares, sugerindo ter ocorrido contribuição da FBN de mesma magnitude. A matéria orgânica mostrou-se um melhor fornecedor de ^{15}N para a solução do solo, pois permitiu uma marcação do N do solo mais constante para experimentos de longa duração do que os peletes de gesso.

Estes dados constituem a primeira evidência direta de contribuições muito significativas da FBN associada a um cultivar de cana-de-açúcar.

SUMMARY

A nitrogen balance study was performed on four commercial cultivars of sugar cane grown in pots containing 64 kg of soil, with the aim of quantifying possible contributions of plant-associated biological nitrogen fixation (BNF). Stillage waste was added to half of the pots and all treatments were replicated ten times. The pots were situated in the open field and amended with the equivalent of 80 kg N/ha of ¹⁵N labelled urea fertilizer.

After 12 months of growth the plants accumulated between 10 and 24% of the total N in the soil + added fertilizer. In the subsequent 9 months of growth, with no further fertilizer addition, the plants accumulated a further 8.5 to 19,0% of the original soil + fertilizer N. The cultivar CB 47-89 accumulated significantly more nitrogen than any of the other cultivars. This difference was greater in the absence of stillage waste and, in this treatment, the ¹⁵N enrichment of the cultivar CB 47-89 was approximately half of that of the other cultivars, which suggests that there was a contribution of non-labelled N from the air to this cultivar via BNF.

After 21 months of growth the nitrogen content of the soil and roots was determined in 5 of the replicates. These analyses showed that the planted pots lost between 7,5 and 12,5 g of soil + fertilizer N, but all accumulated more

than this in the plant tissue. In the case of CB 47-89, in the absence of stillage waste, the plants removed approximately 10 g of N from the soil and fertilizer, but accumulated 35 g N.

In a second experiment, 3 sugar cane cultivars were planted in pots containing 100 kg of soil, with two different sources of ^{15}N -labelled organic matter and gypsum pellets - with the objective of quantifying the contribution of BNF at different growth stages using the ^{15}N isotope dilution technique. Four harvests were taken after 4, 8, 12 and 16 months of plant growth. The plants grew very poorly due to problems of insufficient aeration of the soil caused by soil compaction. No significant differences between the ^{15}N enrichment of the different cultivars were observed, suggesting that there were no differences between the proportion of N fixed by the different cultivars. The labelled organic matter proved to be the best source of ^{15}N for the soil solution, showing less variability between pots and a much smaller decrease in ^{15}N enrichment with time than the gypsum pellets.

The data constitute the first direct evidence of very significant contributions of plant-associated BNF to a sugar cane cultivar.

RÉSUMÉ

Une étude avec le balancement de nitrogène a été réalisée en quatre cultivares commerciaux de canne à sucre poussés en vases contenant 64 kg de sol, dans le but de quantifier de possibles contribution de la fixation biologique de N (FBN) pour les plantes. Des résidus de la distillation d'alcool ont été additionnés à la moitié des vases et toutes les expérimentations ont été répétées dix fois. Les vases ont été maintenus dans les champs et engraisés avec l'équivalent à 80 kg de N/ha avec un fertilisant d'urée marqué avec 15N.

Après 12 mois de croissance, les plantes ont accumulé entre 10 et 24% du N total du sol + le fertilisant additionné. Pendant les neuf mois suivants de croissance, sans aucune nouvelle addition de fertilisant azoté, les plantes ont accumulé l'équivalent à 8,5 jusqu'à 19% du N original du sol + fertilisant. Le cultivar CB 47-89 a accumulé significativement plus de N que les autres. Cette différence s'est avérée plus grande en l'absence de résidus de distillation d'alcool et, dans cette expérimentation, l'enrichissement de 15N dans le cultivar CB 47-89 a été la moitié de celui des autres cultivar, ce qui suggère une contribution de N non marqué de l'air pour ce cultivar au moyen de la FBN.

Après 21 mois de cultivation, le contenu du N du sol et des racines a été déterminé dans cinq répétitions. Ces analyses ont révélé que les vases plantés ont perdu de 7,5 à 12,5 g de N du sol + fertilisant, mais tous en ont accumulé encore davantage dans les tissus des plantes. Dans le cas du cultivar CB 47-89, en l'absence de résidus de distillation, les plantes ont transporté approximativement 10g de N du sol et du fertilisant mais ont accumulé environ 35 g de N.

Dans une seconde expérimentation, en utilisant deux sources qui ont fourni ^{15}N - matière organique marquée et des pellets de plâtre - les cultivares de canne à sucre ont été plantés dans des vases contenant 100 kg de sol dans le but de quantifier la contribution de fixation biologique de N pendant différentes phases de la culture, au moyen de la technique de la dilution isotopique de ^{15}N . Des cueillettes à 4, 8, 12 et 16 mois de croissance des plantes ont été réalisées. Celles-ci n'ont pas eu un bon développement ce qui a été attribué à des problèmes d'aérage du sol en fonction de la forte compactation; aucune différence significative dans l'enrichissement de ^{15}N des cultivares ne s'est révélée, ce qui suggère qu'il y a eu une contribution de même amplitude de la FBN. La matière organique s'est montrée être un meilleur fournisseur de ^{15}N pour la solution du sol car elle a permis une marcation plus constante du N du sol pour les expérimentations de longue durée que les pellets de plâtre.

Ces données constituent la première évidence directe des contributions très significatives de la FBN associées à un cultivar de canne à sucre.

1. INTRODUÇÃO

A importância do cultivo da cana-de-açúcar no Brasil remonta de séculos passados e se mistura com a história deste País. Tradicionalmente, sempre foi uma cultura de exportação fornecendo açúcar para a Europa, nos primeiros tempos e, mais tarde também para os Estados Unidos da América. No Brasil de hoje, além do atendimento do mercado interno do açúcar, a cultura surge com uma nova vitalidade e importância a partir do desenvolvimento do Programa Nacional do Alcool. Este programa, criado no auge da crise mundial do petróleo, tem como objetivo a substituição de alguns derivados do petróleo pelo etanol produzido através da fermentação e destilação do caldo da cana-de-açúcar. Para atender a estas três finalidades, a saber, exportação de açúcar, açúcar para o mercado interno e produção de etanol,

existe a necessidade de aumento da produtividade da cultura e, expansão da área cultivada elevando, sensivelmente, a importância econômica e social da cultura da cana-de-açúcar.

O Brasil situa-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar com 3,72 milhões de hectares cultivados que produziram, na safra 1984-85, 228 milhões de toneladas de cana fresca (COPERSUCAR, 1985). O consumo de fertilizantes nitrogenados para a produção de cana tem sido da ordem de 150.000 toneladas, tomando-se como base de cálculo, um valor conservador de 40 kg de N aplicados por hectare. O principal fertilizante nitrogenado em uso na cultura é a uréia, derivada do petróleo. De acordo com CARVALHO (1983) este fato tem trazido receios de um futuro instável ao setor canavieiro em função da existência finita do petróleo e das suas reservas já em término. O autor aponta que a pesquisa na área "da adubação orgânica ganha uma importância fundamental e a fixação biológica do nitrogênio aparece com grande realce".

Uma cultura de cana-de-açúcar (cana-planta) retira cerca de 250 kg. de N/ha em uma colheita de 100 toneladas de colmos frescos. (STANFORD e AYRES, 1964; ORLANDO FILHO et al., 1980; SAMPAIO et al., 1984). Deste nitrogênio, cerca de 130 kg são removidos do campo nos colmos e os restantes 120 kg estão nas folhas secas que, nas condições de manejo da cultura no Brasil, são queimadas (SAMPALIO et al., 1984). Na cana-soca o conteúdo de nitrogênio, de uma colheita de 100 toneladas de colmos frescos, é um pouco mais

baixo, em torno de 180 kg de N/ha (ORLANDO FILHO et al., 1980). É evidente que um déficit entre 100 e 200 kg de N/ha ocorre a cada colheita de cana-de-açúcar. Para região Sudeste, as recomendações de fertilizante nitrogenado tem sido de 40 a 80 kg N/ha para cana-planta e 120 a 150 kg N/ha para a cana-soca (ZAMBELLO JR. e AZEREDO, 1983). Por outro lado, a utilização deste nitrogênio adicionado como fertilizante na cultura tem sido relatada como de 27 - 29 % (TAKAHASHI, 1964) a 39 - 47 % (SAMPAIO e SALCEDO, 1987) para cana-planta e primeira soca. Desta forma, o déficit anual de nitrogênio permanece elevado mostrando que o cultivo contínuo de cana-de-açúcar por um período de décadas deveria acabar com as reservas de N do solo, provocando uma queda muito acentuada na produtividade da cana. Porém, este declínio não tem sido observado em solos cultivados com cana por quase um século. Estas observações levaram diversos autores a sugerir que a cana-de-açúcar se beneficia significativamente do suprimento de N através do processo de fixação biológica de nitrogênio associada (DOBEREINER, 1961; RUSCHEL et al., 1978; PURCHASE, 1980; SAMPAIO e SALCEDO, 1987).

Diversos organismos fixadores de nitrogênio tem sido isolados no complexo rizosfera-planta na cultura da cana-de-açúcar, iniciando-se pelo trabalhos de DOBEREINER (1957) que isolou bactérias do gênero Beijerinckia em solos cultivados com cana-de-açúcar em diversos Estados do Brasil. A partir deste trabalho, pelo menos nove diferentes gêneros de organismos diazotróficos já foram descritos como isolados

na cultura da cana, encontrados em diferentes locais (solo, rizosfera, raízes, colmos, folhas verdes e folhas secas), culminando com a mais recente descoberta de Acetobacter nitrocapans por CAVALCANTE e DOBEREINER (1988).

Alguns trabalhos foram realizados com o intuito de evidenciar a FBN associada com a cultura da cana-de-açúcar através da quantificação da sua contribuição na nutrição nitrogenada da cultura. Diferentes técnicas que possibilitam esta quantificação foram utilizadas (DOBEREINER et al., 1972; RUSCHEL et al., 1975; PURCHASE, 1980; RUSCHEL et al., 1981; MATSUI et al., 1981; YADAV e SHARMA, 1983; FREITAS et al., 1984). Porém, infelizmente, nenhum balanço de N foi desenvolvido em experimento de longa duração, uma vez que os trabalhos realizados somente evidenciaram a existência de fixação biológica de nitrogênio associada, mas a quantificação da sua contribuição na nutrição da cana foi apenas estimada.

Desta forma, este trabalho tem por objetivo quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar, em cana-planta e cana-soca, cultivadas em grandes vasos através do uso das técnicas de balanço de nitrogênio total e diluição isotópica de ^{15}N .

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. - Métodos de quantificação da fixação biológica de nitrogênio -

Nos últimos anos tem sido desenvolvidos e adaptados uma série de métodos com o objetivo de estimar a contribuição da fixação biológica associada na nutrição das plantas. As metodologias mais comuns encontradas em uso são: redução de acetileno, balanço de nitrogênio e métodos isotópicos com incorporação de $^{15}\text{N}_2$, diluição isotópica e abundância natural. Com o objetivo de esclarecer o porque da metodologia adotada neste trabalho será exposta uma breve revisão das metodologias, evidenciando as suas características e principais limitações quando se deseja quantificar a fixação biológica do nitrogênio associada.

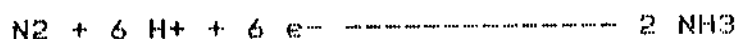
2.1.1.- Método da redução do acetileno -

A enzima nitrogenase é capaz de reduzir outros substratos além do N_2 . Substratos como C_2H_2 , N_2O , H_2 e CN podem sofrer redução na presença da nitrogenase. De acordo com DILWORTH (1966) e SCHOLLHORN e BURRIS (1966) a presença de acetileno (C_2H_2) no meio inibe a redução de N_2 pela nitrogenase, reduzindo-o a etileno (C_2H_4). Esta descoberta resultou em uma nova metodologia para medir a atividade da nitrogenase. Esta metodologia trouxe um novo impulso aos estudos com fixação biológica de N_2 em função de apresentar muitas vantagens analíticas e biológicas, tais como: a) alta sensibilidade de leitura devido à utilização de cromatografia gasosa; b) rapidez na obtenção de dados, uma vez que é uma medida instantânea; c) facilidade de manipulação; d) estabilidade do produto, o que permite a sua estocagem; e) a utilização de equipamentos de fácil transporte e baixo custo e; f) a permissão de análises sem a destruição do material (HARDY et al., 1968; HARDY et al., 1973).

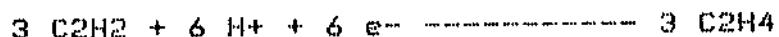
Esta metodologia tem sido empregada tanto em estudos com culturas puras de bactérias como em sistemas aquáticos, em solos e sistemas com plantas diversas (HARDY et al., 1973). Basicamente, o método consiste da introdução de acetileno, numa concentração suficiente para saturar a enzima nitrogenase (aproximadamente 10 % v/v), no sistema onde se deseja medir a sua atividade. Este sistema deverá estar fechado de modo que possibilite a permanência no meio do

etileno evoluído pela atividade da nitrogenase. Em intervalos de tempo pré-estabelecidos são retiradas amostras dos gases do meio e o etileno evoluído é mensurado com grande sensibilidade através de cromatografia gasosa, utilizando-se um detector de ionização de chama com coluna de separação de Porapak (DART et al., 1972).

Em condições naturais, a reação catalizada pela nitrogenase pode ser expressa do seguinte modo:



Quando o substrato para a redução é o acetileno pode-se expressar a reação:



Comparando-se as reações observa-se que, teóricamente, existe uma relação de 3 moles de C_2H_2 reduzido para cada mol de N_2 reduzido. Esta relação é importante em função da necessidade do seu conhecimento para a estimativa da quantidade de N_2 reduzido. Porém, a nitrogenase, quando se encontra reduzindo N_2 , tem parte da sua atividade canalizada para reduzir hidrogênio, o que consome energia e elétrons. Se houver a presença de outra enzima, a Hidrogenase - que oxida H_2 - parte da energia que fora anteriormente desviada pode ser reutilizada para reduzir N_2 (SCHUBERT e EVANS, 1976). Esta evolução do H_2 é inibida quando existe a presença de acetileno no meio, portanto, existe a possibilidade de que as avaliações da atividade da nitrogenase realizadas com acetileno super-estimem a atividade real da enzima.

De acordo com BERGERSEN (1970), o acetileno é cerca de 65 vezes mais solúvel em água que o N₂. Desta forma, em condições alagadas pode ocorrer uma sobre-estimativa da atividade da enzima. Nestas condições alagadas foram encontradas relações de 15 moles de C₂H₂ reduzido para cada mol de N₂ (RICE e PAUL, 1971).

Observa-se, desta forma, que existem fatores capazes de alterar as relações de conversão de acetileno reduzido para N₂ reduzido que podem levar a sobre-estimativas ou sub-estimativas da real capacidade de redução de N₂ pela nitrogenase. Realizando uma revisão de vários estudos específicos sobre estas relações de conversão HARDY et al. (1973) apresentaram os seguintes valores de conversão para diferentes sistemas: 3,6:1 para avaliações da nitrogenase in vitro, 3,9:1 para leguminosas, 3,2:1 para algas cianofíceas, 2,4:1 para não-leguminosas, 4,3:1 para bactérias em cultura pura e 4,3:1 para solos.

O método de redução de acetileno fornece medidas da atividade enzimática momentânea da nitrogenase. Como toda atividade enzimática, o funcionamento da nitrogenase está sujeito a variações cíclicas que podem ocorrer tanto diurno-noturnamente quanto durante o ciclo da cultura (DOBEREINER e DAY, 1976). Isto faz com que as estimativas da quantidade de nitrogênio fixado durante o ciclo de uma cultura baseadas em redução do acetileno, mensurado em alguns momentos durante este ciclo, estejam muito sujeitas a erros (MASTERSON e MURPHY, 1980). Além

disto, não existem evidências de que o nitrogênio fixado na bactéria esteja prontamente disponível para ser absorvido pela planta (OKON et al., 1983).

Para mensurar a atividade da nitrogenase em gramíneas através do método da redução do acetileno, tem sido empregados dois sistemas de avaliação: o sistema de raízes destacadas e o sistema de amostras intactas.

No sistema de raízes extraídas, as raízes da planta em que se deseja conhecer a atividade da nitrogenase são coletadas e colocadas em recipientes que não apresentem ou tenham pequena porosidade. A seguir, as raízes são lavadas com água destilada e o restante do volume do recipiente é completado com água. No laboratório a água é substituída por N_2 , o recipiente é herméticamente fechado e injeta-se 10% (v/v) de acetileno e 1 a 4% de oxigênio (DOBEREINER et al., 1972). Após a injeção dos gases são retiradas amostras a intervalos pré-estabelecidos para avaliar-se a evolução do etileno.

Esta técnica tem sofrido algumas modificações e algumas críticas tem sido apresentadas. Muita controvérsia tem sido observada em função da ocorrência de uma fase latente em que é constatada uma atividade de redução muito baixa. A fase latente é variável e pode alcançar até 18 horas. Após esta fase o etileno é produzido em taxas mais altas (YOSHIDA e ANCAJAS, 1970; DOBEREINER e DAY, 1976). Uma série de hipóteses tem sido levantadas na tentativa de explicar este comportamento. Muitos autores (BARBER et al.,

1976; KOCH, 1977; ESKEW e TING, 1977; OKON et al., 1977; BERKUM e SLOGER, 1979) justificam que durante a fase latente ocorria a multiplicação das bactérias fixadoras de nitrogênio associadas com as raízes, levando a uma sobre-estimativa da atividade da nitrogenase, com o que não concordam SOUTO e DOBEREINER (1984) que não verificaram um aumento significativo da população de Azospirillum durante a fase latente. Anteriormente, DOBEREINER et al.(1972) demonstraram que a existência da fase latente não era devida à presença de acetileno, mas sim ao ajuste da pressão de oxigênio do meio necessário para a atividade da nitrogenase das bactérias.

O sistema intacto de BALANDREAU e DOMMERGUES (1971) para medidas da redução do acetileno "in situ" parece ser mais seguro. Neste sistema um cilindro metálico é enterrado no solo a cerca de 7 centímetros de profundidade em torno da planta. O cilindro e a planta são cobertos com PVC rígido que tem uma válvula de borracha perfurável ao lado onde são injetados os gases e retiradas amostras. O acetileno é injetado (cerca de 5 l) e para a estimativa do volume e verificação de perdas injeta-se o gás propano (inerte). Aguarda-se a difusão do acetileno aos sítios ativos de fixação e o início da liberação do etileno e a intervalos regulares retiram-se amostras para verificar a evolução de etileno. YOSHIDA e SUZUKI (1975), LEE et al.(1977), BODDEY et al.(1978) e BODDEY e AHMAD(1981), utilizaram este sistema em estudos com arroz irrigado. Tem sido bastante utilizado a retirada de amostras em blocos intactos contendo solo e

planta ("soil cores") (DAY et al., 1975; DOBEREINER et al., 1972; WEIER, 1980), que são colocados em sacos plásticos bem vedados onde injetam-se 10 a 12% (v/v) de acetileno.

Os cuidados mais importantes que devem ser observados quando da utilização desta técnica referem-se à não perturbação do sistema que pode reduzir sensivelmente a atividade da nitrogenase (MIRANDA et al., 1982). Em função do enterrio dos cilindros no solo e a sua retirada provoca-se cortes nas raízes e ainda pode levar à compactação do solo criando sítios anaeróbicos ou dificuldades na difusão dos gases, o que afeta as determinações da redução do acetileno. Comparando a atividade da nitrogenase em milho quando a retirada das amostras com cilindros era feita momentos antes da determinação e quando o milho já foi plantado no cilindro, WANI et al. (1983) verificaram atividades de 10 a 23 vezes maiores quando o sistema não foi perturbado. Com um aumento na umidade do solo foi observado um aumento nas taxas de redução de acetileno, fazendo com que a umidade seja mais um fator de variação nos resultados obtidos por este sistema. Em sistemas intactos deve-se ainda observar a possibilidade da existência de cianobactérias na superfície do solo e eliminá-las (BODDEY et al., 1978; FANZERES et al., 1984).

De acordo com YOSHIDA e SUZUKI (1975), pode ocorrer a produção natural de etileno no solo pela ação de plantas, bactérias e fungos em sítios anaeróbicos, independentemente da atividade da nitrogenase. Este etileno produzido em condições de solos bem aerados é imediatamente

oxidado. De acordo com BONT (1976) a presença do acetileno no meio leva à inibição da oxidação do etileno chamado endógeno que passa a acumular no meio, o que pode resultar em erros de avaliação da atividade da redução do acetileno. Para evitar problemas com a presença de etileno endógeno no meio é necessário conhecer a quantidade de etileno endógeno produzido durante o período de incubação, descontando-o da leitura total. NOHRSTEDT (1983) conclui que para se quantificar o etileno endógeno pode-se ter uma testemunha com uma atmosfera de 100 ml de C_2H_2 1-1 com monóxido de carbono adicionado. O monóxido de carbono bloqueia o funcionamento da nitrogenase, portanto o etileno produzido será somente o chamado endógeno. O acetileno é colocado no meio para evitar que o etileno endógeno produzido seja oxidado.

2.1.2.- Métodos isotópicos -

O elemento nitrogênio tem uma série de seis isótopos cujas massas atômicas variam de 12 a 17. Destes isótopos, os de massa 14 e 15 são estáveis e não radioativos. Os demais são radioativos e de meia-vida curta. Devido à estabilidade e não-radioatividade o ^{15}N tem sido frequentemente utilizado em estudos com fixação biológica de nitrogênio, quer na forma gasosa ($^{15}N_2$) quer em formas combinadas (sulfato e nitrato de amônio, uréia marcada, etc.). Nestes estudos são empregadas formas de N enriquecidas com ^{15}N em níveis superiores àqueles em que ele se encontra

na natureza (abundância de ^{15}N no ar = $0,3663 \pm 0,004\%$ de átomos de ^{15}N - JUNK e SVEC, 1958; citado por BREMNER, 1977). Desta forma, o nitrogênio contido em um determinado sistema passa a ter uma marcação (^{15}N em excesso) que permite acompanhar os seus desdobramentos. O sistema marcado pode ser o solo ou a atmosfera em ambiente fechado. Para verificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio tem sido empregados vários métodos utilizando ^{15}N : atmosfera enriquecida com $^{15}\text{N}_2$, diluição isotópica e abundância natural de ^{15}N .

2.1.2.1.- Atmosfera enriquecida com $^{15}\text{N}_2$ -

Este método permite medidas diretas da atividade de redução do N_2 pela nitrogenase. O sistema fixador a ser avaliado é exposto a uma atmosfera contendo $^{15}\text{N}_2$ em excesso em ambiente fechado por um período de tempo que varia de 48 a 72 horas. Se houver fixação de nitrogênio durante este período, o nitrogênio marcado será incorporado ao sistema na forma de aminoácidos e proteínas. Posteriormente o material do sistema em avaliação é analisado por espectrometria de massa obtendo-se os teores de ^{15}N que possibilitam estimar as percentagens de N obtidas pela fixação biológica.

Esta técnica foi utilizada para detectar fixação biológica de nitrogênio em diversas gramíneas: arroz (ITO et al., 1980; YOSHIDA e YONEYAMA, 1980; ESKEW et al., 1981; VENTURA e WATANABE, 1982), sorgo (GILLER et al., 1984),

cana-de-açúcar (RUSCHEL et al., 1975; MATSUI et al., 1981), milho (ELA et al., 1982), forrageiras diversas (De POLLI et al., 1977; OKON et al., 1983; MORRIS et al., 1985).

Apesar de se tratar de um método de medida direta da atividade da nitrogenase e de apresentar resultados de fácil interpretação, tem sido apontadas algumas restrições à sua utilização (RENNIE et al., 1978; DOBEREINER, 1980; KNOWLES, 1980). Como as avaliações são realizadas em ambiente fechado é necessário um controle rigoroso do fluxo de gases ($^{15}\text{N}_2$, CO_2 , O_2), da temperatura, da intensidade luminosa, da umidade, o que não permite que os experimentos com esta técnica sejam prolongados. Desta forma é difícil acompanhar-se todo o ciclo de uma cultura, principalmente culturas de ciclo longo como é o caso da cana-de-açúcar. Um dos problemas mais críticos deste método é o controle dos vazamentos de gases que possam ocorrer. Um vazamento no sistema trará como conseqüências a perda de $^{15}\text{N}_2$ e a entrada de $^{14}\text{N}_2$ do ar que provoca a diluição da atmosfera interna que está enriquecida, fazendo variar o teor de $^{15}\text{N}_2$ durante o desenvolvimento das avaliações, o que não é desejável. Existem evidências mostrando que plantas de arroz submetidas a este sistema começaram a exibir anomalias de comportamento após 4 dias nestas condições controladas (ITO et al., 1980). Outra restrição apontada é o elevado custo do $^{15}\text{N}_2$.

2.1.2.2.- Diluição isotópica de ^{15}N -

Nesta técnica emprega-se uma planta controle "não fixadora de N₂" e a planta fixadora (planta teste) cuja capacidade de fixar nitrogênio deseja-se conhecer. Assume-se que a planta fixadora é capaz de acumular nitrogênio do solo com idêntica relação de N marcado e não marcado que a planta controle não fixadora. Assumindo-se isto, é possível calcular-se a proporção de N derivado da atmosfera na planta teste, através da seguinte expressão:

$$\% \text{ NDF} = \left(1 - \frac{\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta teste}}{\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N em excesso na planta controle}} \right) \cdot 100$$

(McAULIFFE et al., 1958).

Em grande parte dos trabalhos que utilizaram esta técnica adicionou-se ¹⁵N ao solo por intermédio de fertilizante mineral marcado aplicado antes ou no momento do plantio das duas culturas (CHALK, 1985). Com esta forma de aplicação de ¹⁵N ocorre, com o tempo, um declínio no enriquecimento do N mineral do solo que se dá, em geral, em função da entrada do N mineral não marcado através da mineralização da matéria orgânica do solo (BROADBENT e NAKASHIMA, 1965; WITTY, 1983). Conseqüentemente, se a planta teste e a planta controle retirarem diferentes quantidades de N do solo em momentos diferentes elas acumularão nitrogênio derivado do solo com diferente enriquecimento de ¹⁵N. Assim,

é necessário que as plantas teste e controle tenham a mesma capacidade no tempo de retirar N do solo (RENNIE, 1982; RENNIE e RENNIE, 1983; FRIED et al., 1983).

Foi demonstrado por WITTY (1983) que se a velocidade de declínio do enriquecimento de ^{15}N é lenta, as diferenças no enriquecimento de ^{15}N no nitrogênio derivado do solo presente nas culturas são pequenas, mesmo que existam diferenças na capacidade de absorção de N no tempo entre as duas culturas. Esta afirmação responde o porque de diferentes plantas controle apresentarem diferentes estimativas da fixação biológica de N na planta teste quando o enriquecimento de ^{15}N do solo decresce rapidamente durante o crescimento das plantas.

Um dos grandes problemas para aplicar-se esta técnica é, sem dúvida, a dificuldade envolvida na verificação das proposições básicas assumidas pela técnica da diluição isotópica como demonstraram os estudos de WAGNER e ZAPATA (1982), LEDGARD et al. (1985a,b,c). Encontrar-se plantas não fixadoras de N_2 que possam servir como controle para a estimativa da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas tem sido objeto de vários trabalhos (RENNIE, 1982; WAGNER e ZAPATA, 1982; FRIED et al., 1983; WITTY e RITZ, 1984). Destes estudos é possível encontrar uma ou mais plantas testadas que podem funcionar como controle, porém não se pode fazer recomendações generalizadas de que uma planta controle seja sempre um padrão efetivo para qualquer planta fixadora de N_2 . Tanto as taxas de crescimento da planta controle quanto da

planta teste poderão sofrer variações em função de muitos fatores ambientais. Se um solo apresentar uma contínua mudança no enriquecimento de ^{15}N no nitrogênio disponível para a planta é impossível prever qual a planta controle que acumulará N com o mesmo enriquecimento do N derivado do solo na planta teste (BODDEY, 1987). A melhor solução para este problema é reduzir as variações no enriquecimento de ^{15}N no nitrogênio do solo. Com esta finalidade tem sido utilizadas marcações do solo empregando-se matéria orgânica marcada com ^{15}N (HENZELL et al., 1968; BODDEY et al., 1984) e pellets de gesso marcado com ^{15}N (WITTY, 1983; WITTY e RITZ, 1984).

Outra precaução que deve ser observada ao utilizar-se esta técnica é que o enriquecimento de ^{15}N no nitrogênio do solo disponível à planta deve ser de magnitude suficiente para que as diferenças entre enriquecimentos nas diferentes plantas não sejam confundidas com as discriminação isotópica diferencial na retirada do nitrogênio mineral do solo (BODDEY, 1987).

2.1.2.3.- Técnica da abundância natural de ^{15}N -

Em função da discriminação isotópica que ocorre nas transformações físicas, químicas e biológicas sofridas pelo nitrogênio do solo surge um enriquecimento natural de ^{15}N que é detectável quando comparado com o enriquecimento do ar atmosférico (DELWICHE e STEYN, 1970; MARIOTTI et al., 1981; TURNER et al., 1983). Este enriquecimento é pequeno e é

mensurado com um espectrômetro de massa equipado com dois detetores e um sistema de dupla entrada para comparar o enriquecimento da amostra com o enriquecimento de um padrão. A diferença no enriquecimento entre a amostra e o padrão é expresso em unidades de D15N. Se o padrão utilizado for o nitrogênio contido no ar, uma unidade de D15N (1 0/00) equivalerá a 0,0003663 átomos % de 15N.

É possível utilizar-se deste enriquecimento natural para se fazer estimativas da fixação biológica de nitrogênio, desde que o solo apresente altos valores de D15N e que se possua um bom equipamento de espectrometria de massa que possibilite medidas de enriquecimento de 15N contra uma amostra padrão. Para se calcular a % de nitrogênio fixado a equação padrão da diluição isotópica sofre modificações:

$$\%NF = \frac{(\text{átomos } ^{15}\text{N do controle} - \text{átomos } ^{15}\text{N planta teste})}{(\text{átomos } ^{15}\text{N do controle} - B)} \cdot 100$$

(BERGERSEN e TURNER, 1983; SHEARER et al., 1983)

onde % NF é a porcentagem de N derivado da fixação biológica de nitrogênio na planta teste e B é o enriquecimento de 15N da planta teste quando cultivada inteiramente com nitrogênio derivado da fixação biológica (ou seja, em plantas cultivadas em solução nutritiva sem N ou cultivo em areia). Esta equação pode ser expressa na forma de D15N:

(D15N do controle - D15N da planta teste)

$$\%NF = \frac{\text{-----}}{\text{-----}} \cdot 100$$

(D15N do controle - B)

onde os valores são mensurados contra uma amostra padrão de N₂ (normalmente o ar atmosférico). Esta equação permite que ocorra discriminação isotópica durante a fixação de N₂ e a assimilação do nitrogênio atmosférico fixado, e isto está expresso no enriquecimento ocorrido em B que deve ser diferente do enriquecimento do N₂ atmosférico (SHEARER e KOHL, 1986).

Para leguminosas tem sido mensurados valores de B por vários autores (AMARGER et al., 1977; KOHL e SHEARER, 1980; BERGERSEN e TURNER, 1983; SHEARER et al., 1983; BERGERSEN et al., 1985) e todos apresentaram valores menores que 2 ‰. Para os estudos com gramíneas a determinação do valor B torna-se um problema em função da dificuldade de crescimento destas plantas em meio sem nitrogênio mineral.

Observa-se que nesta técnica a proposição básica da diluição isotópica está mantida, ou seja, que as plantas teste e controle acumulem N do solo com o mesmo enriquecimento de 15N.

Ocorrem variações no enriquecimento natural de 15N do solo com o tempo o que pode ocasionar distorções relativas ao padrão diferencial de retirada de N do solo entre a planta teste e o controle (WITTY, 1983). Entretanto, parece que as mudanças no enriquecimento com o tempo são

muito lentas e proporcionalmente de pequena magnitude quando comparadas com o enriquecimento artificial através da adição de fertilizantes contendo ^{15}N .

Os solos apresentam, em geral, gradientes no enriquecimento de ^{15}N à medida que se aumenta a profundidade, o que pode introduzir erros nas estimativas (BLACK e WARING, 1977; STEELE et al., 1981; RENNIE et al., 1976). No entanto, os dados disponíveis sugerem que o enriquecimento do nitrato em profundidade varia menos que o enriquecimento do N total (FEIGIN et al., 1974; RENNIE et al., 1976; KARAMANOS e RENNIE, 1980).

Em recente revisão, SHEARER e KOHL (1986) compararam a metodologia de D^{15}N com outros métodos isotópicos empregados e demonstraram que é uma técnica válida quando se deseja estimar a fixação biológica de N_2 .

2.1.3.- Balanço de nitrogênio -

Esta metodologia de avaliar a dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta-atmosfera consiste no somatório de todos os ganhos e perdas de N pelo sistema. De acordo com KNOWLES (1980) as adições de N ao sistema que devem ser consideradas são: fixação biológica de N_2 (assimbiótica e simbiótica), precipitação pluviométrica (NH_4 , NO_3 , N-orgânico), adição de fertilizantes nitrogenados e de dejetos de animais. As perdas de N do sistema solo-planta a se considerar são: desnitrificação, lixiviação, volatilização de NH_3 , queima, erosão, colheitas e ingestão

por animais. Desta forma, observa-se que a obtenção de um balanço positivo de N em um determinado sistema não representa uma medida direta só da fixação biológica de nitrogênio (APP et al., 1980).

Na utilização deste método a quantificação precisa da dinâmica do nitrogênio no sistema é importante. A facilidade ou dificuldade de se obter bons resultados na quantificação das adições e perdas de N no sistema depende muito de dois fatores: a) do modelo experimental adotado (KNOWLES, 1980) e b) da precisão da metodologia analítica utilizada (APP et al., 1980).

Experimentos de balanço de nitrogênio realizados no campo não tem sido recomendados em função de uma série de dificuldades que podem ocorrer para quantificar-se: pequenas variações na grande reserva de N-orgânico do solo; as perdas de N por lixiviação e; evolução de gases. Outra dificuldade é estabelecer a profundidade real de exploração do solo pelas raízes uma vez que disso depende o volume de solo a ser considerado nos cálculos de balanço de nitrogênio (BROADBENT, 1981). Experimentos de campo podem ser recomendados quando se deseja observar o comportamento do N no sistema solo-planta por longo tempo. Nos experimentos de longa duração as alterações acumulativas do nitrogênio total do solo poderiam ser melhor observadas (BROADBENT, 1981).

A utilização de lisímetros para experimentos de campo elimina ou diminui estes problemas, uma vez que as

plantas passam a crescer em um ambiente confinado pelas paredes dos lisímetros e obrigatoriamente as raízes terão que explorar aquele determinado volume de solo. Entretanto, se o lisímetro não possuir drenagem em profundidade ocorrerá uma região saturada no fundo do lisímetro que criaria um ambiente redutor favorecendo as perdas por desnitrificação. A colocação de drenos no fundo dos lisímetros evita a sua saturação, diminuindo a desnitrificação, porém, pode provocar um fluxo de água artificial mais elevado o que possibilita uma sobre-estimativa da lixiviação de nitrogênio. Por outro lado, torna possível a quantificação do material lixiviado, quando isto é desejável. De acordo com KNOWLES (1980) e BROADBENT (1981) a utilização de lisímetros ainda é o método que mais se aproxima do ambiente natural facilitando as estimativas de balanço de nitrogênio, apesar da perturbação do solo envolvida quando da instalação dos lisímetros.

O tipo mais simples de experimentos com balanço de nitrogênio é aquele realizado em vasos colocados em casa-de-vegetação. Neste caso, as perdas por lixiviação são eliminadas e as plantas, como nos lisímetros tem um crescimento radicular limitado ao volume de solo contido no vaso. Porém, se for um experimento de pequena duração, as pequenas alterações ocorridas no N - total do solo devidas a perdas gasosas ou fixação biológica de nitrogênio serão difíceis de serem mensuradas. Para melhorar a sensibilidade do método, recomenda-se a utilização de uma fonte de

nitrogênio marcado (^{15}N). O balanço deste nitrogênio marcado será bem mais sensível para observar-se pequenas perdas.

2.2.- O processo de fixação biológica do nitrogênio associada a gramíneas -

O maior reservatório de nitrogênio do planeta e a atmosfera que o envolve. Na atmosfera, sob a forma gasosa (N_2), o nitrogênio é abundante, perfazendo cerca de 78% da composição do ar atmosférico. Como um gás, o nitrogênio não pode participar diretamente da nutrição das plantas superiores, onde é requerido em outras formas. É absorvido principalmente nas formas de NH_4 e NO_3 que representam somente 0,04% do total de N existente na biosfera (SODERLUND e ROSSWALL, 1982). Para que ocorra a transformação deste N_2 nas formas assimiláveis de N para as plantas existem duas vias, uma físico-química e outra biológica. Pela via físico-química ocorre ionização do N_2 na atmosfera em função da energia proveniente de descargas elétricas, formando-se nitrato e amônio que são trazidos ao solo pela precipitação pluviométrica. Quantificações realizadas em Campinas (SP) durante um período de dezessete anos mostram que a incorporação de nitrogênio ao solo por este processo variou de 3 a 9 kg $\text{N}\cdot\text{ha}^{-1}\cdot\text{ano}^{-1}$ distribuídos igualmente entre nitrato e amônio (VERDADE e KUPPER, 1955).

A via biológica é a forma predominante de entrada do nitrogênio combinado no sistema e se dá em função de uma redução enzimática do N_2 . Microorganismos

procaridóticos diazotróficos que são autotróficos em relação ao nitrogênio, possuem a enzima nitrogenase que é capaz de reduzir o N_2 (DePOLLI e DOBEREINER, 1980). Estes microorganismos podem ser encontrados em condições de uma simbiose eficiente com as plantas, em associações mutualísticas com plantas ou ainda em vida livre nos solos. Já são conhecidos cerca de 26 gêneros de bactérias capazes de fixar nitrogênio (SPRENT, 1979; POSTGATE, 1981) e vários destes gêneros já foram isolados na rizosfera e em solos cultivados com cana-de-açúcar (RUSCHEL, 1981).

Uma série de fatores propiciam maior atividade da enzima, destacando-se as condições microaerofílicas e o baixo nível de nitrogênio combinado do meio (DOBEREINER e DAY, 1976; EADY et al., 1978) e ainda a presença de compostos orgânicos que serão utilizados como fonte energética (HARDY e HAVELKA, 1976). Em associações com as gramíneas não existe um sistema eficiente para a proteção da enzima contra concentrações elevadas de oxigênio nos sítios de fixação, como ocorre na simbiose com as leguminosas através da leghemoglobina (APPLEBY, 1984). Entretanto, já foi observado que, com Azospirillum (bactéria diazotrófica associada com gramíneas), ocorre um deslocamento ativo da bactéria a sítios de baixa pressão de oxigênio (BARAK et al., 1982).

Quando se avalia a atividade da nitrogenase em condições alagadas tem-se observado frequentemente que ocorre maior atividade nestas áreas do que em áreas menos úmidas (TJEPKEMA e EVANS, 1976). Em solos de áreas não inundadas

observa-se que variações no estado de umidade do solo levam a mudanças significativas na atividade da nitrogenase (WANI et al., 1983; RAO e RAO, 1984). Em condições de umidade elevada, o aumento da atividade da nitrogenase deve estar associada com a criação de microsítios com baixa pressão de oxigênio. Estes microsítios ocorreriam em função da expulsão do ar pela água e ainda pela competição por oxigênio estabelecida entre as raízes de plantas e microorganismos do solo, devido a diminuição da disponibilidade de O_2 (WANI et al., 1983).

Com relação à presença de compostos orgânicos está evidenciado que, em cana-de-açúcar, ocorre exsudação de uma série de polissacarídeos das raízes para o meio, provendo uma fonte de energia para os microorganismos fixadores de nitrogênio que vivem na rizosfera, o que possibilita um estímulo à atividade fixadora (CHILD e KURZ, 1978).

A partir dos anos 60 muitos estudos tem sido desenvolvidos no sentido de se confirmar e quantificar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio associada a gramíneas. Para tanto, todas as técnicas de estudo conhecidas para quantificar este processo tem sido empregadas.

Existem evidências muito fortes de que ocorre fixação de nitrogênio expressiva em gramíneas, principalmente com arroz inundado. Vários estudos de balanço de N realizados no campo demonstram acréscimos de nitrogênio advindo da fixação biológica da ordem de 30-40 kg N.ha⁻¹.cultura⁻¹ (FIRTH et al., 1973; WALCOTT et al., 1977; WATANABE et al., 1977; KOYAMA e APP, 1979). APP et al. (1984) encontraram

balanços de N positivos no campo em áreas plantadas continuamente com arroz inundado com valores de 79 a 103 kg N.ha⁻¹.ano⁻¹.

Através da incorporação de ¹⁵N₂, ITO et al.(1980), YOSHIDA e YONEYAMA (1980) e ESKEW et al.(1981) encontraram evidências conclusivas de acréscimos significativos de nitrogênio via fixação biológica em raízes de arroz inundado.

Com a técnica da diluição isotópica BODDEY et al.(1983) verificaram para Paspalum notatum cv.batatais, crescidos em cilindros de concreto no campo, uma contribuição da FBN de 20 kg N.ha⁻¹.ano⁻¹. BODDEY e VICTORIA (1986) com a mesma técnica observaram contribuições de 30 e 45 kg N.ha⁻¹.ano⁻¹ em Brachiaria humidicola e B.decumbens, respectivamente.

Vários estudos com a técnica da redução do acetileno tem sido realizados com diferentes gramíneas (TJEPKEMA e BURRIS, 1976; NELSON et al.,1976; WEIER et al., 1981; PEREIRA et al.,1981; MIRANDA, 1985) com resultados bastante diversos, uma vez que a técnica limita uma quantificação correta para um ciclo todo. (ver item 2.1.1.).

2.3.- O nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar

Na literatura científica brasileira são raros os trabalhos que abordam a marcha de absorção de nutrientes e acúmulo de matéria seca pela cana-de-açúcar, tanto na

cana-planta quanto nas socas subsequentes. No trabalho de CATANI et al.(1959) estudou-se o acúmulo de matéria seca na cultivar Co 419 em Piracicaba, SP, efetuando-se coletas mensais da parte aérea da cana-planta no período compreendido entre os 6 e 15 meses de crescimento. O experimento foi adubado por ocasião do plantio, empregando-se, por hectare, 40 kg de N, 100 kg de P₂O₅ e 40 kg de K₂O. Coletou-se o material de 4 touceiras completas onde separou-se folhas e colmos e obteve-se o peso seco destas partes. O período de maior acúmulo de matéria seca se deu entre o oitavo e o décimo segundo mês e o maior crescimento percentual ocorreu entre o décimo primeiro e décimo segundo mês.

Posteriormente, neste mesmo trabalho, o material coletado foi analisado e quantificou-se os teores de macronutrientes, estabelecendo-se, assim, a marcha de absorção destes nutrientes. Aos 15 meses, a ordem das quantidades extraídas de macroelementos apresentada pela cana-de-açúcar foi:

$$K > N > Ca > Mg > S > P.$$

Destaca-se que as quantidades extraídas de K e N apresentaram praticamente os mesmos valores e foram cerca de quatro vezes superiores às quantidades extraídas de Ca.

Os teores e quantidades de nitrogênio encontrados nas quatro touceiras de cana no decorrer do experimento estão representados na tabela 1.

Tabela 1 : Variação dos teores e quantidades de N absorvido por 4 touceiras de cana-de-açúcar (Co 419) em função da idade da planta. CATANI et al.(1959)

	Idade da planta em meses								
	7	8	8	10	11	12	13	14	15
%N folhas	1.12	1.10	1.18	0.94	1.12	1.27	1.15	1.29	1.50
%N colmos	0.87	1.05	0.90	0.61	0.46	0.42	0.45	0.49	0.35
Quantidade de									
N absorvida(g)	13.5	17.7	29.5	33.3	37.4	71.0	73.6	81.0	75.6

Observa-se, de maneira geral, um decréscimo nos teores de N nas folhas e colmos com o passar do tempo. No final do ciclo, os autores constataram um pequeno acréscimo no teor de N nas folhas. Em termos quantitativos ocorreu uma diferença muito grande na absorção entre o décimo primeiro e o décimo segundo mês, representando um acréscimo de quase 100% na quantidade de N acumulada.

Utilizando-se os dados apresentados por CATANI et al. (1959) é possível calcular que 100 toneladas de colmos frescos contém cerca de 177 kg de N. Tomando-se como base uma população de 15.000 touceiras de cana em um hectare é possível estimar-se que foram extraídos pelos colmos 269 kg de N/ha.

ORLANDO FILHO et al. (1980) estudaram a absorção de nutrientes pela cana-de-açúcar (cultivar CB 41-76) em três solos do Estado de São Paulo, com amostragens realizadas a cada dois meses a partir do quarto mês ao décimo sexto mês para cana-planta e para cana-soca do quarto mês ao décimo segundo mês. A quantidade de nutrientes extraída pela parte aérea (folhas + colmos) se deu na seguinte ordem:

$$K > N > Ca > Mg > S > P$$

Para os colmos a ordem de quantidades extraídas foi:

$$N > K > Ca > Mg > S > P$$

Em valores absolutos, as quantidades de nitrogênio exigidas pela cana-de-açúcar são elevadas e praticamente se equivalem às quantidades exigidas de K.

Nestes experimentos, os autores verificaram que o acúmulo de matéria seca na cana-planta foi maior nas folhas até o décimo mês de crescimento. A partir do décimo segundo mês até o décimo sexto mês o acúmulo de matéria seca passou a ser maior nos colmos. Foi observado que o período de maior acúmulo de matéria seca ocorreu a partir do décimo mês. Na cana-soca as folhas acumularam mais matéria seca até o sexto mês e, do oitavo até o décimo segundo o acúmulo foi maior nos colmos.

Em todos os solos, a concentração de nitrogênio nas folhas e colmos decresceu em função da idade das plantas. Na cana-planta, aos 16 meses, os teores de N nos colmos variaram de 0,32% a 0,39%, considerando-se os três solos. Nas folhas ocorreu maior variação nos teores de N em função do

solo (0,50 a 0,62%). As quantidades de N extraídas pelos colmos sempre foram crescentes e, aos 16 meses apresentaram valores entre 104 e 115 kg de N/ha. Nas folhas, o acúmulo de N foi crescente até o décimo segundo mês, sofrendo um decréscimo até o décimo sexto mês. No final do ciclo as folhas acumularam quantidades de N que variaram de 70 a 79 kg de N/ha. A quantidade de N extraída pela parte aérea da cana-de-açúcar (cana-planta) variou de 173 a 188 kg de N/ha, que representou o dobro da quantidade fornecida como fertilizante por ocasião do plantio.

Na primeira soca deste experimento a concentração de N nas folhas e colmos decresceu em função da idade. Aos 12 meses os teores de N nos colmos variaram de 0,25 a 0,30% e nas folhas de 0,52 a 0,63%. A quantidade de nitrogênio extraída pela cana-soca pelos colmos variou de 76 a 89 kg de N/ha e nas folhas de 61 a 77 kg de N/ha. A extração total de nitrogênio pela parte aérea da cana-soca (cultivar CB 41-76) ao final de 12 meses foi de 138 a 166 kg de N/ha.

O requerimento interno de N para que se atinjam boas produções de cana-de-açúcar não se apresenta muito bem definido, em função das discrepâncias nos valores encontrados na literatura. Os autores divergem quanto a quantidade de nitrogênio necessária para a produção de 1 tonelada de colmos (peso fresco): 0,54 kg (DILLEWIJN, 1952); 1,32 kg (CATANI et al., 1959); 0,41 - 0,80 kg (GOLDEN, 1961); 0,68 - 0,80 (BARNES, 1964); 0,91 kg (STANFORD e AYRES, 1964); 2,24 kg

(GEUS, 1967); 1,00 kg (ANDREIS, 1975); 0,87 - 1,02 kg (ORLANDO FILHO et al. 1980).

Devido as práticas culturais utilizadas pela grande maioria dos produtores de cana-de-açúcar no Brasil, quais sejam, a queima da cana e do palhico residual, grandes quantidades de nitrogênio deixam de retornar ao solo anualmente. Pelos dados de ORLANDO FILHO et al. (1980) as folhas contém, em média, 75 kg de N em um hectare que se perdem do sistema solo-planta por intermédio da queima. Estes dados são bastante semelhantes aos obtidos por GOLDEN (1961) que estimou uma perda de 70-80 kg de nitrogênio através da queima das folhas e pontas da planta.

A adubação nitrogenada da cana-de-açúcar no Brasil tem despertado muita polêmica desde o início dos estudos com adubação nesta cultura. Hoje, a adubação nitrogenada é uma prática rotineira nas regiões canavieiras, porém, os seus efeitos sobre o rendimento agrícola ainda são bastante discutidos. O porquê das controvérsias existentes quanto à adubação nitrogenada na cana-de-açúcar está bem evidenciado em um trabalho de revisão realizado por AZEREDO et al. (1986) onde é apresentada uma coletânea de resultados de experimentos que procuravam observar a resposta da cana-planta à aplicação de nitrogênio. Foram avaliados 135 experimentos realizados nas regiões Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil. Somente 19% dos 135 ensaios proporcionaram respostas positivas e significativas da aplicação de N sobre a produção da cana-planta. Calculando-se a produção relativa*

Produção sem nitrogênio adicionado

* Produção relativa = ----- .100

Média das produções c/N adicionado

observada nos 135 ensaios verificou-se que 56% dos experimentos apresentaram produções relativas entre 90 e 100% e que em 22% deles a produção de colmos sem adição de nitrogênio foi superior à produção com nitrogênio adicionado (produção relativa > 100%).

Estudando a resposta da cana-planta a doses e fracionamento da aplicação de nitrogênio em 9 locais abrangendo a região Sudeste, AZEREDO et al. (1986) utilizaram doses de até 180 kg de N/ha aplicados: todo no plantio; 1/3 no plantio e 2/3 após 4 meses; 1/3 aos 4 meses e 2/3 aos 8 meses. Apenas dois locais mostraram resposta à aplicação de N quando colocado totalmente no plantio. A resposta máxima ocorreu quando da aplicação de 120 kg de N/ha. Outros autores tem observado que o fracionamento do nitrogênio na cana-planta não influencia a produção de colmos quando comparada com a aplicação de uma só vez (AZEREDO e BOLSANELLO, 1980; ORLANDO FILHO et al., 1977; SAMPAIO et al., 1984; ALVAREZ et al., 1963).

Procurando observar a eficiência da adubação nitrogenada na cana-planta, SAMPAIO et al. (1984) utilizaram uréia marcada com ^{15}N para quantificar o nitrogênio derivado do fertilizante na cultura, em condições de campo. Com tal finalidade, instalaram um experimento utilizando doses de 0 e

60 kg de N/ha, aplicada totalmente no plantio e 2/3 após 3 meses. O material foi coletado aos 3, 6, 11 e 16 meses e analisado para N total e % 15N em excesso nas folhas, colmos e raízes. Verificaram que não houve resposta significativa da cana-planta à adubação nitrogenada com ou sem parcelamento e que a quantidade de N absorvida ao final dos 16 meses correspondeu a 250 kg de N/ha. Do nitrogênio aplicado como fertilizante (60 kg N/ha), somente cerca de 1/3 (23 kg N/ha) foi absorvido pelas plantas, o que representa menos de 10% do N total retirado pela cultura. A absorção do N vindo do fertilizante ocorreu até os 3 meses após a sua aplicação.

Pelos dados apresentados em trabalhos realizados no Brasil, a absorção de nitrogênio pela cana-planta é bastante elevada: 173 a 188 kg de N/ha (ORLANDO FILHO et al., 1980); 250 kg de N/ha (SAMPAIO et al., 1984) e 269 kg de N/ha (CATANI et al., 1959). Para a cana-soca, em função do seu ciclo mais curto (12 meses) a absorção de N mostra-se um pouco menor: 138 a 166 kg de N/ha (ORLANDO FILHO et al., 1980).

As recomendações de aplicação de fertilizante nitrogenado na cana-planta na região Centro-Sul do Brasil efetuadas pelo Planalsucar são baseadas em resultados experimentais em campo onde se observou a resposta à aplicação de nitrogênio. Em função destas observações, não se recomenda a aplicação de fertilizante nitrogenado, ou, no máximo, o emprego de 60 kg de N/ha (ZAMBELLO JR. e AZEREDO, 1983). Tomando-se como base uma eficiência do fertilizante

nitrogenado de 40% (SAMPAIO et al., 1984), a cultura absorveria 24 kg de N/ha vindo do fertilizante. Se, a absorção média de nitrogênio pela cana-planta situar-se em torno de 220 kg de N/ha, o sistema solo deverá contribuir com cerca de 196 kg de N/ha (aproximadamente 90%).

De acordo com ZAMBELLO JÚNIOR e ORLANDO FILHO (1981), a baixa resposta da cana-planta à aplicação de fertilizante nitrogenado poderia ser explicada pela fixação biológica de nitrogênio associada e pela presença de grandes quantidades de N em forma disponível no solo. Para AZEREDO et al. (1981) a presença de grandes quantidades de N disponível no solo por ocasião do plantio da cana pode ocorrer em função das operações de preparo de solo, que aumentam a aeração, criando condições para maior oxidação da matéria orgânica. Como o plantio da cana é realizado, geralmente, no período de janeiro a março, épocas de elevada temperatura e umidade, criam-se condições mais favoráveis para a atividade de microorganismos do solo que decompõem rapidamente os restos de cultura (principalmente as raízes). Esta decomposição do material provoca uma diminuição na relação C/N do solo, proporcionando maior quantidade de N disponível para a cana por ocasião do plantio.

A cana-soca tem apresentado resposta positiva à adubação nitrogenada na região Centro-Sul e o Planalsucar tem recomendado quantidades econômicas de N que variam de 80 a 140 kg de N/ha (AZEREDO et al., 1981). Por ocasião do estabelecimento da soqueira da cana (período de maio a

agosto) ocorre baixa umidade que por vezes se encontra associada com baixas temperaturas afetando a atividade microbiológica, provocando menor decomposição dos restos vegetais. Desta forma, o sistema radicular da cultura anterior, que apresenta alta relação C/N, decompõem-se mais lentamente, fornecendo menores quantidades iniciais de N no solo para a soqueira (AZEREDO et al., 1981). Devido ao desenvolvimento inicial mais rápido da cana-soca, quando comparado com o da cana-planta, ocorre maior exigência em N nos primeiros meses (mais de 50% nos primeiros 6 meses - ORLANDO FILHO et al., 1980). Portanto, é possível supor que qualquer adição de N disponível no solo beneficiará o crescimento da soqueira. Neste período de baixa precipitação e temperatura, a atividade de microorganismos fixadores de nitrogênio poderá sofrer, também, uma redução em função de suas características microaerofílicas.

2.3.1.- Fixação biológica de nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar -

Em função das elevadas quantidades de N exigidas pela cultura da cana-de-açúcar, da verificação de frequentes ausências de resposta da cultura à adição de fertilizantes nitrogenados e do progresso do conhecimento da fixação biológica de nitrogênio associada a gramíneas, vários estudos tem sido conduzidos no sentido de revelar a

contribuição do processo de fixação biológica associada na nutrição nitrogenada da cana-de-açúcar.

Várias técnicas que possibilitam quantificar esta contribuição tem sido utilizadas porém, poucos são os estudos que permitam uma quantificação mais acurada do processo.

2.3.1.1. - Ocorrência de bactérias fixadoras de N₂ na cultura da cana-de-açúcar -

As primeiras constatações da existência de microorganismos fixadores na cultura da cana no Brasil datam de 1957 em trabalho realizado por DOBEREINER (1957) visando observar a ocorrência de bactérias do gênero Beijerinckia em alguns solos de diversos Estados do Brasil. Foi constatado que, em solos plantados com cana-de-açúcar, havia uma população abundante destas bactérias. Em trabalhos subsequentes (DOBEREINER e LEMOS, 1958; DOBEREINER, 1959) foi observado que existia a influência da cana no aumento da população de Beijerinckia do solo, resultados estes que conduziram a outras investigações onde se estudou o desenvolvimento de Beijerinckia em solos até então nunca cultivados com cana (DOBEREINER, 1961). Pelos resultados apresentados, ficou evidente que, após o plantio da cana, ocorreu um aumento bastante significativo no número de bactérias diazotróficas (Beijerinckia) vivendo tanto na rizosfera como no rizoplano. Foi observado, no entanto, que dois meses após o corte da cana ocorreu um decréscimo na

população de Beijerinckia em função de que os efeitos benéficos na rizosfera da cana sobre os microorganismos vem das raízes vivas e não das mortas (após o corte da cana ocorre a renovação do sistema radicular). Em outro experimento verificou-se ocorrer um aumento na população de Beijerinckia no solo a medida que as amostras estudadas se aproximavam da touceira de cana (DOBEREINER et al., 1973).

Em secções de raízes de cana-de-açúcar incubadas em meio originalmente asséptico foram observadas, em microscópio eletrônico as colônias de microorganismos que se desenvolveram após 48 horas e encontrou-se abundância de bactérias do gênero Azotobacter e provavelmente de Azospirillum (ARIAS et al., 1978). O exame de cortes ultrafinos de raízes mostrou bactérias do gênero Spirillum colonizando células epidérmicas. Em 1979, HEGAZI et al. publicaram as investigações realizadas em solos do Egito cultivados com cana-de-açúcar onde efetuaram isolamentos de microorganismos da rizosfera, rizoplano e solo livre de raízes e identificaram a ocorrência de Azotobacter em grande número, Azospirillum, Bacillus e Klebsiella, todos organismos fixadores de N₂.

PURCHASE (1980) em solos da África do Sul observou a presença de Azospirillum na rizosfera de diferentes cultivares de cana e verificou que o tamanho da população presente estaria intimamente associado a determinados cultivares comerciais. Verificando a existência de microorganismos fixadores de N₂ na filosfera de cultivares

de cana-de-açúcar, GRACIOLLI e RUSCHEL (1981) encontraram um grande número de organismos fixadores de N₂, tanto em folhas de plântulas, como em folhas jovens ou folhas secas. De acordo com os autores é possível que Azospirillum brasilense se encontre nos tecidos vasculares das folhas. A presença de microorganismos fixadores de N₂ em folhas secas revela que elas possam contribuir para a manutenção desta microflora quando caem ao chão. As bactérias mais comuns isoladas das folhas foram as do gênero Beijerinckia. Neste mesmo estudo foram isoladas bactérias fixadoras de nitrogênio da rizosfera da cana-de-açúcar identificadas como Azotobacter (mais abundante), Beijerinckia, Clostridium e Bacillus.

Em isolados de colmos e raízes de cana, RENNIE et al.(1982) observaram o desenvolvimento de Enterobacter cloacae, Erwinia herbicola, Klebsiella pneumoniae, Bacillus polymixa e outros não identificados. Em isolados de amostras de campo foram encontrados os mesmos microorganismos.

Procurando isolar bactérias fixadoras de N₂ em diferentes partes da planta de cana-de-açúcar, GRACIOLLI et al.(1983) utilizaram a cultivar NA 56-79 e separaram as raízes, colmos e folhas. Na parte externa da raiz isolaram Enterobacter cloacae, Erwinia herbicola e Azotobacter vinelandii. Nas folhas secas observaram a existência de E. herbicola, A. vinelandii e Derxia gummosa. Nos colmos intermediários encontraram mais bactérias do que nos colmos basais e/apicais, sendo E. herbicola predominante nos colmos

intermediários, enquanto A. vinelandii só foi isolado em colmos apicais.

SELDIN et al.(1984) isolaram e descreveram uma nova espécie de Bacillus, B. azotofixans encontrada em raízes de cana-de-açúcar de diversas regiões do Brasil e Hawaí.

Recentemente, CAVALCANTE e DOBEREINER (1988) descreveram uma nova espécie de bactéria encontrada promovendo fixação de nitrogênio associada à cana-de-açúcar (raízes e colmos). Esta nova bactéria recebeu a denominação de Acetobacter nitrocapans e apresenta características extremamente interessantes. Tem ótimo crescimento em meio com 10% de açúcar e pH 5,5, podendo aceitar meios com até 30% de açúcar e pH 2,5, fixando nitrogênio. Na presença de nitrato no meio (10 mM) é capaz de fixar N₂, possibilitando assim a complementação da adubação nitrogenada com fixação biológica de N₂.

Alguns trabalhos foram desenvolvidos com a cultura de callus de cana-de-açúcar visando observar o comportamento da associação com Azospirillum brasiliense, bactéria fixadora de N₂, inoculada no meio de crescimento dos callus. BERG et al. (1979) verificaram que uma semana após a inoculação a população de Azospirillum ainda era pequena. Na segunda semana já era visível em muitas áreas do callus populações bem maiores, formando uma camada fina sobre o callus de 500 um de espessura. Com o passar do tempo os callus de cana promoveram um abundante crescimento de Azospirillum na sua superfície e dentro dos espaços

intercelulares e este crescimento não provocou uma resposta rápida de defesa da planta. Os callus que cresceram em meio sem nitrogênio permaneceram viáveis por um longo período de tempo na presença de uma grande população de bactérias fixadoras. VASIL et al. (1979) demonstraram que esta associação de callus de cana-de-açúcar com Azospirillum pode ser mantida por 18 meses sem adições de N combinado e que deste tecido diferenciaram-se plantas e brotos novos. BERG et al. (1980) compararam reisolados de Azospirillum brasilense de associações com callus de cana-de-açúcar com as culturas estoque das bactérias que foram inoculadas, e constataram uma atividade da nitrogenase muito superior no material reisolado.

A presença desta gama de microorganismos fixadores de nitrogênio na rizosfera, rizoplano, colmos e filosfera da cana-de-açúcar parece estar associada à exsudação de compostos orgânicos pelas plantas de cana. De acordo com CHILD e KURZ (1978), a indução de altos níveis de atividade fixadora de N₂ em Azospirillum brasilense sob condições associativas com trigo foi totalmente dependente da qualidade dos exsudatos da planta. Em cultura pura as pentoses e ácidos tricarbóxicos foram necessários para induzir altos níveis de atividade da nitrogenase. Em cana-de-açúcar, BURKE et al. (1974) mostraram que ocorre exsudação de uma variedade muito grande de polissacarídeos, e que componentes da parede celular exsudam arabinose (31 %) e

xilose (28 %). A arabinose estimula a fixação de N₂ em A.brasilense (CHILD e KURZ, 1978; BERG et al. 1979).

2.3.1.2.- Técnica da redução do acetileno -

Um dos primeiros dados publicados mostrando uma tentativa de quantificar a fixação biológica de N₂ associada à cana-de-açúcar, utilizando a técnica da redução do acetileno, foram obtidos por DOBEREINER et al.(1972) que verificaram a atividade da nitrogenase nas raízes da cana e no solo da rizosfera após 48 horas de incubação. Usando uma extrapolação de dados com os resultados obtidos, calcularam, para os primeiros 20 cm de solo, valores de 67 kg de N fixado.ha⁻¹.ano⁻¹.

PURCHASE (1990) observou em solos da África do Sul uma atividade da nitrogenase em amostras intactas de solo + raízes (soil core) que permitiram estimar, indiretamente, uma fixação de cerca de 24 kg de N.ha⁻¹.ano⁻¹, concluindo, ainda, que a fixação de nitrogênio é muito menor em solos arenosos do que em argilosos.

As quantificações da fixação de N₂ na cultura da cana-de-açúcar não tem se restringido somente às raízes e solo da rizosfera. PATRIQUIN (1982) observou a atividade da nitrogenase na palhada de cana que permanece sobre o solo após a colheita da cana, quando esta não é queimada. Através da redução do acetileno verificou taxas de redução que variaram de 2 a 155 g de N.ha⁻¹.dia⁻¹; sendo que, as taxas mais elevadas ocorreram durante a estação úmida e as taxas

mais baixas na estação seca ou em restos de cultura mais velhos. Ao adicionar sulfato de amônio ao material ocorreu inibição da fixação de N_2 . A fixação de N_2 associada com a decomposição da palhada e de outros resíduos foi estimada como sendo da ordem de 20 kg de N.ha⁻¹.ano⁻¹.

Por intermédio da técnica da redução do acetileno foram obtidos outros resultados que, apesar de não representarem quantificações da fixação biológica de N_2 associada, permitem esclarecimentos importantes sobre o processo. PATRIQUIN et al. (1980) observaram que organismos fixadores de N_2 eram capazes de serem transmitidos pelos toletes de cana. Utilizando toletes esterilizados superficialmente não verificaram atividade da redução do acetileno antes da brotação das gemas em vermiculita esterilizada. Após a brotação cerca de 1/4 dos toletes já apresentavam redução do acetileno. Concluíram que fixadores de N_2 estão presentes nos colmos de cana em estado latente. O restabelecimento das bactérias nas raízes e solo após a germinação resulta de um ciclo de infecção de significância ampla, uma vez que possibilita a perpetuação da fixação de N_2 quando novos cultivos são estabelecidos.

As quantificações do N_2 fixado pela cana utilizando o método da redução do acetileno são muito pouco acuradas em função de uma série de variáveis já comentadas no ítem 2.2.1.e, para a cana-de-açúcar, as restrições impostas pela técnica são especialmente válidas em função do seu ciclo longo. A maior fonte de erro está associada com a

extrapolação da redução do acetileno obtida em raízes extraídas e pré-incubadas em baixas pO_2 .

2.3.1.3 - Método da incorporação de $^{15}N_2$ -

Com o objetivo de evidenciar diretamente a fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar, RUSCHEL et al. (1975) desenvolveram um experimento no qual plântulas de 90 e 60 dias cultivadas em sacos de polietileno contendo solo foram colocadas em diferentes atmosferas artificiais contendo $^{15}N_2$ em excesso. Para tanto, as plantas foram transferidas para frascos de 1 litro de capacidade com tampa de borracha onde foram aplicados os tratamentos: 1) $pO_2=0,02$; $p^{15}N_2=0,5$ e 2) $pO_2=0,16$; $p^{15}N_2=0,6$ e incubados a 28-21 C (dia-noite) por 30-40 horas.

Verificaram que ocorreu incorporação de ^{15}N na planta da ordem de 1,06 μg $^{15}N/g$ e 21,5 μg $^{15}N/g$ em 40 horas nas pressões $pO_2=0,16$ e $pO_2=0,02$ respectivamente, consideradas, pelos autores, como grandes quantidades de ^{15}N fixado. Observaram também acumulação de ^{15}N nas folhas o que sugere rápida translocação do N fixado sem ocorrer incorporação inicial nos microorganismos ou então a existência de fixação de N nas folhas.

Em outro experimento, RUSCHEL et al. (1981) submeteram plantas de 60 dias a uma atmosfera contendo $^{15}N_2$ em excesso e as colheram 72 horas após. Novamente verificaram enriquecimento de ^{15}N em diferentes partes da planta, aparecendo mais ^{15}N nas raízes e toletes e menos nas folhas.

Observaram também que em tratamento contendo NO_3 em solução ocorreu incorporação de ^{15}N .

Pretendendo desenvolver um método para determinar a fixação de N em cana-de-açúcar sob condições de campo através do suprimento contínuo da atmosfera do solo com nitrogênio gasoso marcado com ^{15}N , MATSUI et al. (1981) utilizaram plantas de 11 meses de idade encerradas em um cilindro metálico cravado no solo antes da realização das avaliações. O experimento foi desenvolvido em um período de 5 dias. Três meses antes de serem submetidas à atmosfera enriquecida com $^{15}\text{N}_2$ as plantas foram adubadas com sulfato de amônio (40 kg/ha). Após o período de exposição ao $^{15}\text{N}_2$ as plantas foram colhidas e separadas em folhas, colmos, raízes e touceira e analisadas para N-total e ^{15}N . Em todo o sistema não foi detectado nenhum enriquecimento de ^{15}N exceto na touceira, porém, foi um acréscimo pequeno.

Um dos problemas apontados pelos autores é que, admitindo-se que haja uma fixação de 100 kg de N/ha em 200 dias, a quantidade de N fixado a ser detectada nos 5 dias do experimento equivaleria a 0,154 g de N, quantidade que poderia estar incluída em erros analíticos ocorrentes na obtenção dos dados. Pode ainda ter ocorrido que o período escolhido para a avaliação (planta com 11 meses) não tenha sido significativo do ponto de vista da FBN para esta cultivar. Outro aspecto a observar é que para 11 meses de idade, a touceira utilizada apresentava uma produção muito baixa de matéria seca, não representativa da cultura.

2.3.1.4.- Técnica da diluição isotópica -

RUSCHEL et al. (1981) cultivaram toletes de cana-de-açúcar com uma gema em solução nutritiva contendo 15N em excesso por um período de 60 dias empregando as doses 0; 3,5 e 14,0 ppm de N-NO₃ marcado. Para detectar fixação biológica de N no tratamento com 0 ppm N realizaram um balanço de N-total no sistema. Neste tratamento verificaram que 19,5 e 17,7% do total das cultivares NA 56-79 e CB 41-76 eram derivados da FBN, respectivamente. Nos tratamentos que receberam 15N utilizaram a técnica da diluição isotópica e estimaram, para os 60 dias de cultivo que 17 a 29% do nitrogênio contido na cana era derivado da FBN. Mais uma vez a existência da FBN foi confirmada, porém os dados não permitem extrapolações para todo o ciclo da cultura, uma vez que o período experimental foi muito curto e as condições de cultivo muito especiais (solução nutritiva).

FREITAS et al. (1984) cultivaram cana-de-açúcar (cv. NA 56-79 e CB 41-76) e isolinhas de soja nodulante e não-nodulante em baldes de 120 kg de solo previamente misturado com matéria orgânica vegetal marcada com 15N. As plantas cresceram por 60 dias e após a colheita foram analisadas para N-total e 15N. Tomando-se a soja não nodulante como planta controle, estimaram, pela técnica da diluição isotópica de 15N, a contribuição da FBN na nutrição da soja nodulante e da cana. A percentagem de nitrogênio fixado neste período foi de 72, 22 e 26% para a soja

nodulante, cultivar NA 56-79 e cultivar CB 41-76, respectivamente. Uma das críticas mais fortes a este estudo é que existe uma grande diferença na disponibilidade de $15N$ no solo para as diferentes espécies em função do sistema radicular mais vigoroso da cana-de-açúcar. Outro problema apresentado nesta comparação deve-se aos ciclos muito diferentes destas culturas. Aos 60 dias, a soja praticamente já completou o seu ciclo vegetativo, enquanto a cana-planta não cumpriu $1/8$ do seu ciclo, possibilitando enormes diferenças quanto à capacidade de absorção de N no tempo.

2.3.1.5.- Balanço de N -

Uma estimativa baseada em um balanço de N em grandes vasos, mais o uso de $D15N$ 0/00 mostrou que 17% do nitrogênio da planta veio da fixação biológica de N (RUSCHEL e VOSE, 1981). O autor observa que o crescimento das plantas de cana não foi satisfatório, sugerindo que esta estimativa deve ser examinada com cautela.

Um balanço de N no campo foi realizado por YADAV e SHARMA (1983) em quatro cultivares de cana-de-açúcar empregando quatro níveis de N (0; 75; 150 e 225 kgN/ha) em cana-planta e cana-soca. O solo utilizado apresentava inicialmente 0,0422% de N -total. Diferentes níveis de N não influenciaram a produtividade da cana-planta, mas na cana soca ocorreu aumento de produtividade com o aumento da quantidade de N aplicada no plantio. O balanço de N na cana-planta foi positivo, representando um acréscimo de N no

sistema que variou de 38 a 88% que pode ter ocorrido devido a FBN. Na cana soca o balanço de N foi sempre negativo ocorrendo uma evidente perda de N do solo ou por lixiviação ou por desnitrificação em função das irrigações realizadas na soca.

Críticas sérias a estes resultados podem ser realizadas uma vez que a metodologia empregada pelos autores não esclarece pontos importantes como a profundidade do solo considerada no estudo, monitoramento das perdas de N do sistema e o sistema de amostragem de solo adotada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Com a finalidade de atingir os objetivos propostos foram conduzidos dois experimentos.

3.1. Experimento 1 - Balanço de N-total e diluição isotópica de ^{15}N .

3.1.1. Material vegetal e de solo -

Neste experimento foram utilizados quatro cultivares comerciais de cana-de-açúcar: dois originários de Campos, RJ (CB 47-89 e CB 47-355); um de Campinas, SP (IAC 52-150) e um do Norte da Argentina (NA 56-79). O material (em toletes de uma gema) foi fornecido pelo PLANALSUCAR (Estação Experimental de Campos, RJ) onde recebeu tratamento térmico e com fungicida.

O material de solo empregado foi a camada de 0 a 30 cm de um Cambissolo Eutrófico de uma área cultivada com cana-de-açúcar por muitos anos na Usina São João em Campos,

RJ, cuja análise com algumas propriedades químicas encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Algumas propriedades químicas do material de solo utilizado (Cambissolo eutrófico) antes da adição de fertilizante.

pH em H ₂ O (1:2.5)	Complexo sortivo					P (1)	N
	meq/100 g		ppm			disponível	total
	Ca	Mg	Al	K	Na	ppm	(%)
5.8	3.0	1.0	0.1	56	44	31	0,081

(1) Extraído com solução aquosa de HCl (0,05 N) e H₂SO₄ (0,025 N).

Cerca de 8 toneladas de material de solo foram transportadas e depositadas em um galpão sem paredes laterais onde permaneceu por duas semanas recebendo movimentação a cada dois dias com a finalidade de obter-se um material secado ao ar. Após este período, o material foi todo passado em peneira de 4 mm de malha. Deste material peneirado pesou-se, para cada vaso, 64 quilos que foram colocados em um tambor-misturador (com capacidade de 200 litros) e homogeneizado vigorosamente. Após a homogeneização o material de solo foi colocado em vasos plásticos de 60 litros de

capacidade e, à medida que cada terço do vaso era completado com solo, foi retirada uma amostra de aproximadamente 400 g, completando-se ao final três amostras de terra de cada vaso.

3.1.2.- Delineamento experimental e sistema de cultivo -

O delineamento experimental adotado foi um fatorial em blocos casualizados consistindo os fatores de cinco tratamentos com planta, dois tratamentos com vinhaça e dez repetições.

3.1.2.1 - Tratamentos com planta -

Os cinco tratamentos com planta consistiram de quatro cultivares comerciais de cana-de-açúcar (CB 47-355, CB 47-89, IAC 52-150 e NA 56-79) e um vaso controle não plantado. Este vaso controle não plantado serviu como um indicativo das perdas ocorridas no sistema solo em função do modelo experimental empregado.

3.1.2.2. - Tratamentos com vinhaça -

Empregou-se dois tratamentos procurando investigar a influência da vinhaça no balanço de nitrogênio na cultura da cana consistindo em vasos que receberam e que não receberam a adição de vinhaça. Foram adicionados por vaso 3,0 litros de vinhaça que continham: 20 g de C; 3,5 g de K; e 0,492 g de N/litro e no momento da aplicação apresentava pH=4,5.

3.1.2.3. - Instalação e cultivo -

Os vasos preparados com 64 kg de material de solo foram dispostos no campo conforme o delineamento proposto, umedecidos até atingir a capacidade máxima de retenção de água. Colocou-se três mini-toletes de cana-de-açúcar com uma gema cada por vaso em 02 de outubro de 1982. Após seis semanas operou-se o desbaste deixando-se somente uma planta. A vinhaça foi adicionada em 22 de dezembro de 1982. Em 06 de janeiro de 1983 adicionou-se 2,65 g de N/vaso na forma de uréia marcada com $15N$ (1,221 átomos % em excesso) em solução aquosa. Os vasos foram mantidos no campo durante o transcorrer do experimento e irrigados pela chuva ou, quando necessário nos períodos secos, através de irrigação artificial. Para evitar o excesso de água nos vasos, estes foram perfurados lateralmente na base, propiciando a drenagem.

3.1.3 - Colheita -

Durante o crescimento das plantas, as folhas senescentes foram removidas um pouco antes de caírem naturalmente. Foram secadas em estufa e armazenadas em sacos de papel. Após doze meses de cultivo, em 16 de outubro de 1983, toda a parte aérea foi colhida e separada em colmos e folhas. Os colmos foram picados em pedaços de 3 - 5 cm para facilitar o processo de secagem. Todo o material (colmos e folhas) foi secado em estufa (65 C durante 96 horas) e pesado. Neste estágio as folhas senescentes foram incorporadas às demais folhas do seu respectivo tratamento.

O material que permaneceu nos vasos no campo rebrotou e o mesmo procedimento de cultivo observado para a cana-planta foi adotado. Em 27 de julho de 1984 toda a parte aérea da cana-soca foi colhida, secada e pesada como anteriormente. Após a colheita da cana-soca os vasos de cinco repetições (blocos) foram escolhidos ao acaso, levados para um galpão e esvaziados. O material de solo foi secado ao ar e passado em peneiras de 4 mm de malha. As raízes foram separadas e lavadas para tirar o excesso de solo com água comum e depois com água destilada. Em seguida, foram levadas à estufa para secar (65 C por 72 horas). O solo de cada vaso foi colocado no tambor-misturador, homogeneizado, retirando-se três amostras de terra (400 g cada) por vaso, como feito anteriormente.

3.1.4. - Métodos de determinação -

3.1.4.1. - Amostragem e preparo de amostras -

3.1.4.1.1. - Material vegetal -

Todo o material vegetal da cana-planta como da cana-soca (folhas e colmos) foi moído em um moinho mais grosseiro (malha 1.5 mm) e em seguida em um moinho com malha de 0,42 mm. Após a moagem o material foi colocado dentro de grandes sacos plásticos, homogeneizado intensamente, tirando-se uma amostra de cerca de 20 g que foi acondicionada em sacos de papel parafinado e reservado para análise.

3.1.4.1.2. - Material de solo -

As amostras de terra coletadas (três no início e três no final do experimento) de cada vaso após secadas ao ar foram moídas em moinho de disco, obtendo-se partículas com diâmetros menores que 0,25 mm.

3.1.4.2. - Determinação de nitrogênio total -

3.1.4.2.1. - Material vegetal -

Foram tomadas sub-amostras de 200 mg de material vegetal moído e analisados para nitrogênio total usando-se o método proposto por LIAO (1981). Este método indica um pré-tratamento da amostra com liga de Devarda que inclui todo o nitrato presente na amostra, melhorando a recuperação de nitrogênio quando comparado com o método de BREMNER (1965) (LOUREIRO, 1985). A digestão do material foi realizada em bloco digestor de alumínio com capacidade de 40 tubos, onde, 36 foram usados com doze amostras em triplicata, 2 para uma amostra padrão de material vegetal (0,465 % de N) e 2 brancos. Os padrões foram incluídos para monitorar e corrigir qualquer variação nos resultados existentes entre blocos de digestão como sugerido por APP et al. (1980). Após a digestão, quando o material encontrava-se frio, o digerido foi transferido para frasco de 150 ml com fundo arredondado e destilado por arraste de vapor com captura de amônia em solução indicadora de ácido bórico, usando o equipamento e o procedimento descrito por BREMNER e EDWARDS (1965). A solução resultante foi titulada com ácido sulfúrico com concentração

variando de 0,005 a 0,01 N padronizado com TRIS (KEENEY e NELSON, 1982) usando uma bureta de pistão METROHM.

As soluções de sulfato de amônio (mais ácido bórico e indicador) resultantes da titulação das amostras de material vegetal foram acidificadas com H₂SO₄ 0,005-0,01N e as amostras levadas para a estufa (80 C) para evaporação.

3.1.4.2.2. - Material de solo -

Tomou-se sub-amostras de 1000 mg de material de solo e analisou-se conforme o procedimento adotado para o material vegetal. Para cada amostra de terra foram feitas duas repetições resultando em seis determinações por vaso. As amostras de material de solo iniciais e finais do mesmo vaso foram analisadas ao mesmo tempo no mesmo bloco de digestão para prevenir qualquer erro devido à variações entre blocos de digestão.

3.1.4.3. - Determinação da concentração isotópica de ¹⁵N (% de átomos) -

O resíduo obtido da evaporação da solução resultante da titulação com H₂SO₄ do material vegetal foi colocado em frascos de vidro, lacrado e enviado ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, SP. O enriquecimento de ¹⁵N no material foi determinado no N₂ liberado destas amostras como descrito por BODDET et al. (1983) em espectrômetro de massa Atlas-Varian modelo CH-4.

3.2. - Experimento 2 - Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada à cana-de-açúcar através da técnica da diluição isotópica de ^{15}N - ontogenia.

3.2.1. - Material vegetal e de solo -

Utilizou-se três cultivares comerciais de cana-de-açúcar: CB 47-89, IAC 52-150 e NA 56-79. O material foi fornecido pela Estação Experimental de Cana-de-Açúcar de Campos, RJ pertencente ao PLANALSUCAR em mini-toletes de uma gema tratados termicamente e com fungicida.

O material de solo foi proveniente do Centro Tecnológico COPERSUCAR em Piracicaba, SP, constituindo-se da camada de 0 a 30 cm de um Podzólico Vermelho-Amarelo variação Piracicaba de uma área cultivada com cana-de-açúcar. A análise deste material contendo algumas propriedades químicas está na Tabela 3.

Em torno de dez toneladas de material de solo foram transportados e depositados em uma área cimentada limpa e espalhado em uma camada fina para secagem ao ar. Durante cerca de duas semanas o material sofreu revolvimento periódico sendo coberto com lona plástica durante a noite ou em dias chuvosos. Depois de secado não foi necessário o peneiramento do material pois apresentava agregados menores que 4 mm. Em seguida, a terra foi colocada (com auxílio de pá carregadeira) no interior de um caminhão betoneira onde sofreu homogeneização. Após a homogeneização foi colocado em

vasos que consistiram de tambores de metal cortados ao meio. Os tambores foram previamente lavados e pintados internamente com material anticorrosivo (Neutrol). Adicionou-se 100 quilos de material de solo por vaso.

Tabela 3 - Algumas propriedades químicas do material de solo utilizado no experimento antes da adição de fertilizante.

pH em H ₂ O (1:2,5)	Complexo sortivo				P (1)	N
	meq/100 g		ppm		disponível	total
	Ca	Mg	Al	K	ppm	(%)
5,1	1,7	1,1	0,8	42	7	0,0675

(1) Extraído com solução aquosa de HCl (0,05N) e H₂SO₄ (0,025N).

3.2.2. - Delineamento experimental e sistema de cultivo -

O delineamento experimental utilizado foi um fatorial em blocos casualizados compreendendo os fatores: três tratamentos com plantas, dois tratamentos com material fornecedor de 15N, quatro épocas de colheita e cinco repetições.

3.2.2.1. - Tratamentos com plantas -

Foram empregados três cultivares de cana-de-açúcar: CB 47-89, IAC 52-150 e NA 56-79. Dos cultivares CB 47-89 e IAC 52-150 foram plantados vasos em número suficiente para que a cada 4 meses fosse possível colher-se a parte aérea do material vegetal. O cultivar NA 56-79 foi colhido somente ao final do experimento, aos dezesseis meses.

3.2.2.2.- Tratamentos com material fornecedor de ^{15}N -

Como fornecedor de ^{15}N utilizou-se de peletes de gesso que promovem liberação lenta de ^{15}N ou matéria orgânica marcada. Os peletes foram produzidos misturando-se 50 ml de uma solução aquosa de 5% de KNO_3 marcado (18,3 átomos % de ^{15}N) com 100 g de gesso em uma forma metálica que gerou peletes cúbicos de aproximadamente 7,5 mm de lado. Em cada vaso deste tratamento adicionou-se 150 g de peletes. A matéria orgânica utilizada foi um material vegetal marcado com ^{15}N retirado de um experimento com cana-de-açúcar realizado no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, SP, que gentilmente cedeu o material. O material constituía-se de folhas e principalmente colmos de cana-de-açúcar. Foi secado em estufa e moído (< 1 mm). O conteúdo médio de N no material foi de 0,432% marcado com 0,845 átomos % de ^{15}N . Em cada vaso adicionou-se 1,50 quilos de matéria orgânica marcada.

3.2.2.3.- Épocas de colheita -

Para os cultivares CB 47-89 e IAC 52-150 foram realizadas quatro colheitas espaçadas de aproximadamente quatro meses em: 18/12/85, 23/04/86, 19/08/86 e 06/01/87. O cultivar NA 56-79 foi colhido somente ao final dos 16 meses em 06/01/87.

3.2.2.4.- Instalação e cultivo -

Em função da baixa fertilidade natural do material de solo aplicou-se em cada vaso 50 g de calcário dolomítico (1 ton/ha), 7,5 g P205 (150 kg P205/ha), 7,5 g K20 (150 kg K20/ha) e 2 g FTE (40 kg FTE/ha). O calcário foi aplicado por ocasião da homogeneização do material de solo com o uso do caminhão betoneira. Para adicionar os fertilizantes e os peletes de gesso ou matéria orgânica marcada, o material de solo de cada vaso foi transferido para um tambor-misturador (capacidade de 200 litros) e vigorosamente homogeneizado juntamente com os materiais adicionados.

Os vasos foram dispostos no campo de acordo com o delineamento experimental proposto e umedecidos até atingirem a capacidade máxima de retenção de água. Em 19 de agosto de 1985 foram plantados 5 mini-toletes em cada vaso. Após 5 semanas procedeu-se o desbaste deixando-se somente a melhor planta.

Durante o período experimental os vasos foram irrigados naturalmente com água da chuva ou artificialmente em períodos mais secos. Na tentativa de evitar excesso de

água no fundo dos vasos foram providenciadas aberturas laterais na parte inferior dos vasos.

3.2.3. - Colheitas -

Durante o crescimento das plantas, as folhas senescentes foram removidas, secadas em estufa e pesadas.

A cada quatro meses, nas datas estabelecidas, o material da parte aérea dos tratamentos contendo os cultivares CB 47-89 e IAC 52-150 foi colhido. Separou-se folhas e colmos e os colmos foram picados em pedaços de aproximadamente 5 cm. O material foi secado em estufa (65 C durante 96 horas) e pesado. As folhas senescentes foram incorporadas ao restante do material nesse momento.

3.2.4. - Métodos de determinação -

3.2.4.1.- Amostragem e preparo de amostra -

Adotou-se o mesmo procedimento usado no item 3.1.4.1.1.

3.2.4.2.- Determinação de nitrogênio total -

Conforme descrito no item 3.1.4.2.1.

3.2.4.3.- Determinação da concentração isotópica de ^{15}N (% de átomos) -

O resíduo obtido da evaporação da solução resultante da titulação com H_2SO_4 do material vegetal da primeira colheita foi colocado em frascos de vidro, lacrado e

enviado ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA). O enriquecimento de ^{15}N no material foi determinado como descrito por BODDEY et al. (1983) em espectrômetro de massa Atlas-Varian modelo CH-4.

Os materiais das demais colheitas foram analisados na Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS), EMBRAPA, Itaguaí, em espectrômetro de massa VG 900 (VG - Isogas, Middlewich, Inglaterra) segundo os procedimentos descritos por URQUIAGA et al. (1988).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.- Experimento 1 - Balanço de N-total e diluição isotópica de ^{15}N -

4.1.1. - Produção de matéria seca -

4.1.1.1. - Primeira colheita - cana-planta -

A secagem, o peneiramento e a homogeneização a que foi submetido o solo utilizado nos vasos do experimento promoveram o estímulo da mineralização do nitrogênio do solo. Isto permitiu que as plantas se apresentassem verde-escuras no seu estágio inicial de crescimento, não mostrando sintomas de deficiência de nitrogênio mesmo antes da adição de uréia marcada com ^{15}N em 06 de janeiro de 1983.

A brotação dos mini-toletes adicionados aos vasos não se deu uniformemente e foi um pouco lenta em função

do tratamento térmico a que foram submetidas e a uma queda na temperatura ambiente nas primeiras semanas após o plantio. Por ocasião do desbaste para se deixar uma só planta, mesmo os toletes que não brotaram foram retirados dos vasos para não afetarem o balanço final do nitrogênio.

Após a adição do fertilizante marcado as plantas continuaram a ter um crescimento vigoroso e acumularam entre 1400 e 2600 g de matéria seca por vaso num período de 12 meses após o plantio, como se verifica na Tabela 4. Como era de se esperar, devido à época da realização da colheita (12 meses), observa-se um acúmulo maior de matéria seca nos colmos. As diferenças obtidas no acúmulo de matéria seca em toda a planta foram altamente significativas, destacando-se das demais o cultivar CB 47-89 (no tratamento sem adição de vinhaça) que produziu cerca de 60% a mais de matéria seca.

A adição de vinhaça aos vasos (realizada em 22 de dezembro de 1982) precedeu a aplicação de fertilizante nitrogenado, uma vez que, em função das modificações físico-químicas provocadas no meio por esta substância, poderiam ocorrer perdas de N do fertilizante (AMARAL SOBRINHO et al., 1983; AMARAL SOBRINHO et al., 1987).

A vinhaça provocou um efeito negativo severo no desenvolvimento das plantas por cerca de 2 a 3 semanas. Progressivamente este efeito foi sendo diluído e as plantas recuperaram o desenvolvimento, tanto que não ocorreram

TABELA 4. Efeito da vinhaça na produção de matéria seca de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 Kg de solo. Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições.

TRATAMENTO	CULTIVAR	PESO DA MATÉRIA SECA (g/vaso)		
		COLMOS	FOLHAS	PLANTA TODA
Com Vinhaça	CB 47-89	748	715	1463
	CB 47-355	806	621	1427
	IAC 52-150	994	664	1658
	NA 56-79	1207	549	1756
Sem Vinhaça	CB 47-89	1420	1164	2584
	CB 47-355	857	596	1453
	IAC 52-150	896	617	1513
	NA 56-79	994	484	1478
D.M.S. (TUKEY P= 0,05)		457	267	677
Análise de variância				
VINHAÇA		2,0NS	3,4NS	3,1NS
CULTIVAR		3,0*	18,6***	5,1**
INTERAÇÃO		7,3***	8,5***	9,2***
Coeficiente de variação(%)		32,9	28,2	29,0

N.S.- diferenças não significativas entre médias a P= 0,05

* - diferenças significativas entre médias a P < 0,05

** - diferenças significativas entre médias a P < 0,01

*** - diferenças significativas entre médias a P < 0,001

diferenças significativas no acúmulo de matéria seca quando comparados os dois tratamentos.

4.1.1.2. - Segunda colheita - cana-soca -

A Tabela 5 mostra os dados de acúmulo de matéria seca da cana-soca colhida nove meses após a primeira colheita. Quando se projetou o experimento, a colheita da cana-soca estava programada para doze meses após a da cana-planta, procurando simular o que ocorre na prática da cultura no Brasil. Esta colheita teve que ser antecipada em função do crescimento vigoroso apresentado pelas plantas, provocando o tombamento e rachamento de alguns vasos com os ventos fortes comuns no período de inverno. Portanto, apesar do fato de que nenhuma adição de nitrogênio via fertilizante ou vinhaça tenha sido realizada na cana-soca, o desenvolvimento das plantas foi notadamente superior ao desenvolvimento da cana-planta (cerca de 25% a mais de matéria seca em nove meses). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em termos de acúmulo total de matéria seca.

Observa-se que a variabilidade (coeficiente de variação) foi muito maior na segunda do que na primeira colheita. Isto se deu principalmente pela brotação muito desigual da cana-soca, causando grandes diferenças no número de perfilhos entre repetições de plantas do mesmo cultivar. Mesmo com esta alta variabilidade, o acúmulo de matéria seca das folhas do cultivar CP 47-99 (tratamento sem adição de

TABELA 5. Efeito da vinhaça na produção de matéria seca de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos com tendo 64 Kg de solo. Segunda colheita aos 9 meses de idade. Médias de 10 repetições.

TRATAMENTO	CULTIVAR	PESO DA MATÉRIA SECA (g/vaso)		
		COLMOS	FOLHAS	PLANTA TODA
Com Vinhaça	CB 47 - 89	1167	1052	2220
	CB 47 - 355	1044	825	1869
	IAC 52 - 150	1047	730	1777
	NA 56 - 79	1699	847	2547
Sem Vinhaça	CB 47 - 89	1712	1215	2927
	CB 47 - 355	1213	832	2045
	IAC 52 - 150	1039	711	1750
	NA 56 - 79	1060	584	1644
D.M.S (TUKEY P=0,05)		1120	614	1692
Análise de variância				
VINHAÇA		0,1NS	0,1NS	0,1NS
CULTIVAR		1,2NS	4,0*	1,6NS
INTERAÇÃO		1,9NS	0,8NS	1,6NS
Coeficiente de variação(%)		64,0	51,5	57,5

N.S.- diferenças não significativas entre médias a P = 0,05

* .- diferenças significativas entre médias a P < 0,05

** .- diferenças significativas entre médias a P < 0,01

***.- diferenças significativas entre médias a P < 0,001

vinhaca) foi significativamente maior. Apesar de não significativo, este cultivar apresentou a maior produção de matéria seca total.

Mesmo com a colheita antecipada (nove meses), os colmos apresentaram maior acúmulo de matéria seca.

4.1.2. - Acúmulo de N-total -

4.1.2.1. - Primeira colheita - cana-planta -

As análises de N-total nos colmos e folhas foram processadas de modo que as repetições de uma mesma amostra que apresentaram erro padrão da média superior a 3% foram descartadas e a amostra novamente analisada. Com este procedimento procurou-se minimizar os possíveis erros analíticos na determinação do nitrogênio acumulado pelas plantas.

Após doze meses de cultivo verificou-se diferenças altamente significativas entre os cultivares no acúmulo de N-total nas folhas e colmos e na porcentagem de nitrogênio, indicando diferenças entre eles na sua capacidade de obter nitrogênio (Tabela 6). Os colmos, como órgãos de reserva de carboidratos na planta de cana-de-açúcar, apresentaram menor porcentagem e menor acúmulo de nitrogênio total do que as folhas.

As porcentagens de nitrogênio encontradas nas folhas e colmos representam valores bastante próximos

TABELA 6. Efeito da vinhaça no acúmulo de N- total de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 Kg de solo. Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições.

TRATAMENTO	CULTIVAR	% N		N-Total (g/Vaso)		
		Colmos	Folhas	Colmos	Folhas	Planta Toda
Com Vinhaça	CB 47-89	0,310	0,673	2,45	4,85	7,31
	CB 47-355	0,297	0,647	2,42	4,06	6,49
	IAC 52-150	0,244	0,561	2,39	3,69	6,08
	NA 56-79	0,263	0,630	3,30	3,47	6,78
Sem Vinhaça	CB 47-89	0,390	0,685	5,47	8,12	13,59
	CB 47-355	0,302	0,667	2,73	4,04	6,77
	IAC 52-150	0,285	0,601	2,62	3,78	6,41
	NA 56-79	0,238	0,653	2,40	3,17	5,56
D.M.S.(TUKEY P=0,05)		0,126	0,138	2,15	2,25	4,06
Análise de Variância				Valores F		
VINHAÇA		1,6NS	1,2NS	3,7NS	4,5*	4,8*
CULTIVAR		4,8**	3,7*	3,9*	15,8***	10,2***
INTERAÇÃO		1,3NS	0,1NS	5,9**	5,5**	6,6***
Coeficiente de variação(%)		30,1	15,4	51,5	36,4	39,2

NS-diferenças não significativas entre médias a $p = 0,05$

* -diferenças significativas entre médias a $P < 0,05$

**-diferenças significativas entre médias a $P < 0,01$

***-diferenças significativas entre médias a $P < 0,001$

daqueles encontrados por ORLANDO FILHO et al. (1980), em um estudo de campo.

O cultivar CB 47-89 na ausência de vinhaça acumulou mais do que o dobro de nitrogênio que os outros cultivares. O nitrogênio acumulado pelo cultivar CB 47-89 neste tratamento representou uma retirada de N equivalente a mais de 24% de todo o nitrogênio existente no vaso no início do experimento (53 g de N do solo mais 2,65 g de N aplicado como fertilizante uréia). Parece improvável que esta alta proporção do nitrogênio total do solo possa tornar-se disponível para a planta em um ano e isto sugere que deve ter havido uma contribuição de nitrogênio via fixação biológica ou outro processo como adição de N via precipitação pluviométrica. De acordo com SAMPAIO e SALCEDO (1987), em experimento de campo que envolveu quatro cortes de cana-de-açúcar, a retirada média anual de nitrogênio do solo pela cultura seria de 4%, valor já considerado muito alto pelos autores. Por outro lado, este cultivar (CB 47-89) pode ser muito mais eficiente que os demais em extrair o nitrogênio do solo e do fertilizante.

Apesar dos efeitos da vinhaça não se revelarem significativos, o acúmulo de N total e as porcentagens de N apresentaram-se um pouco inferiores na presença de vinhaça.

4.1.2.2. - Segunda colheita - cana-soca -

A Tabela 7 apresenta os resultados da porcentagem e acúmulo de N-total encontrados na cana-soca. A

TABELA 7. Efeito da vinhaça no acúmulo de N- total de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vasos contendo 64 Kg de solo na segunda colheita aos 9 meses de idade e no somatório da primeira e segunda colheita. Médias de 10 repetições.

TRATAMENTO	CULTIVAR	% N		N-total (g/ vaso)				
		COLMOS	FOLHAS	COLMOS	FOLHAS	PLANTA TODA	PLANTA TODA COLHEITA 1+2	
Com Vinhaça	CB 47 -89	0,277	0,383	3,52	3,91	7,43	14,74	
	CB 47 -355	0,247	0,404	2,75	3,33	6,08	12,57	
	IAC 52 -150	0,224	0,408	2,58	3,04	5,62	11,70	
	NA 56 -79	0,238	0,373	4,10	3,03	7,13	13,91	
Sem Vinhaça	CB 47 -89	0,319	0,392	5,95	4,72	10,67	23,80	
	CB 47 -355	0,229	0,387	3,44	3,30	6,75	13,52	
	IAC 52 -150	0,209	0,349	2,29	2,45	4,74	11,35	
	NA 56 -79	0,225	0,382	2,68	2,15	4,84	10,40	
D.M.S(TUKEY P= 0,05)		0,096	0,076	3,75	2,38	6,00	8,92	
Análise de variância								
VINHAÇA		0,1NS	1,4NS	0,4NS	0,2NS	0,1NS	1,2NS	
CULTIVAR		5,5**	0,5NS	2,6NS	4,2**	3,0*	6,3***	
INTERAÇÃO		0,9NS	1,8NS	1,9NS	1,0NS	1,5NS	3,6*	
Coeficiente de variação								
		(%)	27,9	27,9	78,2	52,3	64,0	45,4

N.S.- diferenças não significativas entre médias a P = 0,05
 * .- diferenças significativas entre médias a P < 0,05
 ** .- diferenças significativas entre médias a P < 0,01
 ***.- diferenças significativas entre médias a P < 0,001

porcentagens de N observadas nos colmos concordam com aquelas obtidas por ORLANDO FILHO et al. (1980) porém, para as folhas as porcentagens encontradas neste experimento são um pouco inferiores. A concentração de nitrogênio nas plantas nesta colheita foi consideravelmente menor do que na primeira colheita, mas como ocorre no campo, as socas possuem, invariavelmente, um conteúdo menor de N do que a cana-planta (ORLANDO FILHO et al., 1980).

Na ausência de vinhaça o acúmulo de nitrogênio pelo cultivar CB 47-89 continuou a ser o dobro dos demais cultivares que acumularam quase tanto nitrogênio quanto na primeira colheita.

4.1.2.3.- Soma das colheitas -

A quantidade de nitrogênio acumulado pelos cultivares de cana-de-açúcar durante todo o período de experimentação (21 meses) encontra-se representado na Tabela 7. Neste período, o cultivar CB 47-89 acumulou significativamente mais nitrogênio que os demais cultivares na ausência de vinhaça. Nos vasos onde ocorreu a presença de vinhaça o acúmulo de N por este cultivar foi também o maior, porém, a diferença com os demais foi menos pronunciada.

O nitrogênio acumulado pelas plantas ao final dos 21 meses de cultivo variou de 19 a 43% do nitrogênio total do solo + fertilizante + vinhaça, que são valores extremamente elevados quando comparados com os obtidos por

SAMPAIO e SALCEDO (1987) - 11% do nitrogênio total do solo em duas colheitas (cana-planta e primeira soca).

4.1.3.- Diluição isotópica e recuperação de ^{15}N -

4.1.3.1.- Primeira colheita - cana-planta -

Os dados de enriquecimento de ^{15}N revelaram que até a primeira colheita, no máximo 31% do ^{15}N em excesso aplicado (22,7 mg ^{15}N em excesso/vaso) foi recuperado na parte aérea das plantas (Tabela 8).

O cultivar CB 47-89 recuperou entre 27 e 41% mais nitrogênio marcado do que os outros três cultivares. Esta diferença foi muito menor do que a diferença no acúmulo de N total, resultando, nos vasos sem adição de vinhaça, em um enriquecimento de ^{15}N no cultivar CB 47-89 pouco maior do que a metade do enriquecimento dos outros cultivares neste tratamento. Se for assumido que a diferença no enriquecimento de ^{15}N entre os cultivares foi devida inteiramente à fixação biológica de nitrogênio, então a contribuição da FBN na nutrição nitrogenada do cultivar CB 47-89 foi da ordem de 45% do nitrogênio total da planta. Entretanto, como o fertilizante marcado foi adicionado em uma forma solúvel, é esperado que a marcação com ^{15}N do nitrogênio do solo disponível à planta tenha declinado rapidamente (WITTY, 1983). Se o cultivar CB 47-89 foi capaz de explorar mais tardiamente o nitrogênio do solo do que os outros cultivares, então a marcação com ^{15}N do nitrogênio disponível do solo

TABELA 8. Efeito da vinhaça no enriquecimento de ^{15}N de quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas em vaso de 64 Kg de solo adubado com uréia marcada com ^{15}N . Primeira colheita aos 12 meses de idade. Médias de 10 repetições.

TRATAMETO	CULTIVAR	ÁTOMOS % ^{15}N			RECUPERAÇÃO DE N MARCADO
		COLMOS	FOLHAS	PLANTA TODA (a)	NA PARTE AÉREA DA PLANTA (mg ^{15}N em excesso/vaso)
Com Vinhaça	CB 47 - 89	0,0680	0,0920	0,0825	5,26
	CB 47 - 355	0,0573	0,0748	0,0689	4,12
	IAC 52 - 150	0,0773	0,1115	0,0990	5,66
	NA 56 - 79	0,0644	0,0902	0,0719	4,52
Sem Vinhaça	CB 47 - 89	0,0425	0,0677	0,0586	7,15
	CB 47 - 355	0,0735	0,1238	0,1015	5,05
	IAC 52 - 150	0,1027	0,1178	0,1097	5,61
	NA 56 - 79	0,0877	0,1147	0,1047	5,32
D.M.S(TUKEY P=0,05)		0,0661	0,0732	0,0624	1,82
Análise de variância					
VINHAÇA		1,3NS	1,4NS	1,7NS	9,5**
CULTIVAR		1,9NS	1,5NS	2,0NS	6,3***
INTERAÇÃO		1,5NS	1,8NS	1,8NS	1,9NS
Coeficiente de variação(%)		66,8	52,6	51,0	24,3

(a) Média ponderada = $\frac{\text{Recuperação de } ^{15}\text{N em excesso na planta toda}}{\text{N total na planta toda}} \times 100$

NS- diferenças não significativas entre médias a P = 0,05

* - diferenças significativas entre médias a P < 0,05

** - diferenças significativas entre médias a P < 0,01

*** - diferenças significativas entre médias a P < 0,001

encontrava-se mais baixa, podendo ser confundida com uma diluição provocada pela FBN. No item 4.1.4. será mostrado que este não foi o caso em questão.

Por outro lado, o baixo enriquecimento de ^{15}N nos tecidos dos colmos comparado com as folhas não necessariamente deva ser interpretado como uma maior contribuição da FBN nos colmos. Esta ocorrência é mais facilmente explicada pelo fato de que os colmos são produzidos mais tardiamente do que as folhas, em um momento em que o enriquecimento de ^{15}N do nitrogênio disponível do solo era mais baixo.

No tratamento que recebeu a adição de vinhaça ocorreu uma recuperação de N marcado significativamente menor. Isto pode ser explicado por um aumento na imobilização e/ou perdas por desnitrificação do N do fertilizante induzidas pelo alto teor de carbono disponível adicionado pela vinhaça (AMARAL SOBRINHO et al., 1983).

Considerando-se a variabilidade dos dados de ^{15}N , pode-se notar que a variabilidade na recuperação do fertilizante marcado foi sempre muito menor do que a do enriquecimento de ^{15}N (átomos % de ^{15}N em excesso). A explicação para este fato pode ser que enquanto plantas individuais, em qualquer cultivar, obtêm quantidades relativamente semelhantes de N do solo, o nitrogênio derivado da FBN foi muito variável de planta para planta causando grandes diferenças no enriquecimento de ^{15}N . O nitrogênio total das plantas consiste de nitrogênio derivado das duas

fontes, então, a variabilidade planta-a-planta, é intermediária entre a recuperação de $15N$ e o enriquecimento.

4.1.3.2.- Segunda colheita - cana-soca -

As análises de $15N$ do material vegetal da segunda colheita mostraram uma recuperação de semente cerca de 1% do $15N$ aplicado em excesso. O enriquecimento de $15N$ nestas amostras foi muito baixo para serem estimadas com confiança usando um espectrômetro de massa de entrada simples e os dados foram, então, descartados.

4.1.4.- Balanço de N-total -

Em função da alta retirada de nitrogênio pelas plantas, especialmente pelo cultivar CB 47-89, um balanço de N foi desenvolvido com 5 das 10 repetições selecionadas ao acaso, com o objetivo de confirmar os ganhos reais de nitrogênio no sistema solo-planta (Tabela 9). Grandes perdas de nitrogênio ocorreram nos vasos não plantados, principalmente naqueles que receberam aplicação de vinhaça, que deve ter estimulado a desnitrificação. Balanços positivos foram observados em todos os vasos plantados mesmo tendo, certamente, ocorrido alguma perda de nitrogênio como indicado pela baixa recuperação do fertilizante (18 a 31% - Tabela 8). Foram observadas diferenças altamente significativas no conteúdo de nitrogênio entre os cultivares e o cultivar CB 47-89 mostrou maior acúmulo de N. Não há indicação de que este cultivar tenha explorado mais eficientemente o

TABELA 9. Balanço de N-total em quatro cultivares de cana-de-açúcar crescidas por 21 meses em vasos contendo 64 Kg de solo. Médias de 5 repetições.

TRATAMENTO CULTIVAR	NITROGÊNIO NO (g/ vaso)							BALANÇO ^(b)	
	MATERIAL VEGETAL				SOLO				
	COLHEITA 1	COLHEITA 2	RAÍZES	TOTAL	INICIAL	FINAL	PERDA ^(a)		
Com Vinhaça ^(c)	CB 47-89	6,87 ^(e)	6,62 ^(e)	2,12	15,61	50,50	45,73	6,25	+6,71
	CB 47-355	6,20	7,17	2,28	15,65	54,91	46,50	9,90	+3,11
	IAC 52-150	5,37	5,52	1,83	12,72	50,76	45,58	6,66	+3,41
	NA 56-79	5,21	5,93	2,21	13,35	49,39	45,82	5,06	+5,64
	Não plantado					52,01	42,04	11,45	-14,10
Sem Vinhaça	CB 47-89	16,53	13,82	4,44	34,78	53,60	46,82	6,79	+25,34
	CB 47-355	6,67	6,82	3,05	16,54	49,67	44,54	4,91	+ 8,98
	IAC 52-150	6,59	5,00	1,91	13,50	52,67	45,07	7,60	+ 3,24
	NA 56-79	5,68	5,36	1,95	12,99	54,16	45,81	8,35	+ 1,99
	Não plantado					51,13	44,10	7,03	- 9,68
D.M.S(TUKEY P= 0,05)		4,74	8,62	2,14	12,88	8,54	6,40	7,86	13,67
Análise de Variância									
	VINHAÇA	16,9***	NS	4,9*	6,8*	0,4NS	0,1NS	0,8NS	7,7**
	CULTIVAR	16,2***	3,0*	3,7*	8,4**	0,1NS	1,7NS	0,9NS	24,5***
	INTERAÇÃO	9,7***	NS	3,0*	5,7**	2,5NS	0,7NS	2,4NS	4,4**
Coefficiente de variação (%)		30,8	59,0	41,8	36,8	7,7	6,6	49,7	6,4 ^(d)

(a) .-Perda de N do solo = (N inicial no solo + N na vinhaça, se aplicada) - N final no solo.

(b) .- Balanço de N=(N final no solo + N no material vegetal)-N inicial no solo + N na vinhaça + 2,65 g N no fertilizante uréia).

(c) .- 3 litros de vinhaça adicionada por vaso contendo 492 mg N/l.

(d) .- Desvio padrão.

(e) .- Os dados diferem daqueles das tabelas 4 e 5 porque aqui só foram analisadas 5 repetições.

NS .- Diferenças não significativas entre médias a P =0,05.

* .- Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

** .- Diferenças significativas entre médias a P < 0,01.

***.- Diferenças significativas entre médias a P < 0,001.

nitrogênio do solo como está revelado pelas "perdas" de N do solo (Tabela 9). Menos do que 10 g de nitrogênio do solo e do fertilizante foram usados, enquanto 15 e 34 g foram assimilados pela planta nos tratamentos com e sem a adição de vinhaça, respectivamente. No último caso, a absorção de N foi duas vezes maior do que o N assimilado pelos outros cultivares. Deste modo, para o cultivar CB 47-89 o balanço de nitrogênio total mostrou-se o mais positivo (6,7 e 25,3 g de N/vaso) nos tratamentos com e sem a adição de vinhaça, respectivamente. A grande diferença entre estes dois tratamentos, que também foi observada em menor magnitude para o cultivar CB 47-355, é difícil de explicar somente pela grande variabilidade entre os vasos, e pode estar relacionada com as mudanças na microflora do solo que ocorre após a aplicação da vinhaça (NEVES et al., 1983).

Os dados de enriquecimento de ^{15}N (Tabela 8) confirmam as diferenças entre os tratamentos na contribuição da fixação biológica de nitrogênio na assimilação de N do cultivar CB 47-89. Eles também indicam que as estimativas da contribuição da FBN para o cultivar CB 47-89 através da diluição isotópica são sub-estimativas, uma vez que os dados de balanço de N sugerem que as possíveis candidatas a planta controle "não fixadora" - NA 56-79 (menor balanço de N) ou IAC 52-150 (maior enriquecimento de ^{15}N) - obtiveram algum nitrogênio derivado da fixação biológica.

Os dados obtidos neste balanço de nitrogênio em plantas crescidas em vasos por um período de 21 meses

mostram a primeira evidência direta de contribuições muito significativas da FBN associada na nutrição nitrogenada de, pelo menos, um cultivar de cana-de-açúcar. Parece impossível que qualquer outra entrada de nitrogênio no sistema como através da água de chuva, poeira ou absorção de amônia atmosférica possa ser da magnitude dos balanços positivos encontrados. Parece impossível, também, que alguma destas entradas de N esteja associada especificamente com um cultivar ou sejam afetadas pela aplicação de vinhaça.

A confirmação da existência desta alta contribuição da fixação biológica associada à cana-de-açúcar abre possibilidades mais promissoras de melhoramento da cultura para altas colheitas baseadas na fixação biológica de nitrogênio como a principal fonte de nitrogênio para a planta. Apesar de que extrapolações de dados obtidos em experimentos de vaso para situações de campo sejam sempre especulativas, o balanço positivo de 25 g de N por planta representa - em uma população conservadoramente estimada de 15000 plantas/ha - uma entrada de N via fixação biológica de aproximadamente 200 kg de N/ha/ano. Primeiramente, entretanto, experimentos de campo devem ser realizados para confirmar se estas grandes contribuições não foram simples artefatos de um sistema radicular atípico, compactado, encontrado em vasos.

4.2.- Experimento 2 - Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada à cana-de-açúcar através a técnica da diluição isotópica de ^{15}N - ontogenia.

4.2.1.- Produção de matéria seca -

A matéria seca produzida pelos cultivares de cana-de-açúcar nas diferentes épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses de idade) encontra-se na Tabela 10. Não ocorreram diferenças significativas entre os cultivares. Observa-se que na última época de colheita, a matéria seca produzida neste experimento em 16 meses foi menos da metade daquela produzida pela cana-planta do Experimento 1, em 12 meses. Desafortunadamente, o crescimento das plantas não foi satisfatório. As únicas diferenças encontradas entre o Experimento 1 e o 2 foram o tipo de vaso e o solo utilizado. O solo empregado apresentava agregados de menor tamanho e com menor estabilidade. Isto pode ter levado à uma compactação excessiva que diminuiu a porosidade total e o que é mais grave, a macroporosidade responsável pela aeração radicular. Além disto, os vasos do Experimento 2 eram mais largos e mais baixos que os do Experimento 1, o que pode ter levado a uma maior concentração de raízes no fundo do vaso, região em que ocorre maior acúmulo de água, dificultando a aeração das raízes, sendo, provavelmente, a melhor explicação para tão baixa produtividade. Em função disto, a variabilidade entre

TABELA 10. Peso da matéria seca produzida pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 Kg de solo com diferentes de ^{15}N em 4 épocas de colheita (4 , 8 , 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	PESO DA MATÉRIA SECA (g)											
		FOLHAS				COLMOS				PLANTA TODA			
		COLHEITAS				COLHEITAS				COLHEITAS			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Matéria													
Orgânica	CB 47-89	2,7	78,9	184,1	279,4	0,6	68,9	272,3	387,7	3,3	147,8	456,4	667,1
	IAC 52-150	2,3	73,1	132,6	253,1	0,8	96,3	262,4	377,4	3,1	169,4	395,0	630,5
Peletes													
de Gêss	CB 47-89	25,2	123,9	182,2	242,4	11,5	123,1	195,4	226,7	36,7	246,0	377,6	469,2
	IAC 52-150	27,2	93,8	126,8	313,6	15,8	117,9	188,6	374,1	43,0	211,7	315,4	687,7
D.M.S(TUKEY P= 0,05)													
COLHEITA					42,6				80,7				118,1
Análise de variância													
COLHEITA					91,51**				45,93**				65,04**
FONTE					2,00NS				1,53NS				0,11NS
CULTIVAR					1,12NS				0,73NS				0,04NS
Coeficiente de variação (%)					38,1				56,7				46,5

NS.- Diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.

*.- Diferenças significativas entre médias a $\angle P = 0,05$.

**.- Diferenças significativas entre médias a $\angle P = 0,01$.

vasos foi extremamente elevada, observando-se, em alguns casos, o dobro do crescimento das plantas de alguns vasos.

Outro aspecto mostrado na Tabela 10 é que nos vasos onde foi adicionada matéria orgânica marcada (colmos e folhas de cana-de-açúcar moídos), ocorreu um forte efeito inibitório ao desenvolvimento das plantas nos primeiros quatro meses de cultivo. A brotação das gemas foi bastante demorada, provavelmente devido a um efeito alelopático. A adição de matéria orgânica bruta levou também a uma intensa imobilização dos nutrientes do solo, ocasionando um desenvolvimento dez vezes menor do que as plantas cultivadas com peletes de gesso. Com a decomposição do material e diminuição da atividade microbiana estes nutrientes foram novamente colocados em condições de disponibilidade às plantas de modo que, aos 16 meses, o desenvolvimento das plantas foi recuperado e os tratamentos igualaram-se.

4.2.2.- Teor de nitrogênio e acúmulo de N-total -

Na tabela 11 encontram-se os teores de N na parte aérea do material vegetal. Os teores observados são comparáveis àqueles encontrados para a cana-soca do Experimento 1 que, por sua vez, produziu mais matéria seca.

O mal desenvolvimento das plantas refletiu-se no acúmulo de N-total (Tabela 12) que, em média, foi três vezes menor do que o acúmulo observado para o Experimento 1. Novamente é observada uma alta variabilidade entre os vasos ocasionada pelo desenvolvimento irregular entre plantas de

TABELA 11. Teor de nitrogênio encontrado na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100Kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	TEOR DE N (mg/g)							
		FOLHAS				COLMOS			
		COLHEITAS				COLHEITAS			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Matéria									
Orgânica	CB 47-89	6,41	5,59	4,61	3,66	4,99	2,21	1,52	1,33
	IAC 52-150	7,28	4,86	4,46	3,83	5,33	1,98	1,56	1,36
Peletes									
de gesso	CB 47-89	5,67	4,08	4,79	3,59	4,07	1,56	1,50	1,31
	IAC 52-150	4,90	3,82	4,50	3,91	3,30	1,60	1,37	1,37
DMS(TUKEY P= 0,05)									
	COLHEITA				0,51				0,28
	FONTE				0,28				0,15
Análise de variância									
	COLHEITAS				49,56**				368,15**
	FONTE				24,67**				48,37**
	CULTIVAR				0,58NS				1,04NS
Coeficiente de variação(%)					12,89				14,83

NS.- Diferenças não significativas entre as médias a P = 0,05.

*.- Diferenças significativas entre as médias a P < 0,05.

**.- Diferenças significativas entre as médias a P < 0,01.

TABELA 12. Acúmulo de N-total pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 Kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N em 4 épocas de colheita (4,8, 12 e 16 meses). Médias de 5 repetições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	N-total (mg/vaso)											
		FOLHAS				COLMOS				PLANTA TODA			
		COLHEITAS				COLHEITAS				COLHEITAS			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Matéria													
Orgânica	CB 47-89	16,82	441,09	837,23	1025,13	3,16	148,27	414,97	525,71	19,98	589,36	1252,20	1550,84
	IAC 52-150	16,58	356,77	591,48	972,66	4,29	189,80	411,26	505,51	20,87	546,58	1002,75	1478,17
Peletes													
de gesso	CB 47-89	142,91	503,95	871,09	869,68	46,38	199,28	299,10	298,44	189,29	703,23	1170,19	1168,12
	IAC 52-150	132,52	360,57	572,61	1333,12	50,91	181,24	254,80	574,97	183,43	541,81	827,41	1908,09
DMS(TUKEY P= 0,05)													
COLHEITA					246,88				152,99				386,49
Análise de variância													
COLHEITA					39,71**				22,91**				32,02**
FONTE					1,00NS				0,83NS				0,08NS
CULTIVAR					0,50NS				0,53NS				0,03NS
Coeficiente de variação (%)													
					52,2				71,2				56,2

N.S.-Diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

*.-Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

**.- Diferenças significativas entre médias a P < 0,01.

mesmo tratamento, uma vez que a variabilidade do teor de N foi muito mais baixa.

4.2.3.- Diluição isotópica e recuperação de ^{15}N -

Pelos resultados de enriquecimento de ^{15}N apresentados na Tabela 13, nenhum dos cultivares estudados fixou nitrogênio ou a fixação biológica de N foi de igual intensidade, uma vez que não foram significativas as diferenças encontrada entre eles. A segunda hipótese é mais viável, uma vez que no Experimento 1 ambos os cultivares mostraram balanços de nitrogênio positivos, indicando contribuição da fixação biológica.

Os dados mostram que na primeira colheita, o enriquecimento de ^{15}N nos cultivares do tratamento com peletes de gesso foi superior às cultivadas com matéria orgânica. Neste período os peletes liberaram mais ^{15}N na solução do solo, provocando maior absorção. Com o passar do tempo a matéria orgânica liberou mais gradualmente ^{15}N à medida que se decompunha no solo, enquanto os peletes de gesso já haviam solubilizado em boa parte, diminuindo a marcação do N do solo disponível às plantas com ^{15}N . Isto provocou uma recuperação de nitrogênio marcado muito menor (Tabela 14). Na última coleta, a recuperação de ^{15}N pela parte aérea das plantas foi de 0,3 e 3,2% do nitrogênio marcado adicionado para os tratamentos com peletes de gesso e matéria orgânica marcada, respectivamente. Esta baixa recuperação sugere que a lixiviação de nitrogênio do solo foi

TABELA 13 Enriquecimento de ^{15}N na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N em 4 épocas de colheita (4, 8, 12 e 16 meses) .Médias de 5 repetições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	ÁTOMOS % ^{15}N EM EXCESSO											
		FOLHAS COLHEITAS				COLMOS COLHEITAS				PLANTA TODA (a) COLHEITAS			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Matéria													
Orgânica	CB 47-89	0,0645	0,0812	0,0594	0,0579	0,0720	0,0774	0,0611	0,0701	0,0655	0,0801	0,0601	0,0621
	IAC 52-150	0,0644	0,0806	0,0704	0,0664	0,0727	0,0744	0,0746	0,0699	0,0662	0,0784	0,0722	0,0675
Peletes													
de gesso	CB 47-89	0,0790	0,0296	0,0247	0,0163	0,0741	0,0332	0,0310	0,0260	0,0777	0,0306	0,0264	0,0188
	IAC 52-150	0,1296	0,0315	0,0321	0,0267	0,0945	0,0308	0,0380	0,0255	0,1190	0,0314	0,0339	0,0220
DMS(TUKEY P = 0,05)													
COLHEITA		0,0309				0,0226				0,0281			
FONTE		0,0165				0,0121				0,0150			
Análise de variância													
COLHEITA		5,53**				Valores F				5,27**			
FONTE		7,51*								20,48**			
CULTIVAR		1,58NS								0,51NS			
Coeficiente de variação (%)													
		65,1								46,6			
(a) Média Ponderada=(<u>RECUPERAÇÃO ^{15}N EM EXCESSO NA PLANTA TODA</u>)x 10													
N total na planta toda													

N.S.- Diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

*.- Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

** .- Diferenças significativas entre médias a P < 0,01.

TABELA 14.Recuperação de N marcado pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 Kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N em 4 épocas de colheita (4,8 ,12 e 16 meses).Médias de 5 re petições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	RECUPERAÇÃO DE N MARCADO (ug ^{15}N em excesso/ vaso)											
		FOLHAS				COLMOS				PLANTA TODA			
		COLHEITA				COLHEITA				COLHEITA			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Matéria													
Orgânica	CB 47-89	10,85	356,62	491,49	588,50	2,22	113,35	250,41	372,46	13,07	469,97	741,90	960,97
	IAC52-150	11,93	287,02	412,52	637,78	3,25	140,87	303,05	350,02	15,24	427,89	715,57	987,79
Peletes													
de gêsso	CB-47-89	104,61	152,85	215,25	140,61	32,51	69,94	96,84	73,27	137,12	222,79	312,09	213,88
	IAC52-150	165,36	109,22	187,49	240,71	47,38	53,47	97,63	109,25	212,74	162,69	285,12	349,96
DMS(TUKEY P= 0,05)													
	COLHEITA				78,11				58,96				115,09
	FONTE				41,79				31,55				61,58
Análise de variância													
	COLHEITA				46,29**				34,29**				57,76**
	FONTE				78,54**				57,38**				97,91**
	CULTIVAR				0,00NS				0,55NS				0,12NS
Coeficiente de variação(%)					36,3					53,3			

NS.-Diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

*.-Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

**.-Diferenças significativas entre médias a P < 0,01.

muito intensa e/ou a desnitrificação foi bastante acentuada em função da má aeração do solo e/ou as plantas não foram capazes de absorver este nitrogênio devido ao mal funcionamento das raízes por deficiência de oxigênio.

Apesar dos peletes de gesso reduzirem as variações temporais no enriquecimento de ^{15}N no nitrogênio do solo em comparação com o uso de fertilizantes solúveis (WITTY, 1983; WITTY e RITZ, 1984), os dados da Tabela 13 apresentam um declínio muito acentuado no enriquecimento de ^{15}N nas plantas cultivada com peletes de gesso mostrando que, para experimentos de duração prolongada, a melhor fonte de ^{15}N é a matéria orgânica. O declínio no enriquecimento de ^{15}N nas plantas com o tempo pode ser visualizado nas Figuras 1 e 2.

Os dados de enriquecimento de ^{15}N nas plantas mostraram elevada variabilidade. A observação de todo o conjunto de dados e não somente as médias possibilitou perceber que as plantas cultivadas com peletes de gesso apresentavam maior variabilidade. Em função disto, decompos-se a soma de quadrados do resíduo para analisar separadamente os dados de enriquecimento de ^{15}N nas plantas com as diferentes fontes de N marcado. Os coeficientes de variação desta análise para as diferentes fontes de ^{15}N estão na Tabela 15.

Tabela 15 - Coeficientes de variação para o enriquecimento de 15N em cana de açúcar cultivada em vasos comparando 2 fontes de 15N, em 4 épocas de colheita.

Fonte de 15N	Coeficiente de variação (%)		
	átomos % 15N em excesso em		
	Folhas	Colmos	Parte aérea
Matéria orgânica	17,34	15,85	16,51
Peletes de gesso	112,53	82,95	103,13

Nas Figuras 1 e 2 estão representados os desvios padrões das médias verificadas para cada época de colheita, onde é possível visualizar que a variabilidade no fornecimento de 15N para as plantas por peletes de gesso é bastante superior à apresentada pela matéria orgânica.

4.2.4.- Colheita final aos 16 meses -

Em função da inclusão de um terceiro cultivar na colheita final, estes dados estão sendo apresentados separadamente. Na Tabela 16 encontram-se os dados da matéria seca, teor de N e acúmulo de N-total verificado para os três cultivares. Analisando-se estes parâmetros não se verificam diferenças significativas. A altíssima variabilidade

Figura 1. Variação temporal do enriquecimento de ^{15}N na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos de 100 kg de solo, utilizando peletes de gesso marcado como fonte de ^{15}N . Média ponderada de 5 repetições. As barras representam os desvios padrões das médias.

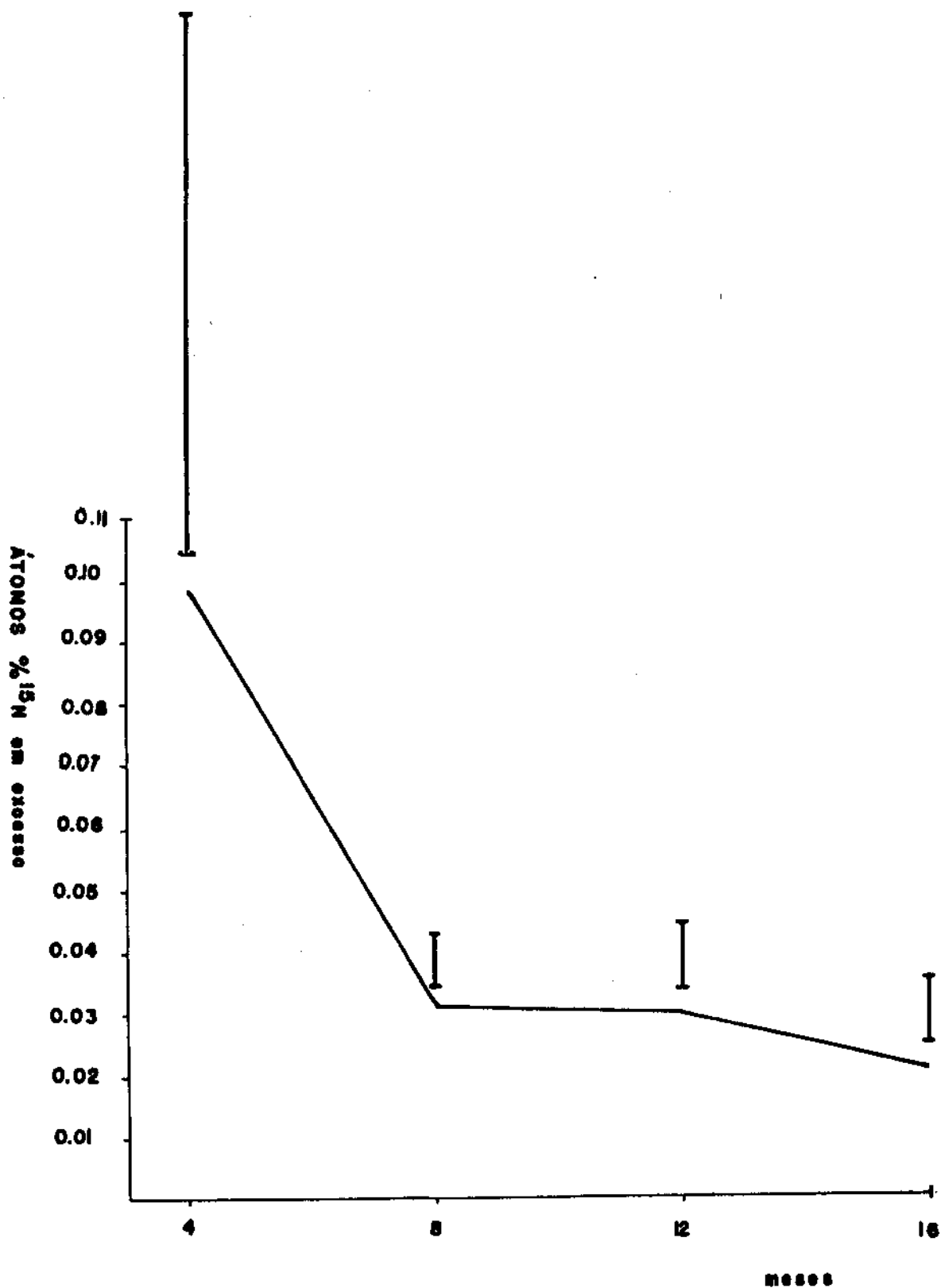


Figura 2. Variação temporal do enriquecimento de ^{15}N na parte aérea de plantas de cana-de-açúcar cultivadas em vasos de 100 kg de solo, utilizando matéria orgânica marcada como fonte de ^{15}N . Média ponderada de 5 repetições. As barras representam os desvios padrões das médias.

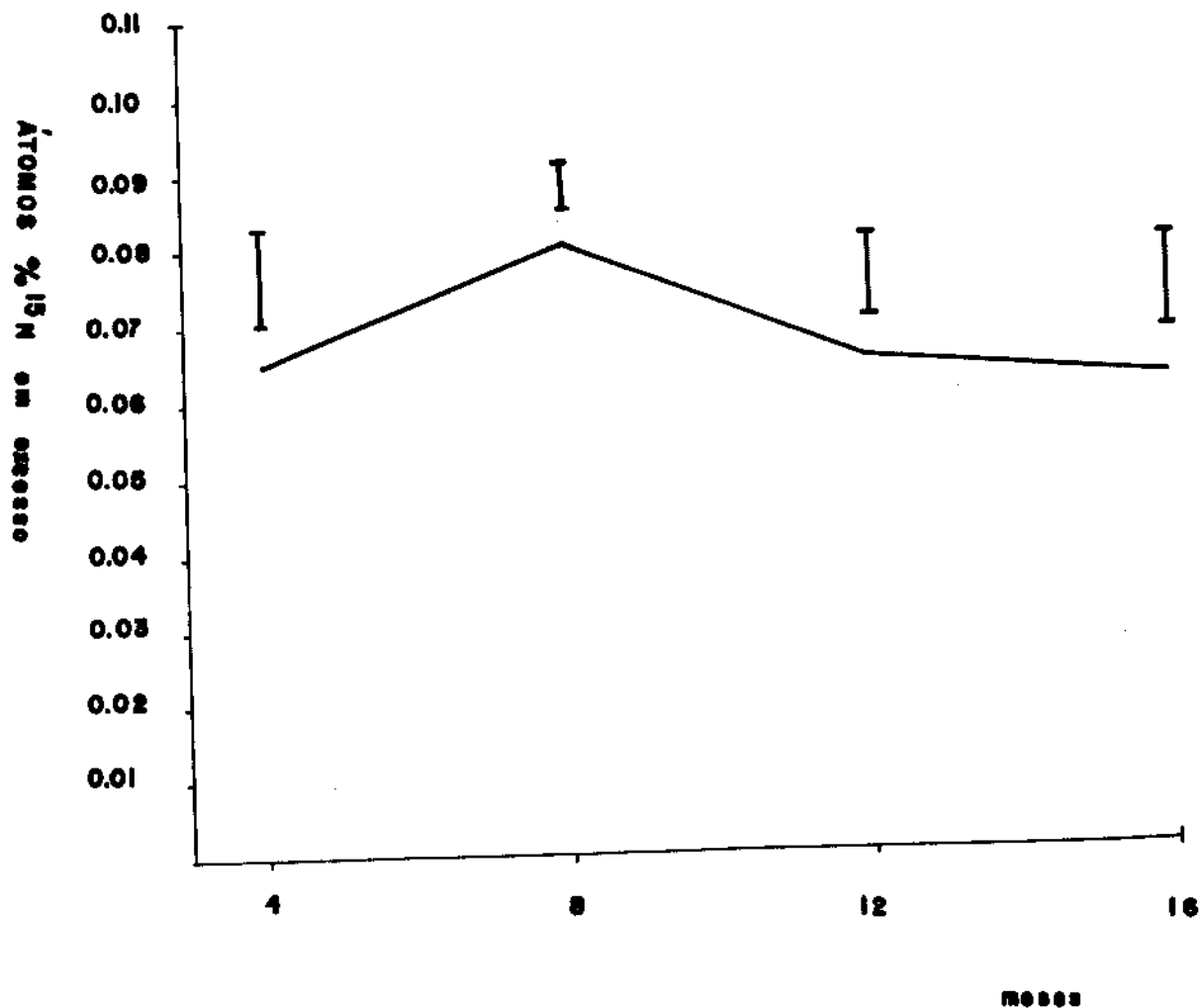


TABELA 16. Peso da matéria sêca, teor de nitrogênio e acúmulo de N-total na cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100 Kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N aos 16 meses de idade. Médias de 5 repetições.

FONTE	CULTIVAR	MATÉRIA SÊCA (g)			TEOR DE N (mg/g)		N-total (mg/vaso)		
		FOLHAS	COLMOS	PLANTA TODA	FOLHAS	COLMOS	FOLHAS	COLMOS	PLANTA TODA
Matéria									
Orgânica	CB 47-89	279,7	387,7	667,1	3,66	1,33	1025,1	525,7	1550,8
	IAC 52-150	253,1	377,4	630,5	3,83	1,36	927,7	505,5	1478,2
	NA 56-79	262,2	364,8	626,9	4,32	1,15	1136,3	420,2	1556,5
Peletes									
de gêsso	CB 47-89	242,4	226,7	469,2	3,59	1,31	869,7	298,4	1168,1
	IAC 52-150	313,6	374,1	687,7	3,91	1,35	1333,1	570,4	1903,9
	NA 56-79	412,5	861,7	1274,1	3,99	1,62	1615,1	1629,8	3244,9
Análise de variância					Valores F				
FONTE		0,87NS	0,41NS	0,52NS	0,61NS	2,42NS	0,79NS	0,90NS	0,90NS
CULTIVAR		0,53NS	1,14NS	0,97NS	4,53NS	0,17NS	0,94NS	1,03NS	1,02NS
Coeficiente de									
variação (%)		57,8	110,2	88,5	10,1	19,3	60,4	153,3	91,6

N.S.- Diferenças não significativas entre médias a $P = 0,05$.

verificada se deveu aos problemas anteriormente discutidos e foram bastante intensos para o cultivar NA 56-79.

Na Tabela 17 estão os dados de enriquecimento de ^{15}N e recuperação do nitrogênio marcado na parte aérea das plantas, onde observa-se diferenças significativas entre as fontes de ^{15}N , como já discutido. Entre cultivares não existiram diferenças mostrando que, se houve contribuição da FBN na nutrição nitrogenada destes cultivares, esta contribuição foi de mesma magnitude.

Em função dos resultados obtidos é possível recomendar-se que, para experimentos utilizando solos com pouca agregação deve-se utilizar uma mistura solo-areia para tentar minimizar os efeitos da má aeração que podem ser ocasionados pela compactação do solo. Outro aspecto a se considerar é a utilização de matéria orgânica marcada como fornecedor de ^{15}N em experimentos de longa duração, já que mostrou-se capaz de fornecer ^{15}N gradual e constantemente ao longo do tempo. Pelos resultados obtidos no peso da matéria seca da primeira colheita, fica evidente a necessidade de se incubar o material orgânico com o solo por um período maior antecedente ao plantio, principalmente em materiais de alta relação C/N como o que foi utilizado.

4.3.- Avaliação final e perspectivas -

Apesar de alguns trabalhos já terem reportado contribuições significativas da fixação biológica de

TABELA 17 - Enriquecimento de ^{15}N e recuperação de nitrogênio marcado pela cana-de-açúcar cultivada em vasos de 100Kg de solo com diferentes fontes de ^{15}N aos 16 meses de idade. Médias de 5 repetições.

FONTE ^{15}N	CULTIVAR	ÁTOMOS % ^{15}N EM EXCESSO			RECUPERAÇÃO DE N MARCADO NA PARTE AÉREA ($\mu\text{g } ^{15}\text{N}$ EM EXCESSO / VASO)
		FOLHAS	COLMOS	PLANTA TODA (a)	
Matéria					
Orgânica	CB 47-89	0,0579	0,0701	0,0621	960,96
	IAC 52-150	0,0664	0,0699	0,0676	987,79
	NA 56-79	0,0579	0,0581	0,0582	896,56
Peletes					
de gesso	CB 47-89	0,0163	0,0260	0,0188	219,46
	IAC 52-150	0,0207	0,0255	0,0219	347,69
	NA 56-79	0,0161	0,0255	0,0200	600,87
DMS(TUKEY P= 0,05)					
FONTE		0,077	0,090	0,077	246,64
Análise de variância					
FONTE		134,62**	84,07**	131,52**	22,36**
CULTIVAR		1,36NS	1,11NS	0,83NS	0,60NS
Coeficiente de					
variação (%)		25,8	25,5	24,3	48,4

(a) Média Ponderada = $\frac{\text{RECUPERAÇÃO DE } ^{15}\text{N EM EXCESSO NA PLANTA TODA}}{\text{N. TOTAL NA PLANTA TODA}} \times 10$

N.S.- Diferenças não significativas entre médias a P = 0,05.

*.- Diferenças significativas entre médias a P < 0,05.

**.- Diferenças significativas entre médias a P < 0,01

nitrogênio associada na nutrição nitrogenada de gramíneas (APP et al., 1980; YOSHIDA e YONEYAMA, 1980; MIRANDA, 1985; BODNEY e UICTOPIA, 1984) os dados aqui apresentados são pioneiros em cana-de-açúcar, uma vez que pela primeira vez se faz uma observação por um período tão longo (21 meses) e com resultados tão expressivos. É importante destacar que a técnica de balanço de nitrogênio, que se encontra um pouco esquecida, mostrou-se uma boa ferramenta para quantificar a FBN associada e com vantagens sobre a metodologia original quando acoplada com a técnica da diluição isotópica de ^{15}N . Neste experimento, uma técnica serviu perfeitamente para confirmar os resultados da outra. Um aspecto que predominou nos experimentos foi a elevada variabilidade encontrada em se tratando de experimento de vasos. Deverão existir consideráveis vantagens em estudos posteriores se forem usadas mais plantas por vaso para reduzir a variabilidade entre repetições.

A partir dos resultados obtidos nestes experimentos vários outros estudos vem sendo desenvolvidos como os de URQUIAGA et al. (1987) que demonstraram pela técnica da diluição isotópica de ^{15}N contribuições da FBN variando de 37 a 56% do N total acumulado pelas plantas. CAVALCANTE e DOBEREINER (1988) isolaram nova bactéria fixadora e os resultados tem mostrado que no solo utilizado no Experimento I esta bactéria tem provocado altas taxas de redução de acetileno (REIS, comunicação pessoal).

As perspectivas abertas são promissoras e estimulantes e o primeiro passo a ser dado é, sem dúvida, a confirmação destas altas contribuições com resultados expressivos também no campo. Observados resultados positivos no campo, deve-se intensificar esforços no sentido de esclarecer quem, onde e como fixa nitrogênio em associação com a cana-de-açúcar, o que possibilitaria uma extensão dos conhecimentos a outros cereais e forrageiras. O estudo e desenvolvimento de metodologias que propiciem a identificação de cultivares com boa capacidade de fixação de N, logo no início de um programa de melhoramento da cultura, é fundamental, uma vez que são necessários, no mínimo, dez anos para o lançamento de um novo cultivar no mercado.

5. CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais e resultados obtidos nos experimentos pode-se concluir:

1- Foi demonstrada a ocorrência de fixação biológica de nitrogênio associada à cultura da cana-de-açúcar por intermédio das técnicas de balanço de nitrogênio total e diluição isotópica de ^{15}N .

2- Em 21 meses de cultivo os cultivares estudados acumularam de 12,72 a 34,78 g de N dos quais 15 a 72% adquiridos via fixação biológica de nitrogênio.

3- Na cana-planta do Experimento 1, colhida aos 12 meses de idade, a recuperação de ^{15}N do fertilizante variou de 18 a 31 % do total adicionado. Através da técnica da diluição isotópica de ^{15}N foi possível calcular que, aproximadamente, 45 % do do N total do cultivar CB 47-89 foi adquirido via

fixação biológica de nitrogênio, nos primeiros 12 meses de cultivo.

4- A matéria orgânica marcada com ^{15}N utilizada no Experimento 2 mostrou-se uma fonte fornecedora de ^{15}N mais satisfatória do que os peletes de gesso para experimentos de longa duração, pois permitiu um fornecimento mais estável de ^{15}N disponível para as plantas no período experimental (16 meses).

5- Em função da acentuada variabilidade apresentada pelas plantas, recomenda-se o uso de mais plantas por vaso para tentar reduzir o efeito ocasionado pelo cultivo de plantas individuais.

6. LITERATURA CITADA

ALVAREZ, R.; VERDADE, F.C. e OLIVEIRA, H. Fracionamento da dose de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar. *Bragantia*, 22(53):51-4, 1963.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X.; LEAL, J. R. e ROSSIELLO, R.O.P. Desnitrificação e imobilização de nitrogênio em solo tratado com vinhaça. *R. Bras. Ci. Solo*, 7:61-4, 1983.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; LUISI, M.V.V.; ROSSIELLO, R.O.P.; VELLOSO, A.C.X. e LEAL, J.R. Transformações do nitrogênio mineral em solo Podzólico Vermelho-Amarelo tratado com vinhaça. *Pesq. Agropec. Bras.*, 22(3):249-56, 1987.

AMARGER, N.; MARIOTTI, A. e MARIOTTI, F. Essai d'estimation du taux d'azote fixe symbiotiquement chez le lupin par le traçage isotopique naturel (^{15}N). *C.R. Acad. Sci. Paris*, 284:2179-82, 1977.

- ANDREIS, H.J. Macro and micronutrient content of millable Florida sugar cane. *The Sugar Journal*, 37(8):10-12, 1975.
- APP, A.A.; SANTIAGO, T.; DAEZ, C.; MENGUITO, C.; VENTURA, W.; TIROL, A.; PO, J.; WATANABE, I.; DATTA, S.K. e ROGER, P. Estimation of the nitrogen balance for irrigated rice and the contribution of phototrophic nitrogen fixation. *Field Crops Research*, 9:17-27, 1984.
- APP, A.A.; WATANABE, I.; ALEXANDER, M.; VENTURA, W.; DAEZ, C.; SANTIAGO, T. e DATTA, S.K. Nonsymbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Science*, 130(5):283-89, 1980.
- APPLEBY, C.A. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35:443-78, 1984.
- ARIAS, O.E.; GATTI, I.M.; SILVA, D.M.; RUSCHEL, A.P. e VOSE, P.B. Primeras observaciones al microscopio electrónico de bacterias fijadoras de N₂ en la raiz de la cana de azúcar. *Turrialba*, 28(3):203-07, 1978.
- AZEREDO, D.F. e BOLSANELLO, J. Efeitos da adubação nitrogenada em cana-planta na Zona da Mata de Minas Gerais. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil. Maceió, 1979. *Anais. Maceió, Stab*, v.2, p.350-52, 1980.

- AZEREDO, D.F.; BOLSANELLO, J.; WEBER, H. e VIEIRA, J.R. Nitrogênio em cana-planta, doses e fracionamento. *Stab*, 4(5) : 26-32, 1986.
- AZEREDO, D.F.; ROBAINA, A.A.; MANHÃES, M.S. e VIEIRA, S.R. Adubação da cana-de-açúcar nos Estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais (Zona da Mata e Região Norte). *Boletim Técnico Planalsucar*, 3(10):5-24, 1981.
- BALANDREAU, J.P. e DOMMERGUES, Y. Microbiologie du sol-mesure In situ de l'activité nitrogénasique. *C. R. Acad. Sci. Paris, Ser. D*, 273:2020-23, 1971.
- BARAK, B.; NUR, I.; OKON, Y. e HENIS, Y. Aerotatic response of Azospirillum brasilense. *J. Bacteriol.*, 15:643-49, 1982.
- BARBER, L.E.; TJEPKEMA, J.D.; RUSSEL, S. A. e EVANS, H. J. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with Spirillum. *Appl. Environ. Microbiol.* 32:108-13, 1976.
- BARNES, A.C. The sugar cane. Interscience, New York, 456 p. 1964.
- BERG, R.H.; TYLER, M.E.; NOVICK, N.J.; VASIL, V. e VASIL, I.K. Biology of Azospirillum - Sugarcane association : enhancement of nitrogenase activity. *Appl. Environ. Microb.* 39(3):642-49, 1980.

- BERG, R.H.; VASIL, V. e VASIL, I. K. The biology of Azospirillum-Sugarcane association. II - Ultrastructure. *Protoplasma*, 101:143-63, 1979.
- BERGERSEN, F.J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.* 23:1015-25, 1970.
- BERGERSEN, F.J. e TURNER, G.L. An evaluation of ^{15}N methods for estimating nitrogen fixation in a subterranean clover perennial rye grass swards. *Aust. J. Agric. Res.* 34 : 391-401, 1983.
- BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L.; GAULT, R.R. ; CHASE, D. L. e BROCKWELL, J. The natural abundance of ^{15}N in an irrigated soybean crop and its use for the calculation of nitrogen fixation. *Aust. J. Agric. Res.*, 36:411-23, 1985.
- BERKUM, P. van e SLOGER, C. Immediate acetylene reduction by excised grass roots not previously preincubated at low oxygen tensions. *Plant Physiol.*, 64:739-43, 1979.
- BLACK, A.S. e WARING, S.A. The natural abundance of ^{15}N in the soil-water system of a small catchment area. *Aust. J. Soil Res.*, 15:51-7, 1977.
- BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation with graminiae. *CRC Critical Reviews in Plant Science*, 6 (3):209-66, 1987.

BODDEY, R.M. e AHMAD, N. Seasonal variations in nitrogenase activity of various rice varieties measured with an in situ acetylene reduction technique in the field. In: Associative N₂ fixation. v.2. (VOSE, P.B. e RUSCHEL, A. P. eds.). CRC Press, Florida, p.219-99, 1981.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R. L. e MATSUI, E. Nitrogen fixation by nodulated soybean under tropical field conditions estimated by the ¹⁵N isotope dilution technique. Soil Biol. Biochem., 16(3):583-88, 1984.

BODDEY, R.M.; CHALK, P.M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E. e DOBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of Paspalum notatum cv. batatais. Can. J. Microb., 29: 1036-46, 1983.

BODDEY, R.M.; QUILT, P. e AHMAD, N. Acetylene reduction in the rhizosphere of rice : Methods of assay. Plant Soil, 50:567-74, 1978.

BODDEY, R.M. e VICTORIA, R.L. Estimation of biological nitrogen fixation associated with Brachiaria and Paspalum grasses using ¹⁵N labelled organic matter and fertilizer. Plant Soil, 90:265-92, 1986.

BONT, J.A.M. de. Oxidation of ethylene by soil bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, 42:59-71, 1976.

- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: Methods of soil analysis. (BLACK, C.A. ed.). Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, p.1149-78, 1965.
- BREMNER, J.M. Use of nitrogen-tracer techniques for research on nitrogen fixation. In: Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. (AYANABA, A. e DART, P. J. eds.). John Wiley e Sons, London, 335p., 1977.
- BREMNER, J.M. e EDWARDS, A.P. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. 1. Apparatus and procedure for distillation and determination of ammonia. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 29:504-07, 1965.
- BROADBENT, F.E. Methodology for nitrogen transformation and balance in soil. Plant Soil, 58:383-99, 1981.
- BROADBENT, F.E. e NAKASHIMA, T. Plant recovery of immobilized nitrogen in greenhouse experiments. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 29:55-60, 1965.
- BURKE, D.; KAUFMAN, P.; McNEIL, M. e ALBERSHEIM, P. The structure of plant cell walls. VI. A survey of the walls of suspension-cultured monocots. Plant Physiol., 54:109-15, 1974.
- CARVALHO, L.C.C. Adubação e a cana-de-açúcar no Brasil. In: Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. (ORLANDO FILHO, S. ed.). Piracicaba, IAA/Planalsucar, p.13-21, 1983.

- CATANI, R.A.; ARRUDA, H.C.; PELEGRINO, D. e BERGAMIN FILHO, H.
A absorção de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre pela cana-de-açúcar CO 419 e seu crescimento em função da idade. Anais da ESALQ, 16:167-90, 1959.
- CAVALCANTE, V.A. e DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen fixing bacterium associated with sugar cane. Plant Soil, 1989. (In press).
- CHALK, P.M. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. Soil Biol. Biochem., 17:389-410, 1985.
- CHILD, J.J. e KURZ, W.G.W. Inducing effect of plant cells on nitrogenase activity by Spirillum and Rhizobium in vitro. Can. J. Microbiol., 24:143-48, 1978.
- COPEPSUCAR. Relatório anual. Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo, Fazenda Santo Antônio. Piracicaba, São Paulo, 1985.
- DART, P.J.; DAY, J.M. e HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: Use of isotopes for study of fertilizers utilization by legume crops. Int. Atom. Ener. Ag. Vienna, p.85-100, 1972.
- DAY, J.M.; HARRIS, D.; DART, P. J. e BERKUM, P. van. The Broadbalk experiment. An investigation of nitrogen gains from nonsymbiotic fixation. In: Nitrogen fixation by free-living microorganisms. (STEWART, W.D.P. ed). Inter. Biol.

- Program, v. 6. Cambridge Univ. Press, p.71-84, 1975.
- DELWICHE, C.C. e STEYN, P.L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. *Environ. Sci. Technol.*, 4:929-35, 1970.
- DE-POLLI, H. e DOBEREINER, J. Diazotrophic rhizocoenoses. In: Nitrogen fixation. (STEWART, W.D.P. e GALLON, J.R. eds.). Academic Press, New York, p.301-33. 1980.
- DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DOBEREINER, J. e SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by ^{15}N incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 9:119-23, 1977.
- DILLEWIJN, C. van. Botany of sugar cane. *Chronica Botanica*, Waltham, 371p., 1952.
- DILWORTH, M.J. Acetylene by nitrogen fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 127: 285-94, 1966.
- DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns estados do Brasil. VI Congres. Bras. Cienc. Solo, Salvador, 1957.
- DOBEREINER, J. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* do solo. *Rev. Brasil. Biol.*, 19(3):251 - 58, 1959.

- DOBEREINER, J. Nitrogen fixing bacteria of the genus Beijerinckia Derx in the rhizosphere of sugar cane. *Plant Soil*, 15(3):211-16, 1961.
- DOBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: *Methods for evaluating biological nitrogen fixation.* (BERGERSEN, E.J. ed.). John Wiley e Sons, Chichester, p.535-55, 1980.
- DOBEREINER, J. e DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses. Characterisation of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation.* (NEWTON, W. E. e NYMAN, C.J. eds.). Washington State University Press, Pullman, p.518-38, 1976.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. e DART, P.J. Nitrogenase activity in the rhizosphere of sugar cane and some other tropical grasses. *Plant Soil*, 37:191-96, 1972.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. e DART, P.J. Fixação de nitrogênio na rizosfera de Paspalum notatum e da cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras., Ser. Agron.,* 8:153-57, 1973.
- DOBEREINER, J. e LEMOS, P. Ação da sacarose e de Beijerinckia na fixação de nitrogênio e agregação do solo. *Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric.,* 29:11-45, 1958.
- EADY, R.R.; ISSACK, R. ; KENNEDY, C. e POSTGATE, J.R. Nitrogenase synthesis in Klebsiella pneumoniae: comparison of ammonium and oxygen regulation. *J. Gen. Microbiol.,* 104:277-85, 1978

ELA, S.W.; ANDERSON, M.A. e BRILL, W.J. Screening and selection of maize to enhance associative bacterial nitrogen fixation. *Plant Physiol.*, 70:1564-67, 1982.

ESKEW, D.L.; EAGLESHAW, A.R.J. e APP, A.A. Heterotrophic $^{15}\text{N}_2$ fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. *Plant Physiol.*, 68:48-52, 1981.

ESKEW, D.L. e TING, I.P. Comparison of intact plant and excised root assays for acetylene reduction in grass rhizospheres. *Plant Sci. Lett.*, 8:327-31, 1977.

FANZERES, A.; BRITO ALVAREZ, M.A. de e BODDEY, R.M. An in situ technique for the evaluation of nitrogen fixation associated with cereals. ^{Poster presented} 3rd Int. Symp. Nitrogen Fixation with Non-legumes. Helsinki, Finland, 1984.

FEIGIN, A.; SHEARER, G.; KOHL, D.H. e COMMONER, B. The amount and ^{15}N content of nitrate in soil profiles from two central Illinois fields in a corn-soybean rotation. *Soil Sci. Amer. J.*, 38:465-71, 1974.

FIRTH, P.; THITIPOCA, H.; SUTHIPRADIT, S.; WETSELAAR, R. e BEECH, D.F. Nitrogen balance studies in the Central Plain of Thailand. *Soil. Biol. Biochem.*, 5:41-6, 1973.

FREITAS, J.R.; VICTORIA, R.L.; RUSCHEL, A.P. e VOSE, P. B. Estimation of N_2 -fixation by sugar cane, Saccharum sp. and soybean, Glycine max, grown in soil with ^{15}N labelled organic matter. *Plant Soil*, 82:257-61, 1984.

FRIED, M.; DANSO, S.K.A. e ZAPATA, F. The methodology of measurement of N₂ fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. *Can. J. Microbiol.* 29:1055-62, 1983.

GEUS, J.G. de. Fertilizer guide for tropical and subtropical farming. Centre d'Etude de l'Azote, Zurich, 727p.; 1967.

GILLER, K.E.; DAY, J.M.; DART, P.J. e WANI, S.P. A method for measuring the transfer of fixed nitrogen from free-living bacteria to higher plants using ¹⁵N₂. *J. Microbiol. Methods*, 2:307-16, 1984.

GOLDEN, L.E. Nutrient uptake by sugar cane in Louisiana. *The Sugar Journal*, 23(11):22-4, 1961.

GRACIOLLI, L.A.; FREITAS, J.R. e RUSCHEL, A.P. Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.). *Rev. Microbiol. São Paulo*; 14 (3):191-96, 1983.

GRACIOLLI, L.A. e RUSCHEL, A. P. Microorganisms in the phyllosphere and rhizosphere of sugar cane. In: *Associative N₂ fixation*, v.2. (VOSE, P.B. e RUSCHEL, A. P. eds.). CRC Press, Florida, p.91-101, 1981.

HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C. e HOLSTEN, R.D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5:47-81, 1973.

HARDY, R.W.F. e HAVELKA, V.D. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field-grown legumes with emphasis on soybeans. In: Symbiotic nitrogen fixation in plants. (NUTMAN, P.S. ed.). Inter. Biological Program. Cambridge Univ. Press, Cambridge, v.7, p.421-39, 1976.

HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. e BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂-fixation: Laboratory and field evaluations. *Plant Physiol.*, 43:1185-207, 1968.

HEGAZI, N.A.; EID, M.; FARAG, R.S. e MONIB, M. Asymbiotic N₂-fixation in the rhizosphere of sugar cane planted under semi-arid conditions of Egypt. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 16 (1):23-37, 1979.

HENZELL, E.F.; MARTIN, A.E.; ROSS, P. J. e HAYDOCK, K. P. Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture plants. IV. Uptake of nitrogen from labelled plant material by Rhodes grass and Siratro. *Aust. J. Agric. Res.*, 19: 65-77, 1968.

ITO, O.; CABRERA, D. e WATANABE, I. Fixation of dinitrogen - 15 associated with rice plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:554-58, 1970.

JUNK, G. e SVEC, H.V. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 14:234-43, 1958.

- KARAMANOS, R.E. e RENNIE, P.A. Changes in natural ^{15}N abundance associated with pedogenic processes in soil. II. Changes in different slope conditions. Can. J. Soil Sci., 60: 365, 1980.
- KEENEY, D.R. e NELSON, D.W. Nitrogen - Inorganic forms. In: Methods of soil analysis. Monograph No.9(2). (PAGE, A. L. e MILLER, R.H. e KEENEY, D.R. eds.). Amer. Soc. Agron., Madison, Wisconsin, p.643-98, 1982.
- KNOWLES, R. Nitrogen fixation in natural plant communities and soils. In: Methods for evaluating biological nitrogen fixation. (BERGENSEN, F.J. ed.). John Wiley e Sons, Chichester, p.557-82, 1980.
- KOCH, B.L. Associative nitrogenase activity by some Hawaii an grass roots. Plant Soil, 47:703-06, 1977.
- KOHL, D.H. e SHEARER, G. Isotopic fractionation associated with symbiotic nitrogen fixation and uptake of NO_3^- by plants. Plant Physiol., 66:61-5, 1980.
- KOYAMA, T. e APP, A.A. Nitrogen balance in flooded rice soils. In: Nitrogen and rice. International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines, p.95-104, 1979.

LEDGARD, S.F.; MORTON, R.; FREENEY, J.R.; BERGERSEN, F. J. e SIMPSON, J.R. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the 15N dilution measurement of N2 fixation. I. Derivation of method. Soil Biol. Biochem., 17:317-21, 1985a.

LEDGARD, S.F.; SIMPSON, J.R.; FREENEY, J.R. e BERGERSEN, F.J. Field evaluation of 15N techniques for estimating nitrogen fixation in legume-grass associations. Aust. J. Agric.Res. 36:247-58, 1985b.

LEDGARD, S.F.; SIMPSON, J.R.; FREENEY, J.R.; BERGERSEN, F. J. e MORTON, R. Assessment of the relative uptake of added and indigenous soil nitrogen by nodulated legumes and reference plants in the 15N dilution measurement of N2 fixation. II. Glasshouse application of method. Soil Biol. Biochem., 17:323-28, 1985c.

LEE, K.K.; ALIMAGNO, B.U. e YOSHIDA, T. Field technique using the acetylene reduction technique method to assay the nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. Plant Soil, 47:519-26, 1977.

LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determinations. Soil Sci. Soc. Amer. J., 45:852-55, 1981.

LOUREIRO, M.F. Balanço de nitrogênio em gramíneas do gênero Brachiaria. UFRRJ, Tese de Mestrado. 102p., 1985.

MARIOTTI, A.; GERMON, J.C.; HUBERT, P.; KAISER, P.; LETOLLE, R.; TARDIEUX, A. e TARDIEUX, P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotopic fractionation: some principles, illustration for the denitrification and nitrification processes. *Plant Soil*, 62:413-30, 1981.

MASTERSON, C.L. e MURPHY, P.M. The acetylene reduction technique. In: *Recent advances in nitrogen fixation*. (SUBBA RAO, N.S. ed.). Edward Arnold, Londres, p.8-33, 1980.

MATSUI, E.; VOSE, P.B.; RODRIGUES, N.S.R. e RUSCHEL, A.P. Use of ^{15}N enriched gas to determine N_2 - fixation by undisturbed sugar cane plant in the field. In: *Associative N_2 fixation*. v.2. (VOSE, P.B. e RUSCHEL, A.P. eds.). CRC Press, Florida, p.153-61, 1981.

McAULIFFE, C.; CHAMBLEE, D.S.; URIBE-ARANGO, H. e WOODHOUSE JR., W.W. Influence of inorganic nitrogen fixation by legumes as revealed by ^{15}N . *Agronomy Journal*, 50: 334-37, 1958.

MIRANDA, C.H.B. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a onze ecótipos de Panicum maximum através os métodos de diluição isotópica do ^{15}N e redução de acetileno. UFRRJ, Tese de Mestrado. 145p. 1985.

MIRANDA, C.H.B.; BODDEY, R.M. e DOBEREINER, J. The effects of disturbance and soil moisture on intact core acetylene reduction measurements of nitrogenase activity associated with grasses. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 54:760-61, 1982.

MORRIS, D.R.; ZUBERER, D.A. e WEAVER, R.W. Nitrogen fixation by intact grass-soil cores using $^{15}\text{N}_2$ and acetylene reduction. *Soil Biol. Biochem.*, 17(1):87-91, 1985.

NELSON, A.D.; BARBER, L.E.; TJEPKEMA, J.; RUSSEL, S. A.; POWELSON, R.; EVANS, H.J. e SEIDLER, R.J. Nitrogen fixation associated with grasses in Oregon. *Can. J. Microbiol.*, 22:523-30, 1976.

NEVES, M.C.P.; LIMA, I.T. e DOBEREINER, J. Efeito da vinhaça sobre a microflora do solo. *R. Bras. Ci. Solo*, 7(2):131-36 1983.

NOHRSTEDT, H.O. Natural formation of ethylene in forest soils and methods to correct results given by the acetylene-reduction assay. *Soil Biol. Biochem.*, 15(3):281-86, 1983.

OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. e BURRIS, R.M. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:85-88, 1977.

OKON, Y.; HEYTLER, P.G. e HARDY, R. W. F. N_2 fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into *Setaria*

italica. Appl. Environ. Microbiol. 46:694-97, 1983.

ORLANDO FILHO, J.; HAAB, H.P. e ZAMBELLO JR., E. Crescimento e absorção de micronutrientes pela cana-de-açúcar, variedade CB 41-76 em função de idade em solos do Estado de São Paulo. Bol. Técnico Planalsucar, 2:1-128, 1980.

ORLANDO FILHO, J.; ZAMBELLO JR., E. e SOUZA, J.A.G.C. Adubação nitrogenada em 4 variedades de cana-planta em solo latossol vermelho escuro-orto. Brasil Açucareiro, 89(4):6-14, 1977.

PATRIQUIN, D.G. Nitrogen fixation in sugar cane litter. Biol. Agric. Hort., 1:39-64, 1982.

PATRIQUIN, D.G.; GRACIOLLI, L.A. e RUSCHEL, A.P. Nitrogenase activity of sugar cane propagated from stem cuttings in sterile vermiculite. Soil Biol. Biochem., 12:413-17, 1980.

PEREIRA, P.A.A.; DOBEREINER, J. e NEYRA, C. A. Nitrogen assimilation and dissimilation in five genotypes of Brachiaria spp. Can. J. Bot., 59:1475-79, 1981.

POSTGATE, J.R. Microbiology of the free-living nitrogen fixing bacteria excluding Cyanobacteria. In: Current perspectives in nitrogen fixation. (GIBSON, A.H. e NEWTON, W. E. eds.). Aust. Acad. Sci. Canberra, p.217-28, 1981.

PURCHASE, B.S. Nitrogen fixation associated with sugar cane. Proc. South African Sugar Tech. Assoc., Natal, p.173 - 76,

1980.

RAO, V.R. e RAO, L.N. Nitrogen fixation (C₂H₂ reduction) in soil samples from rhizosphere of rice grown under alternate flooded and non-flooded conditions. *Plant Soil*, 81:111-18, 1984.

RENNIE, R.J. ¹⁵N-isotope dilution as a measure of dinitrogen fixation by Azospirillum brasilense associated with maize. *Can. J. Bot.*, 58:21-24, 1980

RENNIE, R.J. Quantifying dinitrogen fixation in soybeans by ¹⁵N isotope dilution. The question of the non-fixing control plant. *Can. J. Bot.*, 60:856-61, 1982.

RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A. P. e VOSE, P. B. Isolation and identification of N₂ - fixing bacteria associated with sugar cane (Saccharum sp.). *Can. J. Microbiol.*, 28(5):462-67, 1982.

RENNIE, D.A.; PAUL, E.A. e JOHNS, L.E. Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. *Can. J. Soil Sci.*, 56:43-50, 1976.

RENNIE, R.J. e RENNIE, D.A. Technique for quantifying N₂-fixation in association with non-legumes under field and greenhouse conditions. *Can. J. Microbiol.*, 29:1022-35, 1983.

RENNIE, R.J.; RENNIE, D.A. e FRIED, M. Concepts of ¹⁵N usage in dinitrogen fixation studies. In: *Isotopes in biological*

dinitrogen fixation. Inter. Atom. Ener. Ag., Vienna, p.107-33, 1978.

RICE, W.A. e PAUL, E.A. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in water logged soils. Can. J. Microbiol., 17:1049-56, 1971.

ROBSON, R.; KENNEDY, C. e POSTGATE, J. Progress in comparative genetics of nitrogen fixation. Can. J. Microbiol., 29:954-67, 1983.

RUSCHEL, A.P. Associative N₂-fixation by sugar cane. In: Associative N₂ fixation. v.2. (VOSE, P.B. e RUSCHEL, A. P. eds.). CRC Press, Florida, p.81-90, 1981.

RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y. e SALATI, E. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil grown sugar cane seedlings. Soil Biol. Biochem., 7:181-82, 1975.

RUSCHEL, A.P.; MATSUI, E.; SALATI, E. e VOSE, P.B. Potential N₂-fixation by sugar cane (Saccharum sp.) in solution culture. II. Effect of inoculation and dinitrogen fixation as directly measured by ¹⁵N₂. In: Associative N₂ fixation. v.2. (VOSE, P.B. e RUSCHEL, A.P. eds.). CRC Press, Florida, p.127-32, 1981.

RUSCHEL, A.P.; VICTORIA, R.L.; SALATI, E. e HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugar cane (Saccharum officinarum). Ecol. Bull. Stockholm, 26:297, 1978.

RUSCHEL, A.P. e VOSE, P.B. Biological nitrogen fixation in sugar cane. In: Biological fixation technology for tropical agriculture. Cali, Colômbia, 1981.

SAMPAIO, E.V.S.B.; SALCEDO, I.H. e BETTANY, J. Dinâmica de nutrientes em cana-de-açúcar. I. Eficiência na utilização de uréia (15N) em aplicação única ou parcelada. Pesq. Agropec. Bras., 19(8):943-49, 1984.

SAMPAIO, E.V.S.B. e SALCEDO, I.H. Eficiência da utilização da uréia-15N por cana-planta e três socas em Tabuleiro costeiro de Pernambuco. Rev. STAB 6(1):10, 1987.

SCHOLLHORN, R. e BURRIS, R.H. Study of intermediates in nitrogen fixation. Federation Proc., 24:710, 1966.

SCHUBERT, K.R. e EVANS, H.J. Hydrogen evolution : a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Nat. Acad. Sci., 73: 1207- 11, 1976.

SELDIN, L.; ELSAS, J. D. van e PENIDO, E. G. C. Bacillus azotofixans sp. nov. a nitrogen - fixing species from Brazilian soils and grass roots. Int. J. Syst. Bacteriol., 34:451-56, 1984.

SHEARER, G. e KOHL, D.H. N₂ fixation in field settings: Estimations based on natural 15N abundance. Aust. J. Pl. Physiol., 13:695-756, 1986.

SHEARER, G.; KOHL, D.H.; VIRGINIA, R.A.; BRYAN, B.A.; SKEETERS, J.L.; NILSEN, E.T.; SHARIFI, M.R. e RUNDEL, P.W. Estimates of N₂ fixation from variation in the natural abundance of ¹⁵N in Sonoran Desert ecosystem. *Oecologia*, 56:365-73, 1983.

SODERLUND, R. e ROSSWALL, T. The nitrogen cycles. In: *Handbook environmental chemistry*. v.1(B). (HUTZINGER, O. ed.). Springer-Verlag, Berlin, p. 61-88, 1982.

SOUTO, S.M. e DOBEREINER, J. Metodologia para medição da fixação de N₂ em raízes de gramíneas forrageiras tropicais. *Pesq. Agropec. Bras.*, 19:553-65, 1984.

SPRENT, J.I. The biology of nitrogen-fixing organisms. McGraw-Hill, London, 196p., 1979.

STANFORD, G. e AYRES, A.S. The internal nitrogen requirement of sugar cane. *Soil Sci.*, 98:338-44, 1964.

STEELE, K.W.; WILSON, A.T. e SAUNDERS, W.M.H. Nitrogen isotope ratios in surface and subsurface horizons of New Zealand improved grassland soils. *New Zealand J. Agric. Res.*, 24: 167-70, 1981.

TAKAHASHI, D.T. ¹⁵Nitrogen field studies with sugar cane. *Hawaiian Planters Record*, 57:198-221, 1964.

TJEPKEMA, J.D. e BURRIS, R.H. Nitrogenase activity associated with some Wisconsin prairie grasses. *Plant Soil*, 45:81-94, 1976.

- TJEPKEMA, J.D. e EVANS, H.J. Nitrogen fixation associated with Juncus balticus and other plants of the Oregon Wetlands. *Soil Biol. Biochem.*, 8:505-09, 1976.
- TURNER, G.L.; BERGERSEN, F.J. e TANTALA, H. Natural enrichment of ^{15}N during decomposition of plant material in soil. *Soil Biol. Biochem.*, 15:495-97, 1983.
- URQUIAGA, S.; BOTTEON, P.T.L.; BODDEY, R.M. e DOBEREINER, J. Selection of sugarcane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ^{15}N -labelled soil. *Plant Soil* 1988, (No prelo).
- URQUIAGA, S.; BOTTEON, P.T.L. ; LIMA, E.; BODDEY, R. M. e DOBEREINER, J. Fixação biológica de nitrogênio : uma importante fonte de nitrogênio na cultura da cana-de-açúcar. *Rev. STAB* 6(1):10, 1987.
- VASIL, V.; VASIL, I.K.; ZUBERER, D.A. e HUBBELL, D. H. The biology of Azospirillum - Sugar cane association. I. Establishment of association in vitro. *Z. Pflanzenphysiol.* 95:141-47, 1979.
- VENTURA, W. e WATANABE, I. ^{15}N dilution technique of assaying nitrogen fixation in association with rice. *Philipp. Crop. Sci.*, 7:44-50, 1982.
- VERDADE, F.C. e KUPPER, A. Nitrogênio niftrico e amoniacal nas

Agave pluvialis, *Dracopis*, 14:11-3, 1955.

VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P.; VICTORIA R. L. e MATSUI, E.
Potential N₂-fixation by sugar cane, Saccharum sp. in
solution culture. I. Effect of NH₄⁺ vs. NO₃⁻, variety and
nitrogen level. In: Associative N₂ fixation, v.2. (VOSE, P.
B. e RUSCHEL, A.P. eds.). CRC Press, Florida, p. 119 - 25,
1981.

WAGNER, G.H. e ZAPATA, F. Field evaluation of reference crops
in the study of nitrogen fixation by legumes using isotope
techniques. *Agron. J.*, 74:607-12, 1982.

WALCOTT, J.J.; CHAUVIROJ, M.; CHINCHEST, A.; CHOTICHEVEY, P.;
FERRARIS, P. e NORMAN, B.W. Long term productivity of
intensive rice cropping systems on the Central Plain of
Thailand. *Exp. Agric.*, 13:305-16, 1977.

WANI, S.P.; DART, P.J. e UPADHYAYA, M.N. Factors affecting
nitrogenase activity associated with sorghum and millet
estimated using the soil core assay. *Can. J. Microbiol.*,
29:1063-69, 1983.

WATANABE, I.; LEE, K.K.; ALIMAGNO, B.V.; SATO, M.; ROSARIO,
D.C. e GUZMAN, E.M.R.de. Biological nitrogen fixation in
paddy field studied by in situ acetylene-reduction assays.
IRRI Res. Paper, Ser.3, 1:16, 1977.

WEIER, K.L. Nitrogenase activity associated with three
tropical grasses growing in undisturbed soil cores. *Soil*

Biol. Biochem., 12:131-36, 1980.

WEIER, K.L.; MACRAE, I.C. e WHITTLE, J. Seasonal variation in the nitrogenase activity of a Panicum maximum var. trichoglume pasture and identification of associated bacteria. Plant Soil, 43:189-98, 1981.

WITTY, J.F. Estimating N₂-fixation in the field using ¹⁵N-labelled fertilizer: some problems and solutions. Soil Biol. Biochem., 15(6):631-39, 1983.

WITTY, J.F. e RITZ, K. Slow release ¹⁵N fertilizer formulations to measure N₂-fixation by isotope dilution. Soil Biol. Biochem., 16:657-61, 1984.

YADAV, R.L. e SHARMA, R.K. Effect of nitrogen application to the plant crop of sugar cane on the yield and quality of the subsequent ratoon crop. Indian J. Agric. Sci., 53(1) : 38-43, 1983.

YOSHIDA, T. e ANCAJAS, R.R. Application of the acetylene reduction method in nitrogen fixation studies. Soil Sci. Nutr., 16:234-37, 1970.

YOSHIDA, T. e SUZUKI, M. Formation and degradation of ethylene in submerged rice soils. Soil Sci. Plant Nutr., 21:129-35, 1975.

YOSHIDA, T. e YONEYAMA, T. Atmospheric fixation in the flooded rice rhizosphere as determined by the ¹⁵N isotope

technique. Soil Sci. Plant Nutr., 26:551-60, 1980.

ZAMBELLO JR., E. e AZEREDO, D.F. Adubação na região Centro-Sul.

In: Nutrição e adubação da cana-de-açúcar no Brasil. (ORLANDO FILHO, S. ed.). IAA/Planalsucar, Piracicaba, p. 287-313, 1983.

ZAMBELLO JR., E. e ORLANDO FILHO, J. Adubação da cana-de-açúcar na região Centro-Sul do Brasil. Boletim Técnico Planalsucar, 3(3):1-26, 1981.