

CONTRIBUIÇÃO DA PESQUISA EM FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO PARA O DESENVOLVIMENTO DO BRASIL

Johanna Döbbereiner
Fernando Faria Duque*

1. INTRODUÇÃO

A escassez de energia, registrada pelos constantes aumentos do preço do petróleo, a partir da década de setenta, concorreu para onerar, em demasia, a produção industrial de fertilizantes nitrogenados. A crise mundial de alimentos também elevou os preços dos produtos agrícolas a níveis alarmantes. Por outro lado, o aumento da produtividade agrícola tem mostrado, principalmente nos países industrializados e no Oriente, uma correlação com o consumo de adubos nitrogenados (25). Segundo estimativas de HARRIS & HARRE (26), o consumo de nitrogênio em 1980, na América Latina, será de $2,7 \times 10^6$ toneladas aproximadamente. Desta forma, a deterioração do meio ambiente e o abastecimento inadequado de alimentos em várias regiões do mundo poderiam ser atribuídos, em parte, ao uso excessivo ou à falta de nitrogênio, respectivamente.

A perda progressiva do nitrogênio no sistema solo-planta, principalmente em regiões tropicais, se dá de várias maneiras como lavagens (lixiviação), remoção pelas colheitas, perdas por erosão, perdas pelo fogo, etc. Além disso, a intensificação do uso de adubos químicos e também da exploração agrícola, em geral, tem resultado numa carga muito pesada para o processo biológico que mantém o equilíbrio do nitrogênio na biosfera. A busca de alternativas que permitam a manutenção da fertilidade dos solos e o aumento da produtividade agrícola torna-se prioridade no mundo todo,

Mais recentemente, tecnologias, anteriormente conhecidas, têm sido utilizadas em maior escala, visando suprir biologicamente o nitrogênio necessário às plantas. De todos os sistemas capazes de fixar nitrogênio atmosférico, o mais perfeito e especializado é a simbiose leguminosa - **Rhizobium**, responsável pela maior parte do nitrogênio incorporado ao ecossistema e à produção de alimentos (20). Estimativas da participação da fixação biológica no balanço de nitrogênio na terra são resumidas no quadro 1.

* Respectivamente, Técnicos do Programa Fixação Biológica de Nitrogênio, EMBRAPA/SNLCS - CNPq.

QUADRO 1. Balanço de nitrogênio na terra (Delwiche 1970; Hardy and Holstem 1972)

| | Kg N/ha/ano valores médios | Total na terra tx10 ⁶ /ano |
|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|
| Fixação biológica de N ₂ | | |
| Leguminosas | | |
| Gramíneas | 15 | 45 |
| Arroz | 30 | 4 |
| Florestas | 10 | 40 |
| Outros | 5 | 5 |
| Fertilizantes* | | 53 |
| Descargas elétricas | | 7 |
| Provenientes da rocha | | 0,2 |
| Denitrificação | | |
| Terrestre | 3 | 43 |
| Marítima | 1 | 40 |
| Erosão | | 0,2 |

(*) A produção destes fertilizantes consome energia equivalentes a 0,8x10⁶ barris de petróleo por dia (2% do consumo total do País)

As quantidades de N₂, fixado biologicamente, são muito variáveis, não só pela heterogeneidade do meio ambiente, mas também, pelas poucas informações disponíveis (5). De acordo com trabalhos feitos nos EUA, a soja fixa apenas de 25 a 60% do nitrogênio necessário (25). No Brasil, entretanto, a soja está sendo plantada sem adubos nitrogenados; a simbiose obtém a maior parte do nitrogênio necessário. A pequena parcela que é retirada do solo é restituída novamente pela incorporação dos restos vegetais. Qualquer nitrogênio mineral, contido nas fórmulas de adubação atualmente, torna-se desnecessário.

Assim, a importância que a soja adquiriu no Brasil é um bom exemplo da contribuição da pesquisa sobre fixação de nitrogênio para o desenvolvimento. Considerando-se as estimativas para 1980, isto é, 10 milhões de hectares cultivados com a cultura de soja, é uma produção aproximada de 15 milhões de toneladas de grãos, e considerando-se, ainda, os teores de proteína e de N no grão em torno de 40% e 6%, respectivamente, obtêm-se 900.000 toneladas de N que são fixadas anualmente. Isto representa uma economia de 36 bilhões de cruzeiros ou 800 milhões de dólares, a um custo atual de Cr\$ 40.000,00 por tonelada de N. Resultados semelhantes podem ser obtidos considerando-se uma fixação de 90 kg de nitrogênio por hectare; em 10 milhões de hectares cultivados, o total seria de

900 mil toneladas de N. Esta enorme quantidade de nitrogênio que está sendo economizada pela soja somente no Brasil, corresponde a 30% do total de adubo previsto para a América Latina ($2,7 \times 10^6$ t).

Além da soja, outras leguminosas de grãos ou pastagens, usadas na produção direta ou indireta de óleos e proteínas, também poderão ser melhor exploradas, valendo-se da fixação biológica do nitrogênio. Dariam importantes economias ao país.

Além disto, as quantidades de nitrogênio, incorporadas ao solo através da fixação biológica, poderão ser aumentadas. Basta que se apliquem os conhecimentos já disponíveis, fornecidos pela pesquisa, e que se incentivem as investigações sobre vários outros aspectos relacionados com fixação biológica do nitrogênio.

2. CONTRIBUIÇÃO DA PESQUISA COM LEGUMINOSAS

As primeiras tentativas de incrementar a fixação de nitrogênio, através da inoculação da soja, feijão e trevos, foram feitas na década de 40 por José Gomes da Silva, no Instituto Agrônomo de Campinas, e por João Rui Jardim Freire, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul, que usaram inoculantes importados e reisolamentos nacionais. Nesta época, experimentos de rotação de cultura mostraram um efeito da inoculação da soja na produção de milho entre 20 e 40% (37). Houve também distribuição de inoculantes em pequena escala nos dois centros.

Nos anos 60, a Comissão Nacional de Soja recomendou que os trabalhos de melhoramento de soja fossem feitos sem adubação nitrogenada, considerando-se assim a característica importante da simbiose da soja nos programas de melhoramento. Foram feitos ainda, em dois anos consecutivos, Ensaios Nacionais de Inoculação de Soja nos quais os inoculantes importados foram comparados com os melhores nacionais. Esses ensaios mostraram a ineficiência quase que total dos inoculantes importados e deram ênfase, desde então, ao desenvolvimento de inoculantes adaptados aos solos, cultivares e clima brasileiros. Hoje, a indústria privada no Brasil representa o segundo maior volume de vendas de inoculantes no mundo, inferior apenas ao dos EUA.

A soja no Brasil somente chegou ao destaque que tem por ser uma cultura auto-suficiente em relação à adubação nitrogenada e isto porque, desde 1965, o melhoramento da soja, além de outros fatores essenciais, é feito no sentido de aperfeiçoar a simbiose com *Rhizobium* ao passo que nos EUA os melhoristas trabalham independentemente dos microbiologistas e a seleção de cultivares foi feita com elevadas dosagens de N mineral. Estimativas realizadas por HARDY & HAVELKA. (25) indicam que apenas 25% do nitrogênio necessário para elevadas produções de soja naquele país provém da fixação biológica.

Nas áreas de cerrado do Brasil, a expansão da fronteira agrícola foi conquistada principalmente pela cultura da soja. Nestas áreas se conseguem, hoje, produções de até 4.000 kg/ha sem o uso de nitrogênio mineral e em áreas de

lavoura extensiva. Esse êxito se deve, em parte, à introdução e seleção de variedades em níveis zero de nitrogênio, e à utilização de sementes inoculadas (17).

Por outro lado, a inoculação da soja tem proporcionado aumentos de produção já que esta planta requer estirpes específicas não somente para espécie, mas, ainda, para muitas cultivares, e responde dramaticamente à inoculação se as bactérias específicas -não estão presentes, em número suficiente no solo. A interação *Rhizobium* x cultivar fica bem ilustrada no quadro 2 (35). Os problemas da nodulação da soja, no primeiro ano de seu plantio, em áreas de cerrados, após solução preliminar empírica através de seleção de uma "superestirpe" (40), agora também já têm sua explicação científica. A microflora dos solos de cerrado tem composição distinta da de solos de cultura e é constituída de 74 a 97% de *Streptomyces* spp (8), microorganismos produtores de antibióticos como a estreptomicina. Através da caiação e adubação, estes solos sofrem profundas modificações no seu ecossistema que provocam um desequilíbrio microbiológico, e um acúmulo excessivo de antibióticos. A soja plantada nestes solos assimila concentrações de estreptomicina mais altas que em solos de cultura. Por isso, tornou-se necessária a seleção de mutantes de *Rhizobium*, resistentes a este antibiótico, a níveis altos. A "superestirpe" 29W posteriormente foi identificada como uma mutante espontânea deste tipo. É este um dos exemplos mais bonitos de como a pesquisa acadêmica, através da explicação dos fenômenos, leva a resultados muito mais bem fundados e, quase sempre, mais rapidamente.

QUADRO 2. Nodulação de três cultivares de soja em Latossolo Vermelho-Escuro de Cerrado (adaptado de Peres e Vidor 1980)

| Inoculante | Bragg | St ^a Rosa | IAC.2 |
|---------------------------|-------|----------------------|-------|
| Peso de nódulos (mg/vaso) | | | |
| Testemunha | 43 | 5 | 18 |
| 532 (RGS) | 168 | 154 | 28 |
| 1809 (Austrália) | 151 | 167 | 24 |
| 965 (Japão) | 152 | 117 | 112 |
| 29W (RJ)* | 285 | 314 | 172 |

(*) "Superestirpe" utilizada no inoculante comercial para cerrados e posteriormente identificada como resistente a 80 ppm de estreptomicina

O melhoramento do feijão no Brasil e no resto do mundo não considerou a capacidade desta planta de fixar o nitrogênio. Isto devido à sensibilidade desta planta a muitos fatores ambientais de um lado e, do outro, devido à suposição, principalmente nos países industrializados, de que o ciclo curto do feijão não permite a acumulação de quantidades de N suficientes a elevadas produções, através da fixação biológica (7). A pesquisa nos últimos anos no Brasil (18) e na Inglaterra, (Day comunicação pessoal) entretanto, mostrou a possibilidade do

fornecimento por fontes biológicas de todo o nitrogênio necessário para uma produção de feijão de 1.600 kg/ha. Isto representa quase três vezes a produção média do Brasil. O Centro Nacional de Feijão e Arroz já começou a trabalhar neste sentido.

Estudos sobre a interferência da acidez do solo (principalmente toxidez de Al e Mn) foram intensificados desde 1975. Diferenças entre genótipos de plantas foram identificadas. Foi demonstrado que um dos fatores limitantes da fixação de N_2 em feijão (*Phaseolus vulgaris*) é a dificuldade de assimilar molibdênio de solos ácidos, mesmo que este elemento tenha sido aplicado (fig. 1). Estudos da interação do metabolismo do nitrato do solo com a fixação de nitrogênio mostraram possibilidades de complementá-la com baixas dosagens de nitrogênio mineral, durante o enchimento do grão, mas não no início do ciclo (20).

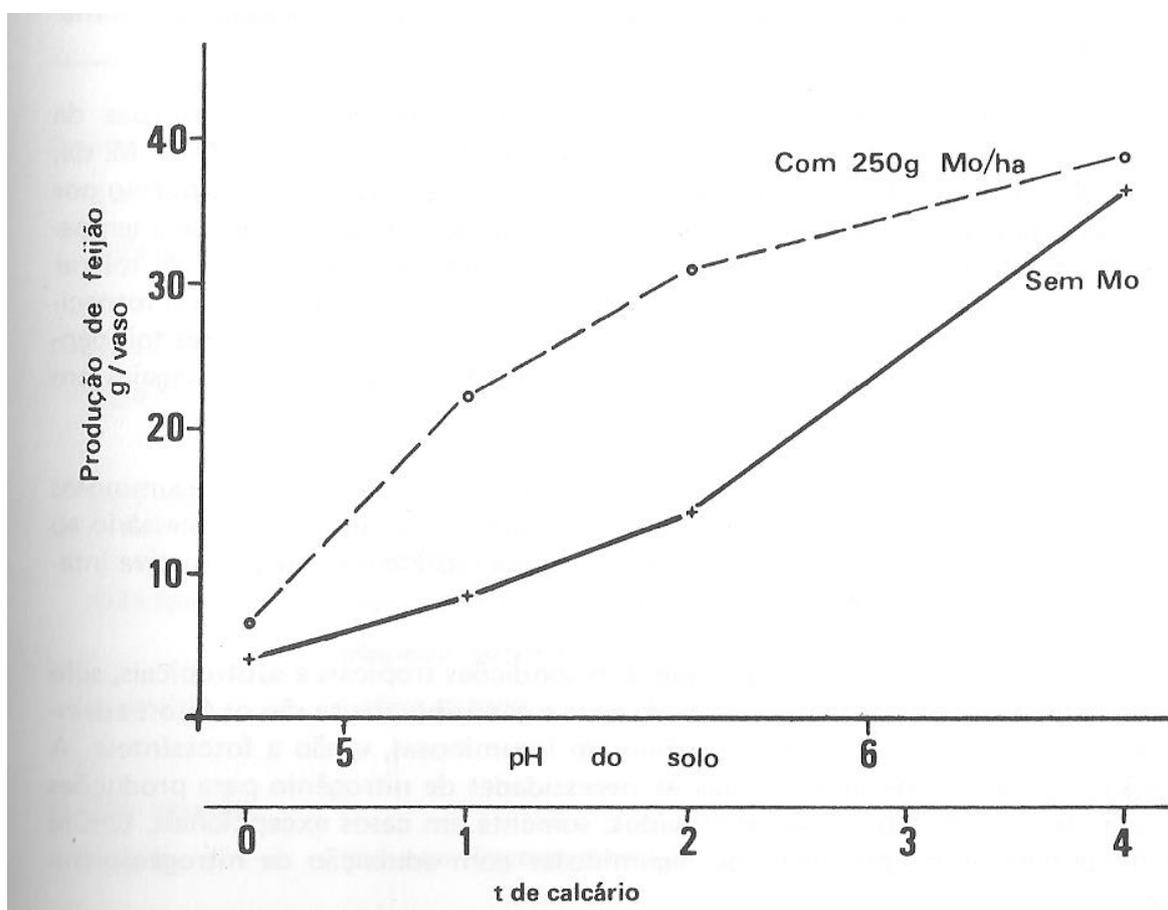


FIGURA 1. Efeito do cálcio e do molibdênio no rendimento do grão de feijão (grão seco) em solo podzólico vermelho amarelo

Nota: Cada valor representa a média de quatro vasos com três plantas cada. (Adaptado de Franco e Day, 1980).

Várias leguminosas forrageiras foram estudadas para estabelecimento, em pastagens de morro, com capim gordura (PVA). *Stylosanthes* foi estabelecido e perdurou durante quatro anos de pastoreio, quando semeado em covas somente com fosfato. *Siratro* e *Centrosema* somente perduraram se semeados com pellet

de micronutrientes (FTE) e fosfatos na cova (11), Graves problemas de deficiência de micronutrientes em vários outros solos PVA e LVA foram confirmados em experimentos de vasos, onde a aplicação somente do molibdênio dobrou a fixação de nitrogênio e a produção de leguminosas forrageiras. Efeitos altamente significativos foram ainda observados em experimentos fatoriais (10), (19) onde se constatou deficiência de zinco, ferro, boro e manganês, em solos deste tipo no Rio de Janeiro. É importante ressaltar que há deficiência de manganês nas encostas, e toxidez deste elemento em baixadas adjacentes.

Foi elaborado um teste biológico para avaliar deficiência de molibdênio, teste este que deu correlação altamente significativa com a resposta da planta (21). De acordo com análises efetuadas com este teste nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Sergipe, aproximadamente 50% dos solos são deficientes em Mo.

Outros experimentos mostraram possibilidades de selecionar estirpes de *Rhizobium* mais tolerantes a temperaturas excessivas do solo (Fonseca, O. O. M. da, Lee, K. K. e Franco, A. A. - Dados não publicados). A fixação de nitrogênio nos nódulos de feijão inoculado com os inoculantes habituais é prejudicada se a temperatura do solo ultrapassa 32°C, mas as estirpes selecionadas são capazes de tolerar 37°C ou mais. O papel do tamanho da semente e das folhas cotiledonais no fornecimento de material energético para a formação de nódulos em *Stylosanthes* foi identificado como fator decisivo do estabelecimento desta leguminosa forrageira em pastos já estabelecidos.

Foram ainda identificadas uma série de leguminosas florestais e leguminosas arbóreas forrageiras como a *Leucena*, capazes de obterem o nitrogênio necessário ao seu crescimento, através da fixação biológica, o que representa uma alternativa interessante para reflorestamento com eucalipto.

Resumindo, pode-se concluir que, sob condições tropicais e subtropicais, solo e fatores nutricionais, disponibilidade de água e genótipo planta são os fatores principais limitantes da fixação de nitrogênio em leguminosas, e não a fotossíntese. A fixação biológica pode cobrir todas as necessidades de nitrogênio para produções elevadas se aqueles fatores são eliminados; somente em casos excepcionais, têm-se obtido aumentos da produção de leguminosas com adubação de nitrogênio mineral.

3. CONTRIBUIÇÃO DA PESQUISA COM GRAMÍNEAS

Apesar da disponibilidade de leguminosas de grão, forrageiras e florestais, a extensão da fixação de nitrogênio aos cereais e gramíneas forrageiras tem sido o grande desafio da pesquisa no assunto. Mesmo quê apenas parte do nitrogênio possa ser fornecido pela associação com bactérias fixadoras deste elemento, a economia em adubos chegaria a proporções semelhantes às das leguminosas, devido à importância destas culturas. Fixação de nitrogênio em níveis economicamente interessantes foi demonstrada numa variedade de gramíneas e cereais (32), (15). Além de dados obtidos pelo método indireto da redução de acetileno (13), (6), (7), tem-se agora confirmação através da incorporação de

nitrogênio marcado ($^{15}\text{N}_2$) (12) e por estudos de avaliação direta do N assimilado (quadro 4). A bactéria responsável pelas associações mais importantes foi

QUADRO 3. Ganhos de nitrogênio sob gramíneas. Estiamtivas diretas através do incremento de N no sistema Solo-planta

| País ou região | Planta | Ganho de N kg/ha/ano | Observações | Referências |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Regiões temperadas | | | | |
| EUA (Pensylvania) | Pasto | 45 | Exp. Campo | white et al. 1945 |
| Inglaterra | Trigo consínuo | 34 | Exp. Broadbalk | Jenkinson, 1973 |
| Regiões subtropicais | | | | |
| EUA (Texas) | Pasto | 22-34 | Exp. Campo | Smith et al. 1954 |
| EUA (Georgia) | Pasto de zozia (Z. Matrela) | 73 | Vasos com 9kg de solo | Giddens, 1977 |
| EUA (Georgia) | Capim batatais (paspalum notatum) | 91 | Vasos com 9kg de solo | Giddens, 1977 |
| Australia | Lolium rigidum | 61 | Exp. Campo | Parker, 1957 |
| Regiões tropicais | | | | |
| Nigéria | (Cynodon Plectstachtris) | 90 | Exp. Campo | Jaiyeho e Moore, 1963 |
| Rhodésia | Paspalum urvillei | 303 ^a | Barri com 100kg de solo | Purchase, 1978 |
| Filipinas | Arroz (Orrhiza sativa) | 16 ^b -27 | Vasos com 10kg de solo | App, 1979 |

(a) Fixação do nitrogênio em seis meses do ano.

(b) Foram consideradas três colheitas/ano. Fixação de N_2 por bactérias apenas.

identificada como *Azospirillum* (syn. *Spirillum lipoferum*); infecta as raízes proliferando em espaços inter e entre-celulares (30). Em regiões tropicais, estas bactérias ocorrem em grande abundância, especialmente quando a terra é tomada por cultura e o equilíbrio natural é perturbado. Números na faixa de 10^7 ou 10^8 de células de *Azospirillum* por raízes ou solo podem ser encontrados durante todo o ciclo vegetativo de milho e sorgo (14). Raízes esterilizadas na superfície contêm menos bactérias no início do ciclo, mas os números aumentam durante o período reprodutivo quando a fixação de nitrogênio nas raízes de vários cereais atinge o seu máximo. Parece portanto que a fixação de nitrogênio ocorre principalmente no interior das raízes (30).

Uma vez estabelecidas associações de gramíneas e cereais com *Azospirillum*, foram iniciados trabalhos sobre a ecologia e fisiologia das associações para esclarecimento de seu mecanismo. Reclassificação das bactérias responsáveis com a criação de um novo gênero com duas espécies (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) foi necessária (39). E estudos da fisiologia da bactéria revelaram numerosos fatos interessantes.

Ambas as espécies podem dissimilar nitrato e nitrito, mas há um grupo dentro da espécie *A. brasilense* que não reduz nitrito a nitrogênio molecular. Com exceção deste grupo, as demais formas de *Azospirillum* são denitrificadores, isto é, além de fixarem nitrogênio, possuem o metabolismo para o processo oposto, que é a perda de nitrogênio mineral em forma gasosa. A dissimilação do nitrato, ou como também pode ser chamada a respiração de nitrato, por outro lado pode substituir o oxigênio para promover fixação de nitrogênio quando o oxigênio se torna escasso (32), (33). Vários tipos de mutantes de *Azospirillum* que perderam a nitrato e/ou a nitrito redutase foram obtidos, alguns dos quais capazes de fixar nitrogênio na presença de níveis elevados de nitrato no solo (29). Entendimento da interação de todas estas características representa a base do desenvolvimento de associações onde será possível complementar a fixação de nitrogênio com adubos nitrogenados minerais sem prejuízo para a primeira e com melhor aproveitamento dos últimos.

Recentemente, foi possível trazer a primeira evidência experimental sobre uma especificidade hospedeira na associação das gramíneas (3). Mesmo que a associação extremamente específica de *Paspalum notatum* com *Azotobacter paspali* já se conheça, há dez anos, tentativas iniciais de inocular gramíneas com *Azospirillum*, nos EUA, negligenciaram completamente a possibilidade de uma especificidade. Agora mostramos que, em um solo uniformemente inoculado, raízes de milho foram infectadas apenas por *A. lipoferum*, enquanto trigo e arroz selecionaram para *A. brasilense*. Ampliação destes estudos para o campo revelou a infestação de várias outras gramíneas C_4 por *A. lipoferum*, e dos cereais temperados por *A. brasilense* (quadro 4). Entre as estirpes isoladas de raízes de ambas as espécies predominaram formas não denitrificantes (2). Mas, além disto, as estirpes de *Azospirillum* isoladas de raízes de milho foram mais tolerantes à estreptomicina que as do solo ou da rizosfera (16). Isto foi explicado por uma multiplicação de actinomicetos produtores de estreptomicina na rizosfera de

QUADRO 4. Especificidade hospedeira a infecção de raízes por azospirillum spp. (Baldani e Döbereiner, 1980; Baldani et al. 1980; Boddey, 1980)

| Amostra | Tipo de fotossíntese | Nº de isolados | % de isolados de raízes ^b identificados como: | | |
|-----------------------|----------------------|----------------|--|----------------------|-----|
| | | | <i>A. lipoferum</i> | <i>A. brasilense</i> | |
| | | | | nir ^a | nir |
| Milho | C ₄ | 49 | 80 | 17 | 3 |
| Sorgo | C ₄ | 19 | 100 | 0 | 0 |
| Fornagem ^c | C ₄ | 45 | 93 | 0 | 7 |
| Cana | C ₄ | 24 | 0 | 0 | 100 |
| Tiririca | C ₄ | 7 | 100 | 0 | 0 |
| Arroz inundado | C ₃ | 56 | 0 | 7 | 93 |
| Arroz sequeiro | C ₃ | 22 | 7 | 13 | 80 |
| Trigo | C ₃ | 50 | 0 | 7 | 93 |
| Aveia | C ₃ | 5 | 20 | 0 | 80 |
| Centeio | C ₃ | 22 | 18 | 0 | 82 |
| Cevada | C ₃ | 11 | 18 | 0 | 82 |

(a) Inclui 34 amostras de Triidade

(b) Amostras de solos na maioria das colheitas continham os três tipos de Azospirillum spp.

(c) Panicum maximum, Cynodon doctylon, Pennisetum purpureon, Digitaria decumbens, Hemarthria altissima

diversos cereais e pela assimilação seletiva e ativa deste antibiótico pela planta. No solo, a estreptomocina é inativada dentro de horas e, portanto, não tem igual efeito. Estas observações, parcialmente já feitas por outros autores, muitos anos atrás, explicam ainda porque bacterioses, como ocorrem em batata ou tomate, podem ser combatidas eficientemente com rotação de cultura com milho, arroz e trigo. Como é relativamente fácil fazer bactérias resistentes a certos antibióticos, estas observações abrem um largo campo de possibilidades de manipular a microfiora do solo, e especificamente da rizosfera, e de introduzir bactérias desejadas.

Contudo, práticas fitotécnicas e fitogenéticas, adubação, tratos culturais, etc. têm de imediato possibilidades maiores de aumentar substancialmente a fixação de nitrogênio em gramíneas do que inoculação. De qualquer forma, o simples conhecimento da existência de fixação de nitrogênio em gramíneas e cereais deveria estimular reformulação dos níveis econômicos de fertilizantes e, certamente, desde já, contribui para economia considerável deste fertilizante mais caro.

4. ROTAÇÃO DE CULTURA BASEADA EM N DE FONTES BIOLÓGICAS

O aproveitamento da fixação biológica de nitrogênio em leguminosas e gramíneas, além do combate a doenças, representa a base para o

desenvolvimento de uma rotação de culturas altamente produtivas e quase que independente de fertilizantes nitrogenados, e ainda contribui para o melhoramento do solo. Um exemplo do efeito da incorporação de restos vegetais na produção de feijão é dado no quadro 5. Apesar da prevalência de monoculturas nas grandes áreas de cultura de soja e trigo, no Brasil, a pesquisa indica cada vez mais as vantagens do estabelecimento de rotações de cultura, de alta produtividade, que diminuem substancialmente os riscos devidos a doenças, condições climáticas e variações de mercado. Um exemplo, elaborado através do "Experimentos Centrais" no CPAC, seria: soja para abrir o cerrado; milho com 50 kg/ha de N, amendoim, arroz e três anos de pastagem intensiva de gramíneas consorciadas com leguminosas (*Stylosanthes* ou siratro). Nesta rotação de sete anos, seria utilizada apenas uma aplicação de 50 kg de N, havendo, todavia, necessidade de adubações normais (correspondentes às de monoculturas de cada componente) de fósforo e micronutrientes, principalmente Mo, que representa o elemento chave para a fixação biológica de nitrogênio.

QUADRO 5. Efeito da adubação verde de leguminosas ou sorgo na produção de feijão (Miyasaka et al. 1966)

| Adubo verde | Peso verde de material incorporado t/ha | Produção de feijão kg/ha |
|--------------------------|---|--------------------------|
| <i>Crotalaria Juncea</i> | 58 | 800 |
| <i>Cajanus cajan</i> | 25 | 637 |
| <i>Lablab purpureus</i> | 31 | 591 |
| <i>Tephrosia candida</i> | 14 | 609 |
| <i>Sorghum vulgare</i> | 56 | 416 |
| Testemunha | 0 | 418 |

(*) Médias de três experimentos em localidades diferentes no estado de São Paulo

5. PERSPECTIVAS E POTENCIAL

A maximização do "input" de nitrogênio em culturas e pastagens de leguminosa e gramíneas através da fixação biológica depende da definição, através da pesquisa, dos seguintes pontos para os principais tipos de solos e regiões: 1) Identificação e eliminação dos fatores limitantes, principalmente deficiências de P e Mo e toxidez de AI; 2) Observação das características relacionadas com o funcionamento da simbiose nos trabalhos de melhoramento de leguminosas. Aí, os fatores a considerar são: abundante modulação, elevada eficiência dos nódulos, nodulação precoce e tardia, interação da taxa de nitrogênio com a assimilação do nitrato do solo (nitrato redutase); tolerância dos nódulos a temperaturas elevadas, toxidez de Ai e baixo pH do solo. Melhoramento de cereais e gramíneas forrageiras com níveis baixos de nitrogênio será o primeiro passo para incrementar a fixação biológica nestas culturas; 3) Desenvolvimento de inoculantes específicos para leguminosas e gramíneas, observando-se os recentes descobrimentos em

relação à especificidade e às vantagens de competição de bactérias resistentes à estreptomicina e talvez a outros antibióticos; 4) Desenvolvimento de sistemas de produção que se baseiam integralmente, ou pelo menos em 75%, em fontes biológicas de nitrogênio. Estes sistemas devem visar alta produtividade além da rentabilidade.

6. PERSPECTIVAS

Acreditamos que será possível desenvolver para as diversas regiões brasileiras sistemas agrícolas com rotações de cultura que garantem um suprimento, de pelo menos 75%, do nitrogênio necessário, através da fixação biológica. Os cálculos apresentados no presente trabalho indicam que a economia, que o país faz somente com o plantio de soja, justifica já os investimentos em pesquisa agrícola anualmente.

7. INSTITUIÇÕES E RECURSOS HUMANOS

A pesquisa sobre fixação biológica de nitrogênio no Brasil foi iniciada por José Gomes da Silva, no I.A.C., e por João Rui Jardim Freire, na Secretaria de Agricultura do Rio Grande do Sul. Hoje, o maior centro de pesquisa no assunto, no país, é o Programa Fixação Biológica de Nitrogênio do SNLCS/EMBRAPA - CNPq, coordenado por Johanna Döbereiner. Este programa dá ainda assessoramento aos demais Centros da EMBRAPA que lidam com o assunto (destacam-se, em primeiro lugar, o CPAC, CNPFA, além dos grupos no INPA, UFPR, UFRGS, UFRJ e UFRRJ). Em Porto Alegre, há, sob a coordenação do J.R. Jardim Freire, um programa de treinamento da UNESCO-FAO (MI RCEN) que lida especificamente com assuntos práticos da produção e utilização de inoculantes para leguminosas. O CENA, em Piracicaba, concentra esforços na pesquisa com o isótopo pesado (ISN) e lida principalmente com cana-de-açúcar e feijão. Destacam-se, além dos coordenadores, os pesquisadores: Avílio A. Franco, Fernando F. Duque e Helvécio De-Polli no PFBN; José Roberto R. Peres, Milton Vargas e Aliert R. Suhett do CPAC; Kuk-Ki-Lee e Pedro A.A. Pereira no CNPFA; Ivanildo E. Marriel no CNPMS; Rosemary Silvester-Bradiey no INPA; Fábio O. Pedrosa na UFPR; Caio Vidor na UFRGS; Adam Drozdowicz da UFRJ; Maria Cristina P. Neves na UFRRJ; e Peter Vose e Alaidés P. Ruschel do CENA.

O treinamento deste pessoal se concentrou no PFBN e na UFRGS onde há seleção de alunos graduados com bolsas de iniciação científica do CNPq, estágios e pós-graduação no assunto. Grande número dos pesquisadores acima destacados fizeram mestrado ou doutoramento no exterior, em centros de excelência, selecionados através de contatos diretos dos Coordenadores.

No período de vigência do Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio até o presente, já foram publicados 115 trabalhos científicos em livros, revistas, anais e periódicos nacionais e internacionais, diretamente relacionados à fixação biológica do nitrogênio em gramíneas e leguminosas.

8. LITERATURA CITADA

1. APP, A. 1979. Nitrogen balance in Flooded rice. Intern. Workshop on Associative N₂ Fixation, Piracicaba, Brazil.
2. BALDANI, J.I., PEREIRA, P.A.A., ROCHA, R.E.M., DÖBEREINER, I. 1980. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp. em plantas com via fotossintética C3 e C4. *Pesq. agropec. bras.* (encaminhado para publicação).
3. BALDANI, V.L.D., DÖBEREINER, J. 1980. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.* (no prelo).
4. BODDEY, R.H. 1980. Biological nitrogen fixation in the rhizosphere of lowland rice. Ph.D. Thesis, Univ. West Indies, Trinidad.
5. BROSE, E. 1979. Importância das leguminosas hospedeiras. Curso Rápido em Tecnologia em *Rhizobium*. UNEP/UNESCO/ICROIIPAGRO. Porto Alegre, RS (Mimeo., 11 p.).
6. BULOW, J.F.W., VON DÖBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)* 72: 2389-2393.
7. BURTON, J.C. 1974. Pragmatic aspects of the *Rhizobium*: Leguminous plant association. In: *Proc. First Int. Symp. Nitrogen Fixation* (W.E. NeMon, C.J. Nyman, eds.). Washington State Univ. Press, pg. 429-446.
8. COELHO, R.R.R., DROZDOWICZ, A. 1978. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.* 15:45-73.
9. DEIWICHE, C.C. 1970. The nitrogen cycle. *Scient. Amer.* 223,136-147.
10. DE-POLLI, H., SUHET, A.R., FRANCO, A.A. 1975. Micronutrientes limitando a fixação de nitrogênio atmosférico e produção de Centrosem em solo podzólico vermelho amarelo. *An. XV Congr. Brasil. Ciên. Solo*, p. 152-156.
11. DE-POLLI, H., CARVALHO, S.R., LEMOS, P.F., FRANCO, A.A. 1977. Effect of micronutrients on establishment of tropical legumes and persistence on a red yellow Podzolic soil hill pasture. In: *Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics* (J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, eds.) *Basic Life sciences* 10, p. 339. Plenum Press, New York and London.
12. DE-POLLI, H., MATSUI, E., DOBEREINER, J., SALATI, E. 1977. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by ¹⁵N₂ incorporation. *Soil Biol. Biochem.* 9, 119-123.
13. DÖBEREINER, J., DAY, J.M. 1974. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. *Proc. Int. Symposium on Nitrogen Fixation* (W.E. Newton, C.J. Nyman, eds.) Washington State Univ. Press, Pullman, p. 518-538.
14. DÖBEREINER, I. 1977. Potential for nitrogen fixation in Tropical Legumes and Grasses. In: *Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics*. (J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, eds.) *Basic Life Sciences* 10, p. 13-24. Plenum Press, New York and London.
15. DÖBEREINER, I. 1979. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. *Interciência* 4, 200-205.

16. DÖBEREINER, I., BALDANI, V.L.D. 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25, 1264-1269.
17. DUQUE, F.F. 1973. Comportamento de cultivares de amendoim, feijão comum e soja no Distrito Federal. Imprensa Universitária da U.F.V., Viçosa. 69 p. (Tese de M.S.).
18. FRANCO, A.A., DAY, J.M. 1975. The role of lime and molybdenum on the symbiosis of *Phaseolus vulgaris*. 5th Am. Rhizobium Conf. Raleigh, N. Carolina, USA.
19. FRANCO, A.A. 1977. Micronutrient requirements of legume-Rhizobium symbiosis in the tropics. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. (J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, eds.) *Basic Life Sciences* 10, p. 191-208. Plenum Press, New York and London.
20. FRANCO, A.A., PEREIRA, J.C., NEYRA, C.A. 1977. Nitrogen utilization in *Phaseolus vulgaris* L. In: Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics. (J. Döbereiner, R.H. Burris, A. Hollaender, eds.) *Basic Life Sciences* 10, p. 335. Plenum Press, New York and London.
21. FRANCO, A.A., PERES, J.R.R., NERY, M. 1978. The use of *Azotobacter paspali* N₂-ase (C₂H₂ reduction activity) to measure molybdenum deficiency in soils. *Plant and Soil* 50, 1-11.
22. FRANCO, A.A., DAY, J.M. 1980. Effects of lime and molybdenum on modulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. Turrialba (no prelo).
23. , J. 1977. Nitrogen accumulation by grasses. *Ga. Agr. Research* 19, 12-13.
24. HARDY, R.W.F., HOLSTEN, R.D. 1972. Global nitrogen cycling: Pools, evolution, transformations, transfers, quantitation and research needs. *The Aquatic Environment: Microbial Transformations and Water Quality Management Implications*.
25. HARDY, R.W.F., HAVELKA, U.D. 1975. Nitrogen fixation research: A key to world food. *Science* 188, 633-643.
26. HARRIS, G.T., HARRE, E.A. 1979. World fertilizer situation and outlook 1978-1985. Intern. Fert. Dev. Center, Muscle Shoals, Alabama.
27. JAIYEBO, E.O., MOORE, A.W. 1963. Soil nitrogen accretion under different covers in a Tropical Rain-Forest Environment. *Nature*, 197, 317-318.
28. JENKINSON, D.S. 1973. Organic matter and nitrogen in soils of the Rothamsted classical experiments. *J. Sci. Food Agric.* 24, 1149-1150.
29. MAGALHÃES, L.M.S., NFYRA, C.A., DÖBEREINER, J. 1978. Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N₂-fixing *Azospirillum* spp. *Arch. Microbiol.* 117, 247-252.
30. MAGALHÃES, F.M.M., PATRIQUIN, D., DÖBEREINER, J. 1979. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Rev. Brasil. Biol.* 39, 587-596.
31. MIYASAKA, S., FREIRE, E.S., MASCARENHAS, H.A.A., NERY, C., SORDI, G. 1966. Efeito da adubação verde com uma gramínea e quatro leguminosas sobre a produção do feijoeiro "da sêca", em terra-roxa misturada. *Bragantia* 25, 277-290.

32. NEYRA, C.A., DÖBEREINER, J. 1977. Nitrogen fixation in grasses. *Advances in Agronomy* 29, 1-38.
33. NEYRA, C.A., DÖBEREINER, J., LALANDE, R., KNOWLES, R. 1977. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. *Can. J. Microbiol.* 23, 300-305.
34. PARKER, C.A. 1957. Non-symbiotic nitrogen-fixing bacteria in soil. III. Total nitrogen changes in a field soil. *J. Soil Sci.*, 8, 48-59.
35. PERES, J.R.R., VIDOR, C. 1980. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L) Merrill). *Pesq. Agropec. Bras.* (no prelo).
36. PURCHASE, B.S. 1978. A potential source of nitrogen for Rhodesian Agriculture. *Rhodesia Agric.* 75, 99-104.
37. SILVA, J.G. 1951. Estudos sobre inoculação de sementes de leguminosas realizados pelo Instituto Agrônomo do Estado de São Paulo. *An. III Reun. Bras. Ciên. Solo, Recife*, 297-300.
38. SMITH, R.M., THOMPSON, D.O., COLLIER, J.W., HERVEY, R.J. 1954. Soil organic matter, crop yields and land use in the Texas Blackland. *Soil Science* 77, 377-388.
39. TARRAND, J.J., KRIEG, N.R., DÖBEREINER, J. 1978. A taxonomic study of the spirillum lipoferum group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24, 967-980.
40. VARGAS, M.A.T., SUHET, A.R. 1980. Efeito de níveis e tipos de inoculantes da soja (*Glycine max*) cultivada em um solo de cerrados. *Pesq. agropec. bras.* (no prelo).
41. WHITE, J.W., HOLBEN, F.J., RICHER, A.C. 1945. Maintenance level of nitrogen and organic matter in Brassland and cultivated soils over periods of 54 and 72 years. *J. Amer. Soc. Agron.* 37, 21-33.