MEDIDA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO NITROGÊNIO MARCANDO-SE A ATMOSFERA DO SOLO COM $^{15}\text{N}_2$ A BAIXO ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO

PAULO CESAR OCHEUZE TRIVELIN

Orientador: PROF. DR. ENEAS SALATI

Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia. Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro - 1982

À memória de meu pai

Prof. Dr. Antônio Prates Trivelin,

MINHA HOMENAGEM ESPECIAL

À minha companheira

Eliana

e as minhas filhas

Vivian

Lilian

DEDICO

Ao Prof. Dr. Eneas Salati, pelo estímulo
e orientação e Dr. Eiichi Matsui e Dra.
Siu Mui Tsai Saito, pelas valiosas suges
tões, críticas e colaborações oferecidas
durante a execução deste trabalho, meu

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AGRADECIMENTOS

- À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP e aos Professores do Curso de Pós-Graduação de Solos e Nutrição de Plantas;
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, em especial à Divisão de Ciências Ambientais e Setor de Microbiologia do Solo, pelas condições oferecidas e apoio científico na execução deste trabalho;
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida;
- Ao Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola de Botucatu (UNESP) pelos afastamentos concedidos e que tornaram possível a realização deste trabalho;
- Ao Dr. Paulo Leonel Libardi pela colaboração e sugestões;
- Ao colega Dr. Reynaldo Luiz Victória pelas críticas e sugestões;
- Aos amigos José Aurélio Bonassi e Roberto Braidotti pela amizade e colaboração;
- Aos colegas do Departamento de Biofísica (IBBMA/UNESP) pelo estímulo;
- Ao desenhista Antonio Aparecido Martins pelos desenhos realizados;
- À secretária Neusa Maria Augusti pelos serviços detilográficos;

- Aos Srs. Benedito Herculano Davanzo e Celso Aguiar pelos serviços gráficos;
- Enfim, a todos aqueles que de uma ou outra maneira, colaboraram neste trabalho.

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	05
2.1. Determinação da fixação do N_2 pelo aumento no N-total - o método de Kjeldhal	05
2.2. Determinação da fixação do N_2 por análise gasométrica ...	08
2.3. Determinação da fixação do N_2 pela técnica de redução de acetileno	09
2.4. Determinação da fixação do N_2 com emprego de técnicas isotópicas	10
2.4.1. Medida da fixação do nitrogênio com atmosferas enriquecidas em $^{15}N_2$	12
2.4.2. Medida da fixação do N_2 atmosférico marcando-se o nitrogênio do solo	15
2.4.3. Uso das variações naturais de ^{15}N em estudos da fixação do N_2 atmosférico	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Solos e adubação	21

3.2. Plantas utilizadas e inoculação das sementes com <u>Rhizobium</u>	21
3.3. Experimentos desenvolvidos	22
3.3.1. Medida da fixação do N ₂ atmosférico no feijoeiro (<u>Phaseolus vulgaris</u> L.) cultivar Carioca, em condições de campo, usando atmosfera enriquecida em ¹⁵ N ₂	22
3.3.2. Medida da fixação do N ₂ atmosférico no feijoeiro (<u>Phaseolus vulgaris</u> L.) cultivar Carioca, em condições de casa de vegetação	29
3.3.2.1. Utilização de atmosfera enriquecida em ¹⁵ N ₂	29
3.3.2.2. Adição de ¹⁵ NH ₄ ⁺ ao solo e utilização do trigo como planta controle não fixadora do N ₂ simbiótico	36
3.3.3. Medida da fixação do N ₂ atmosférico na soja (<u>Glycine max</u> L. Merrill) isolinha nodulante Hardee D71-92 89, em condições de casa de vegetação	39
3.3.3.1. Utilização de atmosfera enriquecida em ¹⁵ N ₂	39

3.3.3.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e utilização da isolinha não nodulante de soja como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico	42
3.3.3.3. Uso das variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja nodulante e não nodulante	43
3.4. Controle fitossanitário	43
3.5. Obtenção do $^{15}\text{N}_2$ e preparo de atmosferas marcadas	45
3.6. Determinações em amostras de plantas	49
3.6.1. Massa de matéria seca	49
3.6.2. Teor de nitrogênio	49
3.6.3. Análises isotópicas de ^{15}N	49
3.7. Determinações em amostras de terra	50
3.8. Determinações das concentrações de N_2 , O_2 , Ar e CO_2 (% de volume) e de ^{15}N (átomos%) em amostras de gases	50
3.9. Medidas efetuadas	52
3.9.1. Fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro e soja, nos experimentos com atmosferas marcadas em $^{15}\text{N}_2$	52

3.9.1.1. Redução de acetileno	53
3.9.2. Fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro e soja nos experimentos com adição de $^{15}NH_4^+$ ao solo	53
3.9.2.1. Nitrogênio da planta proveniente do fertilizante	53
3.9.2.2. Eficiência de utilização do fertilizante	54
3.9.3. Fixação do N_2 atmosférico na soja. Uso das variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja nodulante e não nodulante	54
3.9.4. Fixação do N_2 atmosférico na soja. Determinação por diferença no N-total entre soja nodulante e não nodulante	55
3.10. Análises estatísticas	55
4. RESULTADOS	56
4.1. Fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro. Medida em condições de campo usando atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$	56
4.2. Medida da fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro, em condições de casa de vegetação	67

4.2.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	67
4.2.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e uso do trigo como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico	81
4.2.2.1. Cultivo de abril a junho em Latossolo Ver melho Amarelo, fase arenosa (LVA)	81
4.2.2.2. Cultivo de outubro a dezembro em Terra Ro xa Estruturada (TRE)	89
4.3. Medida da fixação do N_2 atmosférico na soja em condições de casa de vegetação	95
4.3.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	95
4.3.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e uso da isolinha não nodu lante da soja como planta controle	104
4.3.3. Uso das variações naturais de ^{15}N das isolinhas de soja nodulante e não nodulante	110
4.3.4. Determinação por diferença nos teores de nitrogê nio de isolinhas nodulantes e não nodulante da so ja	112
5. DISCUSSÃO	116

5.1. Metodologia de medida direta da fixação do dinitrogênio em leguminosa, por exposição radicular com $^{15}\text{N}_2$	116
5.2. Medida da fixação em leguminosas por diluição isotópica. O método de FRIED e MIDDELBOE (1977)	118
5.3. Fixação do N_2 no feijoeiro e soja	120
6. CONCLUSÕES	122
LITERATURA CITADA	125
APÊNDICES	137

LISTA DE TABELAS

página

Tabela 1. Análise de terra dos solos Terra Roxa Estruturada (TRE) e Latossolo Vermelho Amarelo (LVA), empregados no estudo da fixação simbiótica do dinitrogênio	21
Tabela 2. Quantidades em gramas de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas no preparo do $^{15}\text{N}_2$, para admissões no sistema de vasos com feijoeiro	35
Tabela 3. Épocas de cultivo de feijão e trigo, solos, número de vasos, épocas de adubação e dose de N aplicado, concentração de ^{15}N no adubo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e tempo de cultivo até a colheita, nos experimentos de medida da fixação do N_2 em feijoeiro com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo	38
Tabela 4. Quantidades em gramas de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas no preparo do $^{15}\text{N}_2$, para admissões no sistema de vasos com soja	41
Tabela 5. Época de cultivo de isolinhas de soja, solo, número de vasos, épocas de adubação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dose de N aplicado, concentração de ^{15}N no adubo e tempo de cultivo até a colheita, para o experimento de medida da fixação do N_2 na soja com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo	44

Tabela 6. Concentração de ^{15}N (átomos % excesso) no ar do solo a diferentes profundidades na câmara de medida da fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro, sob condições de campo	57
Tabela 7. Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de feijoeiro cultivado em condições de campo, na câmara de medida da fixação simbiótica do nitrogênio com atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	62
Tabela 8. Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de feijoeiro cultivado em condições de campo-controle	63
Tabela 9. Concentração de ^{15}N (átomos % excesso), nitrogênio total (mg/planta) e nitrogênio fixado (mg/planta e % do N-total) em feijoeiro cultivado em condições de campo, na câmara de medida da fixação simbiótica do nitrogênio, utilizando atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$ a 1,876 átomos % excesso (216 horas)	65
Tabela 10. Concentração de ^{15}N (átomos% exc.) na atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em contato com o sistema radicular do feijoeiro cultivado em vasos, durante 1145 horas	68
Tabela 11. Produção média de matéria seca e nitrogênio de feijoeiro cultivado em vasos com solos TRE e LVA para as condições: exposição radicular a atmosfera marcada com	

$^{15}\text{N}_2$ e ao ar atmosférico	72
Tabela 12. Concentrações médias de ^{15}N (átomos %) no feijoeiro (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) cultivado em vasos com solos TRE e LVA, para as condições: exposição das raízes a atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e ao ar atmosférico	74
Tabela 13. Concentração de ^{15}N (átomos %) do N-total e N-trocável (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) no solo TRE	75
Tabela 14. Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) em feijoeiro cultivado em vasos com solos TRE e LVA, aos 67 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	77
Tabela 15. Nitrogênio fixado (mg/vaso e % do N-total) em feijoeiro cultivado em dois solos aos 67 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	78
Tabela 16. Umidade % em volume (θ) dos solos TRE e LVA onde cultivou-se feijão expondo os sistemas radiculares ao $^{15}\text{N}_2$.	79
Tabela 17. Quantidade média de nitrogênio e concentração de ^{15}N em feijoeiro e trigo que receberam adubação com	

$(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (cultivo de abril a junho)	82
Tabela 18. Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do fertilizante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) em feijoeiro e trigo cultivados em Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa (cultivo de abril a junho)	84
Tabela 19. Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) em feijoeiro cultivado em vasos, com LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho) Determinação pelo método de diluição isotópica, com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora	86
Tabela 20. Nitrogênio fixado em feijoeiro cultivado em vasos com LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho). Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora	87
Tabela 21. Matéria seca e nitrogênio total de feijoeiro cultivado em LVA com e sem adubação nitrogenada equivalente a 20 kg/ha de N, aplicado no 19º dia do plantio (cultivo de abril a junho)	88

Tabela 22. Nitrogênio derivado da fixação, do fertilizante e do solo em feijoeiro cultivado em LVA (cultivo de abril a junho)	89
Tabela 23. Quantidades médias de nitrogênio e concentração de ^{15}N em feijoeiro e trigo adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (cultivo de outubro a dezembro)	90
Tabela 24. Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do fertilizante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) em feijoeiro e trigo cultivados em Terra Roxa Estruturada (cultivo de outubro a dezembro)	92
Tabela 25. Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) em feijoeiro cultivado em vasos com solo TRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro). Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora	93
Tabela 26. Nitrogênio fixado em feijoeiro cultivado em vasos, com solo TRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro). Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora	94

Tabela 27. Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) na atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em contato com o sistema radicular da soja, cultivada em vasos, durante 1097 horas (cultivo de outubro a dezembro)	96
Tabela 28. Quantidades médias de nitrogênio e concentração de ^{15}N na soja nodulante e não nodulante, cultivada sob condições de exposição radicular a atmosfera marcada com ^{15}N	98
Tabela 29. Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) na soja cultivada em vasos com solo TRE aos 70 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	99
Tabela 30. Nitrogênio fixado (mg de N/vaso e % do N-total) na soja cultivada em solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular a atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	101
Tabela 31. Umidade % em volume (θ) do solo TRE, onde cultivou-se a soja expondo os sistemas radiculares ao $^{15}\text{N}_2$	102
Tabela 32. Concentrações de ^{15}N (átomos %) do N-total e N-trocável (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) no solo TRE mantido por 45 dias sob atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	104

Tabela 33. Valores médios de nitrogênio e concentração de ^{15}N nas isolinhas de soja nodulante e não nodulante, que receberam ou não adubação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido a 5,89 átomos % de ^{15}N	105
Tabela 34. Nitrogênio na planta derivado do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) nas isolinhas de soja nodulante e não nodulante, cultivadas em vaso	107
Tabela 35. Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio derivado da fixação (%) na soja cultivada em vasos com solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, utilizando a soja não nodulante como planta controle não fixadora	108
Tabela 36. Nitrogênio fixado na soja cultivada em vasos com solo TRE aos 70 dias do plantio. Determinação pelo método de diluição isotópica, com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo empregando a soja não nodulante como planta controle não fixadora	109
Tabela 37. Nitrogênio derivado da fixação do fertilizante e do solo na soja cultivado em solo TRE	110

Tabela 38. Valores $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio total (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de isolinhas de soja nodulante e não nodulante, cultivadas em vasos com solo TRE, aos 70 dias do plantio	111
Tabela 39. Fixação do dinitrogênio na soja cultivada em solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação pelas variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja fixadora e não fixadora do N_2	113
Tabela 40. Nitrogênio fixado em soja cultivada em vasos com solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação por diferença no N-total com soja não nodulante para os tratamentos: sem adubação nitrogenada, adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (62,5 mg N/vaso), e com exposição a atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$	114

LISTA DE FIGURAS

	página
Figura 1. Câmara de medida da fixação do N_2 atmosférico em leguminosa	24
Figura 2. Ligações entre o reservatório de $^{15}N_2$ e a câmara de medida da fixação simbiótica em feijoeiro	26
Figura 3. Área experimental com feijoeiro aparecendo ao centro a câmara de medida da fixação	29
Figura 4. Sistema de controle da umidade do solo, em vasos fechados	31
Figura 5. Sistema para medida da fixação simbiótica do N_2 atmosférico em feijoeiro, usando atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$, em condições de casa de vegetação	33
Figura 6. Sistema de controle da umidade do solo em vasos	37
Figura 7. Sistema para medida da fixação simbiótica do N_2 atmosférico na soja, usando atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$, em condições de casa de vegetação	40
Figura 8. Sistema de obtenção do $^{15}N_2$ e de preparo da mistura de gases, do experimento de campo	46
Figura 9. Sistema de obtenção do $^{15}N_2$, para os experimentos conduzidos em casa de vegetação	48

Figura 10. Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) no ar do solo, às profundidades de 0, 5, 10, 20, 30 e 40 cm, em função do tempo, na câmara de medida de fixação do N_2 atmosférico	59
Figura 11. Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) do ar do solo em função da profundidade, na câmara de medida da fixação do N_2 , no tempo de 216 horas	60
Figura 12. Variação com o tempo e por planta da matéria seca de nódulos, e da atividade redutora da enzima nitrogenase no feijoeiro cultivado em condições de campo	66
Figura 13. Diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos, com feijoeiro cultivado em TRE	69
Figura 14. Diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos, com feijoeiro cultivado em LVA	70
Figura 15. Ganho em nitrogênio pela parte aérea, peso seco de nódulos e atividade redutora da nitrogenase de feijoeiro cultivado em vaso, em função do tempo	80
Figura 16. Funções exponenciais de diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos com soja	97
Figura 17. Matéria seca de nódulos e atividade redutora da nitrogenase em função do tempo, na soja cultivada em vaso	103

MEDIDA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO NITROGÊNIO MARCANDO-SE A ATMOSFERA DO SOLO COM $^{15}\text{N}_2$ A BAIXO ENRIQUECIMENTO ISOTÓPICO

Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

Eneas Salati
Orientador

RESUMO

Foi desenvolvida uma metodologia para medir diretamente a fixação simbiótica do nitrogênio, por todo o ciclo de leguminosas, marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento isotópico. Nas determinações no campo e em casa de vegetação estabeleceu-se o confinamento do solo explorado pelo sistema radicular das plantas, utilizando respectivamente uma câmara e vasos vedados, a fim de manter a atmosfera do solo marcada com $^{15}\text{N}_2$. A concentração média de ^{15}N no ar do solo, necessária no cálculo de medida da fixação do dinitrogênio, foi obtida por integração de funções exponenciais de diluição do isótopo, verificadas nos experimentos, a partir de análises isotópicas do N_2 da atmosfera do solo.

O experimento no campo com atmosfera marcada desenvolveu-se do 22º ao 31º dia do ciclo da cultura do feijoeiro, e foi possível determinar a fixação de 5,5 mg de N por planta (24% do N-total/planta).

Em experimentos com vasos foram feitas medidas integradas

da fixação de N nas culturas do feijoeiro (do 19º ao 67º dia do plantio) e da soja (do 24º ao 70º dia do plantio), marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$. Para o feijoeiro foi obtida a fixação de 80 mg de N/planta (65% do N-total/planta), e 265 mg de N/planta (71% do N-total/planta) para a soja.

No presente trabalho avaliou-se também a teoria básica do método de quantificação da fixação de N por diluição isotópica, proposto por FRIED e MIDDELBOE (1977), em experimentos com vasos.

Medidas simultâneas da fixação de N na soja utilizando os métodos: diluição isotópica de Fried e Middelboe, variação natural das razões $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e por diferença no N-total foram realizadas, e evidenciaram os mesmos resultados para as condições de experimentação em vaso, com as colheitas realizadas no final do ciclo das plantas.

DETERMINATION OF SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION BY LABELLING THE SOIL
ATMOSPHERE WITH $^{15}\text{N}_2$ AT LOW ISOTOPE ENRICHMENT

Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

Eneas Salati
Adviser

SUMMARY

A direct method to determine the total symbiotic nitrogen fixation during the leguminous plants cycles has been developed, by labelling the soil atmosphere with $^{15}\text{N}_2$ at low isotope enrichment, of about 1 atom % excess.

The soil explored by the root system of leguminous plants was confined by means of a chamber in the field and by sealed pots in greenhouse experiments in order to maintain the soil air labelled with $^{15}\text{N}_2$. The average ^{15}N concentration in the soil atmosphere, necessary to calculate dinitrogen fixation, was obtained by integration of the exponential functions of isotope dilution. Those functions were obtained by periodic sampling and analysis of the N_2 in the soil atmosphere.

The field experiment with labelled atmosphere was carried out from the 22nd to the 31st day of the bean crop cycle and 5.5 mg N/plant (24% of total plant N) was derived from fixation.

In pot experiments, under greenhouse conditions, integrated determination of fixation was made in Phaseolus beans (from the 19th to the 67th day from planting) and in soybeans (from the 24th to the 70th day from planting). The soil atmosphere was labelled with $^{15}\text{N}_2$ in both cases. Average fixation obtained for Phaseolus beans was 80 mg N/plant (65% of total plant N) and for soybeans 265 mg N/plant (71% of total plant N).

Evaluation of the basic concept of the isotope dilution method to determine nitrogen fixation in pots experiments, as proposed by Fried and Middelboe (1977) has also been made in the present paper.

Simultaneous determinations of fixation in soybeans, using the isotope dilution method of Fried and Middelboe, natural variation of the $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratios, and total-N differences, indicated the same results for pot experiments, harvested at the end of the plant cycle.

1. INTRODUÇÃO

A rotação de culturas através do uso alternativo de leguminosas e plantas não leguminosas é uma prática muito antiga. Os romanos escrevendo sobre a agricultura reconheciam que as leguminosas possuíam a propriedade de restaurar ou manter a fertilidade do solo, e que esta faculdade não era compartilhada por outros tipos de plantas (STANIER et alii, 1969).

Boussingault em 1937 afirmou que o nitrogênio obtido por plantas leguminosas era proveniente da atmosfera. O papel fixador de bactérias nos nódulos radiculares de leguminosas foi descoberto por Hellriegel e Wilfarth em 1886 (EPSTEIN, 1975).

As primeiras indicações da fixação do N_2 atmosférico em associações simbióticas foram obtidas por análise direta do N-total, mas a prova definitiva foi fornecida por BURRIS et alii (1943) utilizando a técnica isotópica com $^{15}N_2$.

A fixação do N_2 atmosférico por microrganismos vem desper-

tando a atenção de pesquisadores de diferentes áreas científicas. Em agricultura o estudo da fixação biológica do nitrogênio tem especial importância, uma vez que, o maior conhecimento do potencial de fixação em sistemas simbióticos ou não, pode ter influência marcante na produtividade de culturas de interesse econômico.

Muitos trabalhos foram desenvolvidos, objetivando o estabelecimento de métodos de avaliação da fixação biológica de N, com o propósito de se determinar com precisão a potencialidade dos sistemas fixadores. O método de Kjeldahl de análise direta do N-total foi inicialmente usado porém apresentou falhas.

A partir de trabalhos de Burris e colaboradores que foi o primeiro a utilizar a técnica com $^{15}\text{N}_2$ em estudos da fixação biológica do N_2 , essa passou a ser mais usada na identificação de sistemas biológicos fixadores, do que para quantificar o N-fixado por esses sistemas. A medida direta da fixação do dinitrogênio consiste em expor os sistemas fixadores ao $^{15}\text{N}_2$ altamente enriquecido, em condições controladas de laboratório.

A técnica de redução de acetileno em estudos de fixação biológica, tem sido largamente empregada na avaliação da atividade da enzima nitrogenase e em estimativas da fixação de N. Essa técnica apresenta elevada sensibilidade e rapidez nas determinações, porém possui limitações como método de medida da fixação do dinitrogênio.

A quantificação da fixação do dinitrogênio em leguminosas pode ser realizada por outros métodos que utilizam a técnica isotópica

com ^{15}N . Diversas pesquisas foram desenvolvidas empregando o método de FRIED e MIDDELBOE (1977). Por esse método a fixação do N_2 atmosférico é determinada utilizando princípios de diluição isotópica, entre culturas fixadoras e não fixadoras do N_2 simbiótico, adubadas com mesma taxa de fertilizante nitrogenado marcado com ^{15}N . Recentemente foi sugerido por diversos autores que a quantificação da fixação do dinitrogênio em leguminosas poderia ser realizada por diluição isotópica, considerando as variações naturais da razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) de isolinhas nodulante e não nodulante, cultivadas em mesmo local.

Tendo em vista que atualmente a maioria das pesquisas que necessitam quantificar a fixação em leguminosas são realizadas utilizando o método de FRIED e MIDDELBOE (1977), e considerando também que todos os métodos de medida da fixação de N_2 apresentam vantagens e limitações em diferentes condições de estudo, são objetivos do presente trabalho:

- a. Estabelecer uma metodologia de medida direta da fixação do dinitrogênio em leguminosas, cultivadas em condições de campo ou em vasos, por exposição radicular à atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento isotópico.
- b. Determinar pelo método direto a fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro e na soja, em período de tempo significativo do ciclo das culturas.
- c. Avaliar a teoria básica do método de FRIED e MIDDELBOE (1977) em experimentos de vaso com feijoeiro e soja, usando respectivamente como plantas controle não fixadoras o trigo e isolinha não nodulante da soja.

- d. Comparar medidas da fixação simbiótica de N no feijoeiro e na soja por diferentes métodos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A fixação biológica do N_2 atmosférico, demonstrada por Hellriegel e Wilfarth no final do século XIX, tem despertado atenção de pesquisadores de diferentes áreas científicas. Frequentemente, estudos sobre a fixação biológica do N_2 necessitam de estimativas da quantidade de nitrogênio fixado.

Medidas da fixação do nitrogênio podem ser realizadas com o emprego de métodos diretos e indiretos, mas a utilização desses em diferentes condições de estudo, permanecem como assunto aberto a discussões.

2.1. Determinação da fixação do N_2 pelo aumento no N-total - o método de Kjeldahl

As primeiras constatações da fixação biológica do N_2 atmosférico ocorreram com a detecção do aumento do nitrogênio em sistemas vivos, por análise direta do N-total. Esse método, segundo BERGERSEN(1973), foi inicialmente empregado na identificação de sistemas fixadores e na estimativa do ganho em nitrogênio combinado por esses sistemas.

A análise do N-total, pelo método de Kjeldahl, tem sido empregada em estudo da fixação biológica do nitrogênio como um método estimativo de medida do N-fixado (RENNIE et alii 1978).

A medida do N-fixado pelo aumento no teor de N-total, conforme BERGERSEN (1973), pode ser dificultada quando a quantidade corresponder a uma pequena fração do nitrogênio total; se ocorrerem perdas de N por processos biológicos ou físicos como: desnitrificação ou lixiviação, acarretando redução no teor de nitrogênio do sistema. Podem ocorrer erros analíticos na determinação do N-Kjeldahl, pela presença de compostos nitrogenados resistentes à análise química, assim como, erros devido à grande variabilidade do teor de N, no material biológico.

O método de Kjeldahl, segundo BURRIS (1974), é adequado na medida da fixação do dinitrogênio para tempos longos de exposição dos sistemas fixadores ao N₂ atmosférico, ou ainda, quando ocorrem significativas diferenças no N-total. O método, conforme BURRIS e WILSON (1957), não detecta variações menores que 1% no N-total, mesmo quando forem tomadas amostras uniformes.

Nos estudos com sistemas simbióticos leguminosa-Rhizobium, é necessário o uso de controles adequados para o desconto do nitrogênio proveniente do solo, sendo a determinação da porcentagem do nitrogênio fixado calculada pela equação 1 (RENNIE, 1979; RUSCHEL et alii, 1979b).

$$\text{N-fixado (\%)} = \frac{\text{N-total(f)} - \text{N-total(c)}}{\text{N-total(f)}} \cdot 100 \dots\dots (1)$$

significando: f - sistema ou planta fixadora de N₂ e c - sistema ou

planta não fixadora do N_2 (controle).

BELL e NUTMAN (1971) utilizaram como controle na medida da fixação do N_2 em lucerne, plantas obtidas de sementes inoculadas com estirpes inefetivas de Rhizobium. Sugeriram os autores, como controle, plantas não leguminosas que apresentassem necessidade em nitrogênio, semelhante às leguminosas não inoculadas.

RENNIE (1979) utilizou como controle na medida da fixação do N_2 em feijoeiro, plantas de feijão cultivadas em solo esterilizado. Com base em seus resultados concluiu que o método de análise do N-total fornecia uma estimativa grosseira da porcentagem de nitrogênio fixado, quando comparado com métodos isotópicos. Segundo o mesmo autor a limitação do método reside na suposição, que plantas fixadoras e não fixadoras devam assimilar idênticas quantidades do nitrogênio do solo e do fertilizante, para que a diferença no N-total entre elas, possa ser atribuída à fixação do N_2 atmosférico.

AMARGER et alii (1979) desenvolveram estudos comparativos entre os métodos: variação da abundância de ^{15}N e análise de N-total, na medida do N-fixado, cultivando soja inoculada e não inoculada com R. Japonicum, em solo onde a soja nunca tinha sido cultivada. Seus resultados experimentais demonstraram ocorrer menor absorção do N do solo por plantas inoculadas, fato esse que resultou em valores subestimados para a proporção do nitrogênio fixado determinado por diferença do N-total, com plantas não inoculadas.

Determinações da fixação do nitrogênio na soja, pelo

método de análise do N-total, têm sido realizadas utilizando-se de isolinhas nodulantes e não nodulantes, como apresentado por WEBER (1966) e HAM (1975 e 1978).

RUSCHEL, et alii (1979b) utilizaram isolinhas nodulantes e não nodulantes de soja com diferentes taxas de fertilização amoniacal, na comparação dos métodos de medida do N-fixado: diluição isotópica com ^{15}N e diferença no N-total. Observaram os autores que os resultados para porcentagem de N-fixado em plantas colhidas aos 75 dias do plantio, apresentavam-se semelhantes nos dois métodos, enquanto para colheitas aos 35 dias, a medida por diferença no N-total mostrava-se inadequada. Evidenciaram os autores, que o método por análise de N-total na medida do N-fixado, apresentava grande variabilidade com elevado erro padrão e diferenças significantes, quando comparado com o método isotópico.

Estimativas da fixação do N_2 baseadas na diferença de N-total e na abundância de ^{15}N , entre isolinhas nodulantes e não nodulantes foram determinadas por KOHL et alii (1980), que obtiveram resultados semelhantes pelos dois métodos e com mesmo erro padrão.

2.2. Determinação da fixação do N_2 por análise gasométrica

A análise gasométrica foi utilizada por Virtanen (1939) e Allison et alii (1942), citados por BURRIS e WILSON (1957), na determinação da fixação do nitrogênio. Esse método, que revelou ser de baixa precisão, baseava-se na variação da composição do N_2 da atmosfera em contato com os sistemas fixadores.

HURWITZ e WILSON (1940) desenvolveram o método manométrico, onde o O_2 e N_2 assimilados pelo sistema fixador em estudo, eram recolocados como O_2 . A medida da fixação era determinada pelo aumento da pO_2 na mistura gasosa.

O método manométrico, citado por BURRIS e WILSON (1957) e BERGERSEN (1973), apresenta-se com utilidade em estudos da fixação do N_2 , mas não pode ser comparado em exatidão e precisão com o método direto de redução do $^{15}N_2$.

WADA et alii (1979) fundamentados em medidas da razão N_2/Ar , na estimativa de taxas de desnitrificação, sugerem o uso dessa razão em estimativas da fixação do N_2 .

2.3. Determinação da fixação do N_2 pela técnica de redução de acetileno

A técnica de redução de acetileno no estudo da fixação biológica do nitrogênio, envolve análise por cromatografia de gás do etileno produzido, quando sistemas fixadores de N_2 são expostos ao gás acetileno. Essa técnica tem sido largamente empregada na avaliação da atividade da enzima nitrogenase, e na determinação de medidas estimativas da fixação do dinitrogênio, por meio da conversão teórica de 3:1, para $C_2H_2 : N_2$. Essa técnica é de elevada sensibilidade e rapidez nas determinações, porém para medidas da fixação do dinitrogênio apresenta limitações por tratar-se de um método indireto (HARDY et alii, 1968, BREMNER, 1975, SAITO et alii, 1980).

Grande número de trabalhos de pesquisa em estudos da fixação biológica do N_2 atmosférico, utilizaram-se da técnica de redução de acetileno em determinações do N-fixado, usando o fator teórico de conversão 3:1. BURRIS (1972 e 1974) criticou esse procedimento, chamando a atenção dos pesquisadores que deveriam procurar estabelecer fatores de conversão específicos, para as condições experimentais, comparáveis com o método direto de redução do $^{15}N_2$.

HARDY et alii (1973) relacionaram da literatura fatores de conversão utilizados no cálculo da fixação do N_2 , pela técnica de redução de acetileno. Para leguminosas a média dos fatores determinados experimentalmente foi de 3,4:1, para a nitrogenase in vitro 3,6:1, para bactérias fixadoras 4,3:1, e 2,4:1 para plantas não leguminosas. A maior parte dos fatores para solos, apresentavam-se entre 3,0 e 6,3:1, mas valores elevados como 25:1 também tinham sido obtidos, sob condições de anaerobiose. Dentre os fatores encontrados na literatura e citados por HARDY et alii (1973, poucos tinham sido estabelecidos por comparação entre redução de acetileno e $^{15}N_2$.

2.4. Determinação da fixação do N_2 com emprego de técnicas isotópicas

O primeiro relato do uso de traçador isotópico em estudos de fixação biológica deve-se a RUBEN et alii (1940), que obtiveram evidências de fixação em folhas de cevada fazendo uso do radioisótopo ^{13}N .

Dentre os radioisótopos de nitrogênio o ^{13}N é aquele que apresenta meia vida mais longa (10,05 minutos), possuindo os demais meia vida de segundos ou frações do segundo (HEATH, 1973). Sendo assim, o ^{13}N

é o único radioisótopo de nitrogênio com possibilidade de ser empregado como traçador em pesquisas biológicas, em estudos onde sua meia vida não represente um fator limitante. Outros aspectos que restringem o uso do ^{13}N em estudos de fixação biológica, referem-se aos equipamentos sofisticados para produção e purificação do gás $^{13}\text{N}_2$ (BREMNER, 1975; HAUCK e BREMNER, 1976).

Trabalhos apresentados por NICHOLAS et alii (1961) e CAMPBELL et alii (1967) relatam a utilização do $^{13}\text{N}_2$ em estudos da fixação biológica do N_2 e alguns detalhes da produção do radioisótopo.

O ^{13}N , embora se apresente como um radioisótopo de meia vida curta, trata-se de importante traçador em estudos com microrganismos que apresentem baixa taxa de fixação do dinitrogênio, devido à elevada sensibilidade das técnicas de detecção para radioisótopo (BREMNER, 1975, HAUCK e BREMNER, 1976).

Após a verificação da ocorrência natural e da baixa abundância do isótopo estável ^{15}N por NAUDÉ (1930), e a obtenção de compostos químicos enriquecidos nesse isótopo, BURRIS e MILLER (1941) foram os primeiros a indicarem a utilização do ^{15}N como traçador em estudos da fixação biológica do N_2 atmosférico. Segundo esses autores, o emprego do $^{15}\text{N}_2$ viria confirmar e descobrir muitos organismos fixadores, além de possibilitar a medida direta da fixação do N_2 atmosférico, por microrganismos associados às plantas ou em culturas puras.

BURRIS et alii (1943) utilizaram o $^{15}\text{N}_2$ para demonstrar que a fixação em leguminosas dava-se nas estruturas nodulares das raízes,

e o nitrogênio fixado era translocado para a parte aérea.

2.4.1. Medida da fixação do dinitrogênio com atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$

O uso de atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$, segundo BURRIS (1974), deve ser considerado o método padrão na avaliação de outros métodos de medida da fixação biológica do N_2 , por se constituir em método absoluto não sujeito a fatores de correção, e com sensibilidade relativamente alta.

BURRIS e WILSON (1957); BURRIS (1972 e 1974) e BERGERSEN (1973) fornecem detalhes do preparo de atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$ e seu uso em estudos da fixação do N_2 atmosférico.

Em princípio, o método consiste em expor os sistemas fixadores à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por um período de tempo determinado. Tratando-se de plantas onde os sítios fixadores são os nódulos radiculares, somente as raízes devem ser expostas ao $^{15}\text{N}_2$ (HAUCK e BREMNER, 1976).

A porcentagem do nitrogênio da planta proveniente da fixação, durante o período experimental, é determinada no método com atmosfera enriquecida em ^{15}N por meio da equação 2, obtida por princípios de di luição isotópica.

$$\text{N-fixado (\%)} = \frac{\text{átomos \% } ^{15}\text{N} \text{ excesso na planta fixadora}}{\text{átomos \% } ^{15}\text{N} \text{ excesso no gás } \text{N}_2} \times 100 \dots (2)$$

O método com atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$ vem sendo em

pregado no estudo da fixação biológica do nitrogênio a partir dos trabalhos pioneiros de BURRIS e colaboradores, como um método de medida do N-fixado, fornecendo provas definitivas da fixação em diferentes sistemas.

Fazendo uso desse método VIRTANEN et alii (1954) encontraram evidências de fixação em nódulos radiculares de Alnus; STEVENSON (1958) realizou testes e verificou a ocorrência de fixação em plantas não nodulantes; ROSS et alii (1964) estudaram a fixação do N_2 atmosférico em Phaseolus atropurpureus; utilizando câmaras de crescimento com N_2 enriquecido a 3,4; 4,1 e 7,1 átomos % em ^{15}N , MAYLAND e McINTOSH (1966) encontraram evidências de fixação em gramíneas do deserto.

Em nosso meio, destacam-se os trabalhos desenvolvidos no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba-SP por VICTÓRIA (1975), que utilizou de atmosferas contendo $^{15}N_2$ com baixo enriquecimento, em testes de fixação simbiótica com feijoeiro; RUSCHEL (1975) e RUSCHEL et alii (1975) forneceram evidências da fixação do dinitrogênio associada à cana-de-açúcar; determinações da fixação do N_2 atmosférico em gramíneas tropicais foram apresentadas por De-POLLI (1975) e De-POLLI et alii (1977); SAITO (1978) e SAITO et alii (1980) desenvolveram estudos onde a fixação do $^{15}N_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro foram relacionados; RUSCHEL et alii (1979a) estudaram o enriquecimento do nitrogênio do solo e da planta, na simbiose Rhizobium phaseoli - Phaseolus vulgaris, utilizando atmosferas enriquecidas em $^{15}N_2$; e MATSUI et alii (1981) demonstraram ocorrer enriquecimento de ^{15}N na rizosfera da cana-de-açúcar, em determinação realizada no campo utilizando $^{15}N_2$.

A desvantagem que se apresenta como fator limitante no uso de atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$ na medida da fixação biológica do nitrogênio, segundo HAUCK (1973) é o custo do isótopo, pois geralmente trabalha-se com altos enriquecimentos de ^{15}N , além de não poder ser utilizado em escala de campo.

HAUCK e BREMNER (1976) sugerem que atmosferas contendo 10 a 30% de N_2 seriam suficientes para saturar a nitrogenase, reduzindo os custos com o isótopo ^{15}N .

VICTÓRIA (1975) obteve resultados significativos da fixação do N_2 em feijoeiro, utilizando baixas concentrações de ^{15}N em experimentos desenvolvidos sob condições controladas de laboratório.

WITTY e DAY (1978) descrevem o método de avaliação da fixação do dinitrogênio em sistemas assimióticos, por exposição ao $^{15}\text{N}_2$.

A marcação da atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ em estudos da fixação do dinitrogênio em leguminosas foi realizada por MONTANGE et alii (1981). Os autores obtiveram medidas da fixação em feijoeiro e trevo, mantendo o sistema radicular das plantas confinado em atmosferas enriquecidas a 10 e 5 átomos % em ^{15}N , por 7 horas.

As duas maiores limitações no uso de atmosferas com $^{15}\text{N}_2$ em estudos da fixação do dinitrogênio, de acordo com VOSE et alii (1981), residem na utilização de poucas plantas em sistemas controlados, e a problemas relativos ao emprego dessa técnica em condições de campo.

2.4.2. Medida da fixação do N_2 atmosférico marcando-se o nitrogênio do solo

As dificuldades na utilização de atmosferas marcadas com $^{15}N_2$ em estudos da fixação do dinitrogênio, principalmente em condições de campo, fizeram com que outros métodos fossem propostos empregando o ^{15}N como traçador.

Vallis et alii (1967), citado por VOSE et alii (1981), sugeriram que a diluição isotópica do nitrogênio absorvido do solo por plantas fixadoras, poderia fornecer um meio de quantificar a fixação do dinitrogênio.

O conceito de valor "A" introduzido por FRIED e DEAN(1952), foi aproveitado por FRIED e BROESHART (1975) para quantificar o N-fixado em leguminosas cultivadas em condições de campo. Em seus experimentos FRIED e BROESHART (1975) utilizaram de culturas fixadoras e não fixadoras do dinitrogênio que receberam diferentes taxas de fertilizante nitrogenado, marcado com ^{15}N . O N_2 fixado foi calculado pela equação 3.

$$N_2 \text{ fixado (kg/ha)} = \left["A" \text{ planta fix. (kg/ha)} - "A" \text{ planta não fix. (kg/ha)} \right] .$$

$$\frac{[NPF \times N\text{-total}] \text{ planta fixadora (kg/ha)}}{[Taxa de N aplicado como fertilizante na cultura fixadora] \text{ (kg/ha)}} \dots$$

..... (3)

onde:

NPF = fração do nitrogênio da planta derivada do fertilizante.

A única suposição básica do método, segundo os autores, é aquela da determinação do valor "A", a qual: "quando duas fontes de um nutriente estão presentes no solo, uma planta absorverá o nutriente das fontes numa proporção direta às quantidades disponíveis".

A marcação do nitrogênio do solo com ^{15}N foi realizado por LEGG e SLOGER (1975) que aplicaram o princípio de diluição isotópica na medida da fixação do dinitrogênio na soja. Foi considerado pelos autores que as plantas dispunham de duas fontes de nitrogênio: o solo e a atmosfera, e dessa forma, a fixação do N_2 foi calculada pela equação 4, tomando-se como planta teste não fixadora uma isolinha não nodulante de soja.

$$\% \text{ N-fixado} = \left[1 - \frac{(\text{átomos} \% ^{15}\text{N exc.}) \text{soja nodulante}}{(\text{átomos} \% ^{15}\text{N exc.}) \text{soja não nodulante}} \right] \times 100 \dots\dots (4)$$

FRIED e MIDDELBOE (1977) relataram que estimativas da fixação do N_2 poderiam ser feitas através da expressão 5, obtida por simplificação da equação 3, quando a mesma taxa de fertilizante nitrogenado com concentração igual em ^{15}N fosse aplicada nas culturas fixadora e não fixadora do dinitrogênio.

$$\text{N-fixado} = \left[1 - \frac{(\text{átomos} \% ^{15}\text{N exc.}) \text{cult. fix.}}{(\text{átomos} \% ^{15}\text{N exc.}) \text{cult. não fix.}} \right] \cdot (\text{N-total}) \text{cult. fix.} \dots (5)$$

O método de quantificação da fixação do N_2 atmosférico em leguminosas, usando fertilizante marcado com ^{15}N foi discutido por RENNIE et alii (1978), VOSE et alii (1978), RENNIE (1979), RUSCHEL et alii (1979b) e VOSE et alii (1981).

SAITO et alii (1981) estimou, pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ e $^{15}\text{NO}_3^-$ ao solo, a fixação do N_2 em feijoeiro cultivado em vasos. Foi utilizado, nesses estudos, o trigo como planta controle não fixadora.

RUSCHEL et alii (1982) estimaram a fixação em condições de campo de cinco cultivares de feijão, usando o método de FRIED e MIDDELBOE (1977). Como planta teste não fixadora foi utilizado o trigo anão. Segundo esses autores, o principal fator, que deve ser considerado como fonte de erro em experimentos que utilizam uma outra espécie como planta controle não fixadora, refere-se às diferenças na exploração de volumes do solo pelas culturas.

2.4.3. Uso das variações naturais de ^{15}N em estudos da fixação do N_2 atmosférico

A existência de diferenças na abundância natural de ^{15}N entre plantas fixadoras e não fixadoras do N_2 atmosférico, cultivadas em mesmo local, foram constatadas por DELWICHE e STEYN (1970), RENNIE et alii (1976), AMARGER et alii (1977), AMARGER et alii (1979), entre outros. Como as plantas fixadoras apresentavam menor concentração de ^{15}N em relação às não fixadoras, foi sugerido o uso dessas variações em estimativas da contribuição da fixação simbiótica do N_2 .

Segundo KOHL et alii (1980), estimativas da fixação do N_2 atmosférico em leguminosas por esse método requer que haja uma diferença mensurável na abundância de ^{15}N entre as duas maiores fontes de nitrogênio para as plantas fixadoras (N_2 atmosférico e N do solo), e também, que

essa diferença mantenha-se sem alteração da abundância de ^{15}N , resultante da discriminação isotópica na absorção do N do solo pelas plantas (KOHL e SHEARER, 1980).

A suposição básica que se faz em pesquisas de avaliação da fixação biológica do N_2 com o emprego de técnicas isotópicas, segundo HAUCK e BREMNER (1976), é que não ocorra discriminação entre os isótopos ^{14}N e ^{15}N pelos sistemas fixadores.

DELWICHE e STEYN (1970) determinaram os fatores de fracionamento (equação 6) 1,0031 a 1,0054, associados à fixação do N_2 em Azoto bacter vinelandii. Esses resultados indicavam que a fixação do ^{14}N era levemente favorecida.

$$\beta = \frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) \text{ atmosfera}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) \text{ sistema fixador}} \dots\dots\dots (6)$$

O fator de fracionamento de 1,0038 para soja cultivada em solução nutritiva de Hoagland livre de nitrogênio, foi obtida por Bardin et alii (1977), citado por RENNIE et alii (1978).

AMARGER et alii (1977) obtiveram o fator de $1,0009 \pm 0,0001$ para fixação do N_2 em Lipinus luteus, enquanto AMARGER et alii (1979) determinaram para quatro variedades de soja os fatores de fracionamento de $1,0012 \pm 0,002$; $1,0015 \pm 0,0004$; $1,0016 \pm 0,0002$ e $1,0013 \pm 0,0001$.

Fatores de fracionamento associados à fixação simbiótica do N_2 em soja e trevo vermelho determinados por KOHL e SHEARER (1980), revelaram os valores de $0,99902 \pm 0,00018$ e $0,99812 \pm 0,00014$ respectivamente.

Esses autores justificaram os fatores inversos encontrados, como devidos a inclusão de raízes e nódulos na determinação do valor $\delta^{15}\text{N}$ para a planta toda, não consideradas nas determinações de Bardin et alii (1977) e AMARGER et alii (1979).

A discrepância nos fatores de fracionamento associados à fixação do N_2 obtidos por KOHL e SHEARER (1980), deveu-se ao elevado valor $\delta^{15}\text{N}$ dos nódulos em comparação às demais partes da planta, como bem evidenciado no trabalho de SHEARER et alii (1980). Segundo esses últimos autores, o enriquecimento de ^{15}N em nódulos de soja pode ser devido ao processo de desnitrificação desenvolvido por algumas estirpes de Rhizobium, como demonstrado por Zablotowicz et alii (1978). O fracionamento isotópico associado à desnitrificação resulta no enriquecimento de ^{15}N do substrato residual, conforme verificado por DELWICHE e STEYN (1970).

AMARGER et alii (1979) verificaram que grãos de soja colhidos na maturidade, apresentavam-se levemente desenriquecidos em ^{15}N , quando comparados a outras partes da planta acima do solo. Esses autores sugeriram que a diferença observada poderia ser devida ao fracionamento isotópico ocorrido durante a maturação das sementes.

Recentemente SHEARER et alii (1982) sugeriram que a síntese e o transporte de ureídeos (alantoina e ácido alantoico) em algumas leguminosas noduladas, teriam relação com o enriquecimento de ^{15}N dos nódulos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Solos e adubação

Os solos utilizados foram o latossolo Vermelho Amarelo, fa-
ze arenosa (Haplustox) e Terra Roxa Estruturada (Oxic Paleudalf). A aná-
lise química de terra dos solos apresentou os valores contidos na Tabe-
la 1.

Nos experimentos foram feitas adubações com superfosfato
simples e cloreto de potássio, em quantidades equivalentes a 150 kg/ha de
 P_2O_5 e 50 kg/ha de K_2O .

A adubação nitrogenada com sulfato de amônio enriquecido
em ^{15}N , em dose equivalente a 25 kg/ha de N, foi realizada nos experimen-
tos que requereram marcação do nitrogênio do solo.

3.2. Plantas utilizadas e inoculação das sementes com Rhizobium

Os estudos de medida da fixação simbiótica do nitrogênio
atmosférico foram desenvolvidos com a cultura do feijão (Phaseolus vulga-

Tabela 1 - Análise de terra * dos solos Terra Roxa Estruturada (TRE) e Latossolo Vermelho Amarelo (LVA), empregados no estudo da fixação simbiótica do dinitrogênio.

Solo	Determinações em terra fina seca ao ar							
	pH	Matéria orgânica (%)	Teor trocável em meq/100 g de terra					
			H ⁺	Al ³⁺	K ⁺	PO ₄ ³⁻	Ca ²⁺	Mg ²⁺
LVA	5,20	1,085	4,76	0,88	0,077	0,066	0,500	0,171
TRE	6,30	1,085	3,04	0,24	0,720	0,252	3,250	1,198

*Realizado na Seção Técnica "Fertilizantes, Fertilidade do Solo do Departamento de Ciências do Solo do FCA - Campus de Botucatu - UNESP.

ris L.) cultivar Carioca e soja (glycine max L. Merrill) isolinha nodulante Hardee D71-9289. Como culturas controles não fixadoras do nitrogênio, foram utilizadas o trigo (Triticum aestivum L.) linhagem TICENA-9 e soja (Glycine max L. Merrill) isolinha não nodulante Hardee D71-9291.

Sementes de feijão e trigo foram fornecidas pela Seção de Radiogenética do CENA-Piracicaba-SP, e das isolinhas de soja obtidas junto ao Centro Nacional da Soja da EMBRAPA-Londrina-PR.

A inoculação das sementes com Rhizobium foi realizada pela Seção de Microbiologia do Solo do CENA-Piracicaba-SP. No estudo em condição de campo, as sementes de feijão foram inoculadas com estirpes de Rhizobium phaseoli C-05 (CENA-SP); nos estudos em casa de vegetação a inoculação foi feita com mistura em proporções iguais das estirpes C-05 e C-40 (CIAT-255, Colômbia). Na inoculação de sementes de soja nodulante foi utilizada a mistura em proporções iguais das estirpes 29W (PNPBS-EMBRAPA, RJ) e SEMIA-587 (IPAGRO-SP) de Rhizobium japonicum. As sementes foram recobertas com carbonato de cálcio e levadas para a semeadura.

3.3. Experimentos desenvolvidos

3.3.1. Medida da fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) cultivar Carioca, em condições de campo, usando atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$

Instalou-se a câmara para medida da fixação do N_2 atmosférico no centro de uma área de 25 m², de solo Terra Roxa Estruturada, em local pertencente ao campo experimental, do Posto Meteorológico do Depar-

tamento de Física e Meteorologia da ESALQ/USP de Piracicaba-SP.

A Figura 1 apresenta esquemas da câmara com equipamentos para medida de temperatura e umidade de solo, e coletores de amostras do ar do solo. A câmara foi construída de chapa galvanizada de 0,7 mm de espessura e dimensões 1 x 0,3 x 0,5 m estando a sua parte inferior dentro do corpo do solo, aberta para livre movimentação vertical de gases a água, e a superior ao nível da superfície do solo, fechada.

Antes do plantio na área de 25 m², foi realizado o preparo da terra e adubação com superfosfato simples e cloreto de potássio. No plantio as sementes de feijão cultivar Carioca, inoculadas com Rhizobium, foram semeadas em covas distanciadas de 0,2 m, com espaçamento de 0,4 m entre linhas. Na câmara plantaram-se duas sementes por cova distanciadas de 0,1 m. Após a germinação procedeu-se ao desbaste das plantas na câmara, deixando uma por cova, resultando em nove (9) plantas no interior da câmara.

A parte superior da câmara, ao nível do solo, foi fechada com plástico preso às laterais com fita adesiva. Essa operação foi realizada uma semana após a germinação. Com esse procedimento pode-se confirmar o sistema radicular das plantas à câmara, permanecendo a parte aérea sob condições normais. A vedação da câmara, no plástico, no ponto onde encontravam-se os colos das plantas, foi feita com cera de abelha. Pintou-se o plástico de vedação com tinta prateada, com o fim de prevenir o aquecimento no interior da câmara.

A ₁ a A ₆ - amostradores do ar do solo	F ₁ a F ₃ - fluxador do tensiômetro
T ₁ a T ₃ - tensiômetros	M ₁ a M ₃ - manômetro do tensiômetro
E ₁ e E ₂ - condutos de circulação da atmosfera artificial	c - termômetro de solo
I ₁ e I ₂ - irrigadores	

Figura 1 - Câmara de medida de fixação de N₂ atmosférico em leguminosa.

Após vinte e dois (22) dias do plantio, uma mistura gasosa inicialmente com 80% de N_2 (enriquecido a 7,25 átomos % em ^{15}N) e 20% de O_2 , foi posta a circular pela superfície do solo no interior da câmara.

Antes da admissão da mistura gasosa contendo $^{15}N_2$, procedeu-se à remoção do N_2 natural do interior da câmara, injetando-se mistura gasosa com 80% de argônio e 20% de oxigênio.

A Figura 2 apresenta um esquema com os equipamentos utilizados, e ligações efetuadas entre a câmara para medida da fixação e o reservatório de gás com $^{15}N_2$.

No período experimental a bomba de diafragma H. Maihak AG tipo Gf 21 (B, Figura 2) permaneceu em funcionamento, promovendo a circulação dos gases no circuito, reservatório e superfície interna e superior da câmara, a uma vazão média de 40 ml/min..

Após 50 horas de circulação da mistura de gases contendo $^{15}N_2$ foi admitido 4 litros de O_2 , pela entrada a do circuito representado na Figura 2, com o fim de suprir a falta de oxigênio no interior da câmara. A mesma operação foi realizada após 120 horas de circulação. Ao tempo de 100 horas instalou-se um "trap" com cal sodada (C, Figura 2), que teve por finalidade controlar o teor de CO_2 no sistema.

O "trap" D, representado na Figura 2, tinha a finalidade de condensar o vapor d'água da mistura gasosa, na entrada da bomba de diafragma.

Legenda:

- A - Câmara de medida de fixação do N_2 atmosférico.
- B - Bomba de diafragma.
- C - "Trap" de CO_2 , com cal sodada.
- D - "Trap" de vapor d'água.
- E - Reservatório de gás $^{15}N_2$.
- F - Manômetro.
- a, b, c - torneiras.

Figura 2 - Ligações entre o reservatório de $^{15}N_2$ e a câmara de medida da fixação simbiótica em feijoeiro.

O manômetro (F, Figura 2), instalado junto ao reservatório de gás, auxiliou no controle da pressão do reservatório quando das admissões de O_2 , operação essa que foi realizada com a redução do nível de água do reservatório, estando as torneiras b e c fechadas.

Durante o período de circulação da atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$, foram procedidas amostragens do ar do solo no interior da câmara, para as profundidades 0, 5, 10, 20, 30 e 40 cm. O procedimento nessas amostragens constava em conectar-se agulhas de seringas plásticas de 5 mL, a tubos de latex adaptados aos amostradores (A_1 a A_6 , Figura 1) extraindo o ar do solo após descarte dos 5 mL iniciais. As amostras contidas nas seringas eram conservadas espetando-se as agulhas em tampas de borracha.

Os amostradores do ar do solo constavam de tubos plásticos de 2 mm de diâmetro interno. Esses tubos possuíam as extremidades inferiores posicionadas a 0,5, 10, 20, 30 e 40 cm de profundidade no solo, e a outra extremidade, onde se realizavam as extrações, presa à parte superior da câmara.

As amostras de ar do solo, coletadas a diferentes tempos durante o experimento, foram analisadas no Espectrômetro de Massa VARIAN MAT modelo CH-4, com o objetivo de determinarem-se as porcentagens em volume dos gases N_2 , O_2 , Ar e CO_2 , assim como, as concentrações de ^{15}N em átomos %.

A câmara para medida da fixação do N_2 e os equipamentos utilizados, instalados no campo, são mostrados nas Figuras 3a e 3b.

No 31º dia do plantio, após 216 horas de circulação da atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, foi finalizado o experimento de medida de fixação. As plantas da câmara em número de sete, foram colhidas separando-se a parte aérea da radicular. Na raiz foram separados os nódulos. Duas plantas da câmara foram perdidas. Colheram-se também plantas de covas distantes da câmara, para controle.

Cultivou-se o feijoeiro na área experimental por 45 dias (outubro a dezembro/1979). Nesse período controlou-se a umidade do solo dentro e fora da câmara com tensiômetros instalados a 10, 20 e 30 cm de profundidade. Foram tomadas as temperaturas do solo a 10 cm de profundidade para as situações dentro e fora da câmara, que revelaram valores mais elevados para a condição da câmara, com diferenças de 5°C nas horas mais quentes do dia.

Durante o período de condução do experimento foram realizadas medidas da atividade fixadora do N_2 , em nódulos de raízes destacadas de plantas de feijão, pela técnica de redução de acetileno.

3.3.2. Medida da fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) cultivar Carioca, em condições de casa de vegetação

3.3.2.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$

Este estudo foi desenvolvido no período de abril a junho de 1980. Foram utilizados em vasos plásticos de 4,5 litros de volume,

Figura 3 a e b - Área experimental com feijoeiro, aparecendo ao centro a câmara de medida da fixação.

com solos Terra Roxa Estruturada (TRE) e Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa (LVA), contendo cada vaso 6 kg de terra.

No plantio foram semeados por vaso, 4 sementes de feijão cultivar Carioca inoculadas com Rhizobium phaseoli. Passados 8 dias do plantio, já com as plantas germinadas, procedeu-se ao desbaste deixando-se duas plantas por vaso em posições diametralmente opostas.

Na data do desbaste foram instaladas as tampas dos vasos. Essa operação constou em passar a parte aérea das plantas através das tampas, por aberturas de 3 cm de diâmetro.

A vedação das tampas, na abertura próximo ao colo das plantas, foi feita com cera de abelha, e no encaixe com o vaso utilizou-se massa de vedação 3M.

A Figura 4 apresenta um esquema em corte do vaso utilizado nesse estudo, mostrando o confinamento das raízes ao vaso.

O controle da água do solo foi feito com o sistema de filtro de porcelana, desenvolvido por MONTANHEIRO (1980). Foram mantidas as tensões de 20 cm de coluna d'água para o solo TRE e 30 cm para o LVA.

Foram utilizados 22 vasos, sendo 11 para o tratamento com solo TRE e o mesmo número com LVA. Em cada tratamento, 7 vasos receberam atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$ e os demais circulação de ar atmosférico.

Os vasos foram ligados em série com tubos plásticos de 5 mm de diâmetro interno, conectados às tampas.

Figura 4 - Sistema de controle da unidade do solo, em vasos fechados.

A Figura 5 ilustra o arranjo dos vasos, nos quais os sistemas radiculares das plantas foram mantidos sob atmosfera marcada com ^{15}N . Os 7 primeiros vasos do sistema corresponderam ao tratamento com solo TRE e os demais ao tratamento com o LVA. O mesmo esquema de ligações foi efetuado aos 8 vasos do controle, pelos quais admitiu-se ar atmosférico.

Antes da admissão da atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, circulou-se pelo sistema de vasos representado na Figura 5, por 4 dias, uma mistura de gases que continha inicialmente 40%, 40% e 20% em volume de nitrogênio, argônio e oxigênio, respectivamente. Durante esse tempo tomaram-se amostras de ar do sistema em amostradores, indicados na Figura 5, que foram analisadas por espectrometria de massa nas determinações das concentrações em % de volume dos gases. Pelas variações nas concentrações volumétricas do nitrogênio e argônio na mistura de gases, pode-se detectar no sistema vazamentos que foram controlados, bem como, avaliar a difusão não controlada do ar atmosférico para o interior do sistema.

No 19º dia do plantio foi admitido nos vasos a atmosfera contendo $^{15}\text{N}_2$, O_2 e Ar, que permaneceu até o 67º dia, totalizando 1145 horas (48 dias) para medida da fixação do N_2 no feijoeiro.

Durante o período em que se manteve o sistema radicular das plantas de feijão em contato com atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, foram realizadas amostragens do gás no sistema com seringas plásticas de 5 mL, tomadas em amostradores representados na Figura 5. Os procedimentos nessas coletas foram os mesmos descritos em 3.3.1.. As amostras de gases foram analisadas no Espectrômetro de Massa VARIAN MAT modelo CH-4 com fim

Legenda:

A - Reservatório de gás $^{15}\text{N}_2$.

B - Manômetro.

C - "Trap" de vapor d'água.

D - Bomba de CO_2 , com cal sodada.

E - "Trap" para CO_2 , com cal sodada.

a, c, d, e - amostradores de gás.

f, g, h, i, j, k - torneiras.

Figura 5 - Sistema para medida da fixação simbiótica do N_2 atmosférico em feijoeiro, usando atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em condições de casa de vegetação.

de se determinarem: os níveis das concentrações de ^{15}N , necessárias no cálculo da fixação do N_2 , e as % em volume de N_2 , Ar, O_2 e CO_2 .

Diariamente admitiu-se oxigênio no sistema, pela entrada a^* indicada na Figura 5, com o fim de repor o O_2 consumido. Para reduzir a concentração do CO_2 evoluído no interior dos vasos procedeu-se diariamente, por 4 a 6 horas, a circulação dos gases dos vasos e reservatório, fazendo com que o dióxido de carbono fixasse retido no "trap" com cal so dada (E, Figura 5).

O "trap" C representado na Figura 5, tinha por finalidade condensar o vapor d'água antes da entrada do gás na bomba de diafragma.

Foram necessárias quatro reposições de $^{15}\text{N}_2$ devido as reduções na concentração do isótopo, provocadas pela entrada do ar atmosférico no sistema. Nas admissões, o N_2 enriquecido a 96 átomos % em ^{15}N era introduzido no reservatório de gás através de a^* , indicado na Figura 5. Em cada operação de reposição de $^{15}\text{N}_2$ injetavam-se também no reservatório argônio e oxigênio, com o fim de se obter uma mistura de gases com as % em volume de aproximadamente: 40% de N_2 , 40% de Ar e 20% de O_2 .

Nesse experimento foram utilizados no preparo do $^{15}\text{N}_2$, 10 g de sulfato de amônio enriquecido a 95,5 átomos % em ^{15}N . A Tabela 2 relaciona as quantidades de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $^{15}\text{N}_2$ empregados em cada admissão.

Tabela 2 - Quantidades em gramas de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas no preparo do $^{15}\text{N}_2$, para admissões no sistema de vasos com feijoeiro.

Admissões	Quantidade de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	$^{15}\text{N}_2$ CNTP (ℓ)	Concentração de ^{15}N (átomos %)
1a.	3,5	0,60	96,4
2a.	3,0	0,51	94,6
3a.	1,0	0,17	96,4
4a.	1,0	0,17	96,6
5a.	1,5	0,25	94,0
Total	10,0	1,70	95,5

O manômetro B (Figura 5) auxiliou no controle da pressão do reservatório nas admissões de N_2 , O_2 e Ar, operação essa realizada com a redução do nível da água do reservatório estando as torneiras h e ℓ fechadas, e f e g abertas.

No 67º dia foi finalizado o experimento. As plantas dos vasos foram colhidas separando-se os nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos. Amostras de solos dos 14 vasos com atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$ foram coletados para determinação da umidade.

Durante o experimento a temperatura da casa de vegetação foi registrada com termôgrafo, verificando-se a média de $25,9^\circ\text{C}$ para a tem-

peratura máxima (diurna) e $9,7^{\circ}\text{C}$ para a mínima (noturna).

Paralelamente ao estudo desenvolvido, realizaram-se medidas da atividade da nitrogenase, pela técnica de redução de acetileno, em raízes destacadas de plantas de feijão cultivadas em vasos com solo LVA.

3.3.2.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e utilização do trigo como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico

Foram conduzidos experimentos em duas épocas: de abril a junho e de outubro a dezembro de 1980. Utilizaram-se de vasos plásticos de 4,5 litros e 6 kg de terra, com Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa (LVA) na primeira época, e com Terra Roxa Estruturada (TRE) na segunda.

No controle da água do solo foi utilizado o sistema com filtro de porcelana (MONTANHEIRO, 1980) instalando-se a vela de filtro invertida nos vasos, como representado na Figura 6. Foram mantidas as tensões de 30 cm de coluna d'água para o LVA e 20 cm para o TRE.

Os experimentos foram conduzidos com duas plantas de feijão por vaso, sendo as sementes no plantio inoculadas com Rizobium phaseoli. Utilizaram-se também nesses estudos plantas de trigo linhagem TICE-NA-9, em número de 4 por vaso, que serviram como plantas controle não fixadora do N_2 simbiótico.

A Tabela 3 relaciona as épocas de cultivo do feijão e trigo, solos, número de vasos empregados, épocas de adubação e dose de nitrogênio aplicado como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, concentração de ^{15}N no adubo, e o tempo de cultivo até a colheita, dos experimentos.

Figura 6 - Sistema de controle da umidade do solo em vasos.

Tabela 3 - Épocas de cultivo de feijão e trigo, solos, número de vasos, épocas de adubação e dose de N aplicado, concentração de ^{15}N no adubo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, e tempo de cultivo até a colheita, nos experimentos de medida da fixação do N_2 em feijoeiro com adição do $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo.

Época de cultivo	Solo	Cultura	Total de vasos	Adubação com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						
				Número de vasos	1ª época (dias do plantio)	Nitrogênio aplicado (mg/vaso)	2ª época (dias do plantio)	Nitrogênio aplicado (mg/vaso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Colheita (dias do plantio)
abril a junho	LVA	feijão	0	0	12	62,5	-	-	1,347	67
		trigo	4	2	12	62,5	-	-	1,347	67
outubro a dezembro	TRE	feijão	6	3	25	31,2	30	31,2	5,89	60
		trigo	6	3	25	31,2	30	31,2	5,89	60

Na colheita as plantas de feijão de cada vaso foram divididas em amostras compreendendo: nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos. Nas plantas de trigo separaram-se a parte aérea e raiz.

3.3.3. Medida da fixação do N_2 atmosférico na soja (Glycine max L. Merrill) isolinha nodulante Hardee D 71-9289, em condições de casa de vegetação.

3.3.3.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$

Foram empregados nesse estudo vasos vedados como os descritos no item 3.3.2.1. (Figura 4), no cultivo da soja em solo Terra Roxa Estruturada. Utilizaram-se sete (7) vasos com soja nodulante e dois (2) com isolinha não nodulante. Cada vaso continha duas plantas.

O controle da água do solo foi feito com filtro de porcelana, mantendo-se a tensão de 30 cm de coluna d'água.

O sistema utilizado constou de dez (10) vasos ligados em série com reservatório de gás, bomba de circulação e "trap" com cal sodada, como representado na Figura 7. Foi colocado um vaso sem plantas, entre o conjunto de vasos com soja nodulante e não nodulante.

No 17º dia do plantio admitiu-se no sistema a mistura de gases com 40, 40 e 20% em volume de N_2 , Ar e O_2 respectivamente, que permaneceu por 7 dias. A finalidade dessa operação como descrito em 3.3.2.1., foi a de detectar vazamentos no sistema.

A admissão da atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$ aos vasos, deu

Legenda:

- A - Reservatório de gás $^{15}\text{N}_2$.
- B - Manômetro.
- C - Reservatório de água.
- D - Bomba de diáfragma.
- E - "Trap" para CO_2 , com cal sodada.
- a, b, c, d - amostradores de gás.
- e, f, g, h, i, j, k - torneiras.

Figura 7 - Sistema para medida da fixação simbiótica do N_2 atmosférico na soja, usando atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em condições de ca sa de vegetação.

se no 24º dia do plantio da soja, permanecendo as plantas nessas condições por 46 dias (1072h.). Nesse período foram feitas determinações por espectrometria de massa das concentrações de ^{15}N no N_2 e das % em volume de N_2 , Ar, O_2 e CO_2 , em amostras de gás coletadas no sistema (amostradores: a, c, d, e; Figura 7).

Diariamente procedeu-se a circulação por 4 a 6 horas, dos gases no sistema com a bomba de diafragma (D - Figura 7), e reposição de O_2 , admitido no reservatório de gás pela entrada a*.

Foram realizadas três (3) reposições com $^{15}\text{N}_2$. As quantidades de sulfato de amônio enriquecido em ^{15}N utilizadas no preparo do $^{15}\text{N}_2$, estão relacionadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Quantidades em gramas de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ utilizadas no preparo do $^{15}\text{N}_2$, para admissões no sistema de vasos com soja.

Admissões	Quantidade de $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	$^{15}\text{N}_2$ CNTP (ℓ)	Concentração de ^{15}N (átomo%)
1º	6,0	1,02	50,0
2º	2,1	0,36	96,4
3º	3,0	0,51	94,6
4º	1,7	0,29	98,9
Total	12,8	2,18	74,6

Nas reposições com $^{15}\text{N}_2$ admitia-se também oxigênio no reservatório, com o fim de se obter mistura de gases com aproximadamente 80% em N_2 e Ar, e 20% com O_2 .

O manômetro B (Figura 7) auxiliou no controle da pressão do reservatório, durante as admissões de $^{15}\text{N}_2$ e O_2 , à semelhança de como foi descrito no item 3.3.2.1. para o experimento com feijão.

No 70º dia do plantio da soja foram desfeitas as ligações do sistema e as plantas de cada vaso foram colhidas separando-se em amostras: os nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos. Amostras de solos dos 10 vasos foram coletadas para determinação da umidade.

Amostras do solo do vaso sem plantas, para os intervalos de profundidades 0 a 5, 5 a 10, e 10 a 20 cm, foram coletadas com objetivo de se determinarem as concentrações de ^{15}N no nitrogênio do solo.

O experimento foi conduzido de outubro a dezembro de 1980. Nesse período a temperatura da casa de vegetação foi registrada com termômetro, verificando-se a média de $35,0^\circ\text{C}$ para a temperatura máxima (diurna) e $24,9^\circ\text{C}$ para a mínima (noturna).

Conjuntamente ao estudo desenvolvido foram feitas medidas da atividade da nitrogenase pela técnica de redução de acetileno, em raízes destacadas de soja nodulante cultivadas em vasos.

3.3.3.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e utilização de isolinha não nodulante de soja como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico

Esse experimento foi conduzido paralelamente ao descrito em 3.3.3.1., cultivando-se isolinhas nodulante e não nodulante de soja em vasos plásticos com 6 kg de Terra Roxa Estruturada. No controle da

água do solo foi utilizada a vela de filtro invertida nos vasos (Figura 6), mantendo-se a tensão de 20 cm de coluna d'água.

Foram utilizados seis (6) vasos com plantas de soja nodulante, sendo as sementes no plantio inoculadas com Rhizobium japonicum, e seis (6) vasos com plantas de isolinha não nodulante de soja. Cada vaso continha duas (duas) plantas.

A Tabela 5 relaciona para o experimento: a época de cultivo das isolinhas de soja, o solo, número de vasos empregados, épocas de adubação e doses de nitrogênio aplicado como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, concentração de ^{15}N no adubo e o tempo de cultivo até a colheita.

Aos setenta (70) dias do plantio foram colhidas as plantas do experimento. Em cada vaso as plantas foram divididas em amostras de nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos.

3.3.3.3. Uso das variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja nodulante e não nodulante

Nessa determinação foram utilizadas as plantas de soja nodulante e não nodulante do experimento descrito em 3.3.3.2., que não receberam adubação com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.4. Controle fitossanitário

Nos experimentos em casa de vegetação foram feitas pulverizações periódicas com Malatol 50 a 0,12% e Acricid 40 E a 0,1%, para manutenção da sanidade das plantas.

As folhas da soja no experimento com atmosfera marcada sofreram queima parcial com a aplicação realizada no 15º dia do ciclo da cultura.

3.5. Obtenção do $^{15}\text{N}_2$ e preparo de atmosferas marcadas

O $^{15}\text{N}_2$ utilizado nos experimentos de medida da fixação com atmosferas marcadas foi obtido reagindo-se sulfato de amônio enriquecido em ^{15}N , com reagente hipobromito alcalino (RITTENBERG, 1946).

O sistema da Figura 8, foi empregado na obtenção do $^{15}\text{N}_2$ e preparo da mistura de gases do experimento 3.3.1.. Utilizaram-se 130 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido a 7,5 átomos % com ^{15}N e 10ℓ de reagente LiOBr, na produção de 20ℓ de N_2 .

Na obtenção do $^{15}\text{N}_2$, inicialmente foi feito vácuo no sistema (Figura 8), abrindo-se as torneiras t_2 , t_3 , t_4 e t_5 . Em seguida admitiu-se ao balão de reação (B), através do funil (F), solução com 26 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nessa operação foram mantidas fechadas t_3 e t_4 . A seguir fez-se novamente vácuo no sistema, fechando t_1 e abrindo-se t_3 e t_4 . Antes do início da reação fecharam-se as torneiras t_3 e t_4 . Dois litros de LiOBr foram então admitidos ao balão (B), pelo funil (F), abrindo e fechando-se alternadamente t_1 e t_2 . A reação do sal amiacal como reagente LiOBr foi acelerada por agitação mecânica (A). Durante a produção do N_2 foram abertas as torneiras t_3 , t_5 , t_6 e presilhas P_1 , P_2 e P_4 , e o nitrogênio molecular pode ser transferido do balão (B) para o reserva

LEGENDA

- F - FUNIL
 B - BALÃO DE REACÇÃO (2 litros)
 A - AGITADOR MECÂNICO
 T - "Tubo"
 R - RESERVATÓRIO DE GÁS (40 litros)
 M - MANÔMETRO DE Hg
 † - TORNEIRA DE VIDRO
 P - PRESILHAS HOFFMAN

Figura 8 - Sistema de obtenção de $^{15}\text{N}_2$ e de preparo da mistura de gases, do experimento de campo.

tório (R). Foram mantidas pressões negativas no reservatório, com a redução do volume de água em R, para facilitar a transferência do gás.

Externamente ao balão (B) foram colocadas pedras de gelo, com a finalidade de manter sob baixa temperatura o ambiente de reação, e evitar dessa forma a liberação excessiva de vapores de bromo do LiOBr. O "trap" (T), mergulhado em nitrogênio líquido, retinha os vapores de bromo liberados na reação.

O volume de 20 ℓ de $^{15}\text{N}_2$ foi produzido e transferido para o reservatório (R) em cinco etapas. Em cada etapa reagiram-se 26 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com 2 ℓ de LiOBr.

A mistura de gases inicial do experimento 3.3.1., continha 80% de N_2 e 20% de O_2 , e foi obtida com a admissão de 5 ℓ de oxigênio ao reservatório (R), no sistema representado na Figura 8.

Nos experimentos com atmosfera marcada conduzidos em casa de vegetação, o $^{15}\text{N}_2$ foi produzido no sistema da Figura 9. O conjunto funil (F) e balão de reação (B) contendo $^{15}\text{N}_2$, foi levado para o local do experimento onde se transferiu o nitrogênio molecular diretamente ao reservatório (Figuras 5 e 7). Na transferência do $^{15}\text{N}_2$ foi admitido água ao balão (B), pelo funil (F), ao mesmo tempo que se reduzia a pressão de gás no reservatório. Na saída do balão (B) foi colocado um "trap" com nitrogênio líquido para evitar a passagem de vapores de bromo.

LEGENDA

- F - FUNIL
- B - BALÃO DE REAÇÃO (1 litro)
- T - TORNEIRA DE VIDRO
- P - PRESILHA HOFFMAN
- A - AGITADOR MECÂNICO

Figura 9 - Sistema de obtenção do $^{15}\text{N}_2$, para os experimentos conduzidos em casa de vegetação.

3.6. Determinações em amostras de plantas

3.6.1. Massa de matéria seca

Na determinação da massa de matéria seca, as amostras de plantas foram secas em estufa a 60⁰C até atingirem massa constante. Utilizaram-se as balanças analíticas Mettler modelo PC180 e Bosch modelo S2000. As amostras secas em estufa passaram por moagem em moinho mecânico.

3.6.2. Teor de nitrogênio

O teor de nitrogênio das amostras de feijão do experimento de campo, foi determinado pelo método de Kjeldahl com propósitos para análise isotópica de ¹⁵N (BREMNER, 1955b).

Nas amostras de soja, feijão e trigo, dos experimentos em casa de vegetação, determinaram-se o teor de nitrogênio por digestão sulfúrica e análise colorimétrica em sistema de fluxo (KRUG, 1982).

3.6.3. Análises isotópicas de ¹⁵N

Foram utilizados os métodos de preparo para análise isotópica de nitrogênio: a reação de sal amoniacal com reagente hipobromito alcalino (RITTENBERG, 1946), e combustão de Dumas (PROKSCH, 1969), respectivamente para as amostras dos experimentos de campo (item 3.3.1.) e em casa de vegetação (ítems 3.3.2. e 3.3.3.).

As determinações das concentrações de ^{15}N em átomos % e análises de relação das razões isotópicas de $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ foram feitas respectivamente nos Espectrômetros de Massa VARIAN MAT modelo CH-4 e MICROMASS modelo 602E, aparelhos esses da Divisão de Ciências Ambientais do CENA-Piracicaba.

3.7. Determinações em amostras de terra

Foram procedidas determinações da umidade em % de volume (equação 7) em amostras de terra coletadas nos experimentos descritos em 3.3.2.1. e 3.3.3.1.

$$\theta = \frac{m_l}{m_s} \cdot \rho \cdot 100 \dots\dots\dots(7)$$

significando:

θ -umidade % volume

m_l -massa de líquido da amostra

m_s -massa de sólidos da amostra

ρ -densidade do solo.

Determinações das concentrações de ^{15}N (átomos %) do N-total e formas inorgânicas do nitrogênio, segundo BREMNER (1965a e b) foram realizadas para amostras de terra do experimento no item 3.3.3.1.

3.8. Determinações das concentrações de N_2 , O_2 , Ar e CO_2 (% de volume) e de ^{15}N (átomos %) em amostras de gases

As medidas das concentrações volumétricas de N_2 , O_2 , Ar e

CO₂ e de ¹⁵N (átomos %) em amostras de gases foram realizadas no Espectrômetro de Massa VARIAN MAT modelo CH-4.

A sensibilidade do espectrômetro de massa para cada gás foi determinada com amostras de composição volumétrica conhecida. Os fatores para correção da sensibilidade do aparelho, encontrados para o N₂, O₂, Ar e CO₂, foram os seguintes:

Nitrogênio	-	1,000
Oxigênio	, -	1,271
Argônio	-	0,775
Dióxido de carbono	-	0,960

Nas medidas das concentrações em % de volume das amostras de gases, os fatores de correção para a sensibilidade do aparelho foram multiplicados às intensidades das massas 28, 32, 40 e 44 do espectro de massas, com as quais, determinaram-se por cálculo porcentual a composição volumétrica dos gases N₂, O₂, Ar e CO₂.

A concentração de ¹⁵N (átomos %) no N₂ foi obtida das massas 28, 29 e 30 do espectro de massas da análise do gás (equação 8; TRIVELIN et alii, 1973).

$$\text{Átomos \% } ^{15}\text{N} = \frac{I_{29} + 2I_{30}}{2(I_{28} + I_{29} + I_{30})} \cdot 100 \dots\dots\dots (8)$$

significando:

I - intensidade da corrente de íons (¹⁴N¹⁴N; ¹⁴N¹⁵N; ¹⁵N¹⁵N) da amostra que está sendo analisada.

Devido à contribuição do CO_2 das amostras nas massas 28 e 29, foram procedidas as seguintes correções, para efeito de cálculos da concentração de ^{15}N :

massa 28: ($I_{28} - 0,05 I_{44}$)

massa 29: ($I_{29} - 0,0005 I_{44}$)

3.9. Medidas efetuadas

3.9.1. Fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro e soja, nos experimentos com atmosferas marcadas em ^{15}N

O nitrogênio fixado em feijoeiro e soja nos experimentos com atmosferas enriquecidas em $^{15}\text{N}_2$, foi determinado pela equação 9 obtida por princípios de diluição isotópica.

$$\text{N-fixado(mg)} = \frac{(\text{átomos \% } ^{15}\text{N exc.})_{\text{planta fixadora}}}{(\text{átomos \% } ^{15}\text{N exc.})_{\text{no } \text{N}_2\text{-gás}}} \cdot \text{N-planta(mg)} \dots (9)$$

As concentrações de ^{15}N em átomos % exc. para as diferentes partes amostradas das plantas, foram obtidas por subtração dos valores correspondentes em átomos %, de plantas marcadas e não marcadas com ^{15}N .

Os valores médios em átomos % de ^{15}N excesso no gás N_2 , foram obtidos das curvas de diluição do isótopo verificadas nos sistemas experimentais.

3.9.1.1. Redução de acetileno

A redução de acetileno foi utilizada como técnica de avaliação da atividade redutora da enzima nitrogenase, no acompanhamento dos experimentos de medida da fixação do N_2 com atmosferas marcadas em $^{15}N_2$.

Nas medidas de redução do acetileno em raízes destacadas de feijoeiro e soja, empregou-se a metodologia de incubação segundo SAITO (1978). As análises de C_2H_2 e C_2H_4 foram feitas em cromatógrafo de gás BECKMAN Modelo GC-65.

3.9.2. Fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro e soja nos experimentos com adição de $^{15}NH_4^+$ ao solo

Aplicou-se a equação de diluição isotópica (equação 10) na determinação do nitrogênio fixado (FRIED e MIDDELBOE, 1977).

$$N\text{-fixado(mg)} = \left[1 - \frac{(\text{átomos}\%^{15}N \text{ exc.})\text{cult.fix.}}{(\text{átomos}\%^{15}N \text{ exc.})\text{cult.controle}} \right] \cdot (NT)\text{cult.fix.} \dots (10)$$

onde:

NT - nitrogênio total (mg)

3.9.2.1. Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante

Os cálculos do nitrogênio proveniente do fertilizante (NPF)

foram feitos pela expressão 11, considerando as diferentes partes amostradas das plantas.

$$NPF = \left[\frac{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N exc.}) \text{ planta}}{(\text{átomos } \% \text{ } ^{15}\text{N exc.}) \text{ fertilizante}} \right] \cdot NT \dots\dots\dots (11)$$

onde:

NPF - nitrogênio proveniente do fertilizante na parte considerada da planta (mg/vaso).

NT - nitrogênio total na parte considerada da planta, em mg/vaso.

3.9.2.2. Eficiência de utilização do fertilizante

A eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado pela planta toda, foi calculada pela equação 12, utilizando-se a soma dos NPF de cada uma das partes da mesma.

$$EUF (\%) = \frac{NPF}{QNA} \times 100 \dots\dots\dots (12)$$

significando:

NPF - nitrogênio proveniente do fertilizante, considerando a planta toda (mg/vaso).

QNA - quantidade de nitrogênio aplicado, como fertilizante em mg/vaso.

3.9.3. Fixação do N_2 atmosférico na soja. Uso das variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja nodulante e não nodulante.

Das análises de razões isotópicas $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ em amostras de

plantas, com concentrações de ^{15}N ao nível da abundância natural, determinam-se valores $\delta^{15}\text{N}$ em relação ao ar atmosférico, pela equação:

$$\delta^{15}\text{N}(\text{‰}) = \left[\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{amostras}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{ar atmosf.}}} - 1 \right] \times 1000 \dots\dots\dots (13)$$

A porcentagem do nitrogênio fixado foi determinado pela equação 14, obtida por princípios de diluição isotópica.

$$\text{N-fixado}(\%) = \left[1 - \frac{(\delta^{15}\text{N})_{\text{soja nod.}}}{(\delta^{15}\text{N})_{\text{soja não nod.}}} \right] \times 100 \dots\dots\dots (14)$$

3.9.4. Fixação do N_2 atmosférico na soja. Determinação por diferença no N-total entre soja nodulante e não nodulante

A porcentagem do nitrogênio fixado foi determinado pela equação 15 (RENNIE, 1979). Nessas medidas foram utilizadas plantas de soja nodulante e não nodulante, cultivadas sob mesmas condições.

$$\text{N-fixado}(\%) = \left[1 - \frac{(\text{N-total})_{\text{soja nod.}}}{(\text{N-total})_{\text{soja não nod.}}} \right] \times 100 \dots\dots\dots (15)$$

3.10. Análises estatísticas

Foram efetuadas análises de variâncias dos dados em delineamentos em blocos casualizados, segundo PIMENTEL GOMES (1970). Na comparação de duas médias utilizou-se do teste t em análises de amostras independentes, com variâncias diferentes (SNEDECOR e COCHRAN, 1974).

Nos cálculos da fixação do dinitrogênio fez-se uso da lei de propagação dos erros conforme FURTADO (1967).

4. RESULTADOS

4.1. Fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro. Medida em condições de campo usando atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$

Os valores das concentrações de ^{15}N (átomos % excesso) no ar da câmara de medida da fixação do dinitrogênio, em função do tempo e profundidade no solo, estão relacionados na Tabela 6, que foi elaborada com dados que constam dos Apêndices 1 e 2 (páginas 138 e 139). Com os dados da referida tabela, determinou-se por ajustes de curvas e cálculos a concentração média de ^{15}N do ar do solo, na camada superficial de 10 cm.

A expressão matemática que melhor representa a diluição da concentração de ^{15}N em função do tempo, nas diferentes profundidades, é dada pela equação 16.

$$(\hat{y} - y_0)_x = (y)_x = ae^{-bt^n} \dots\dots\dots (16)$$

significando:

$\hat{y}$ - concentração de ^{15}N (átomos%) no ar do solo, no tempo (t).

Tabela 6 - Concentração de ^{15}N (átomos % excesso) no ar do solo à diferentes profundidades na câmara de medida da fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro, sob condições de campo.

Tempo (h)	Concentração de ^{15}N (a) {átomos % em excesso}					
	Reservatório		Profundidades			
	0	5	10	20	30	40
0,0	6,85					
15,8	5,53	5,41	5,32	4,93	4,78	3,47
39,5	3,75					
63,3	2,63	2,62	2,52	2,34	2,32	2,12
87,5	1,77					1,78
111,5	1,12					
142,5	0,695	0,665	0,628	0,586	0,571	0,438
184,0	0,303	0,299	0,288	0,258	0,268	0,227
207,0	0,199	0,191		0,175	0,161	
216,0		Final do experimento				

(a) Átomos % ^{15}N em excesso = Átomos % ^{15}N na amostra - 0,365% ^{15}N .

y_0 - concentração de ^{15}N (átomos%) no ar atmosférico (Apêndice 2).

y - concentração de ^{15}N (átomos% excesso) no ar do solo, no tem
po (t).

t - tempo determinado.

x - profundidade do solo na câmara.

a , b e n - constantes.

Com os dados da Tabela 6 obtiveram-se as funções exponenciais representadas na Figura 10. Os valores das concentrações médias de ^{15}N do ar do solo, que constam da citada figura, foram calculadas pela equação 17, considerando o intervalo de tempo de 216 horas.

$$(\bar{y})_x = \frac{\int_0^t (y)_x dt}{\int_0^t dt} \dots\dots\dots (17)$$

significando:

$(\bar{y})_x$ - concentração média de ^{15}N (átomos% excesso) do ar do solo
à profundidade x , no intervalo de tempo de 216 horas.

$(y)_x$ - função exponencial de diluição da concentração de ^{15}N do
ar do solo, em função do tempo, na profundidade x .

t - tempo (216 horas).

Da relação de $(\bar{y})_x$ com as profundidades amostradas na câmara, chegou-se à função de reta ilustrada na Figura 11.

A concentração média de ^{15}N do ar do solo, na camada com-

Figura 10 - Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) no ar do solo, às profundidades de 0,5, 10, 20, 30 e 40 cm, em função do tempo, na câmara de medida de fixação do N_2 atmosférico.

Figura 11 - Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) do ar do solo em função da profundidade, na câmara de medida da fixação do N_2 , no tempo de 216 horas.

preendida entre as profundidades 0 a 10 cm, foi determinada pela equação 18,, chegando-se ao valor de 1,876 átomos % de ^{15}N em excesso.

$$\left[(\bar{y})_x \right]_{x_i}^{x_f} = \frac{\int_{x_i}^{x_f} (\bar{y})_x dx}{\int_{x_i}^{x_f} dx} \dots\dots\dots (18)$$

significando:

$\left[(\bar{y})_x \right]_{x_i}^{x_f}$ - concentração média de ^{15}N do ar do solo na camada compreendida entre as profundidades x_f e x_i .

O intervalo de profundidades 0 a 10 cm foi considerado tendo por base que 80% do sistema radicular do feijoeiro, distribui-se nessa camada do solo (INFORZATO e MIYASAKA, 1963).

Os dados de produção de matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, folhas e ramos) das plantas de feijão colhidas na câmara e fora dela, são apresentados nas Tabelas 7 e 8.

Os resultados de produção de matéria seca e nitrogênio, das plantas de feijão da câmara e do controle, não revelam diferenças significativas quando analisadas pelo Teste t. Isto indica que no período experimental, o ambiente da câmara não influenciou apreciavelmente no desenvolvimento do feijoeiro.

As concentrações de ^{15}N nos nódulos, raízes e parte aérea das plantas da câmara, revelam-se significativamente diferentes. Os nódulos como sítios fixadores do N_2 apresentam o maior valor de concentra-

Tabela 7 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de feijoeiro cultivado em condições de campo, na câmara de medida da fixação simbiótica do nitrogênio com atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Planta nº	Nódulos			Raízes			Folhas e ramos		
	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N
1	0,049	1,0	1,375	1,182	1,5	0,640	0,930	23,2	0,836
2	0,047	1,1	1,298	0,145	1,7	0,620	0,888	23,9	0,866
3	n.d.	-	-	0,097	1,5	0,595	0,417	13,1	0,698
4	0,004	n.d.	0,883	0,151	1,4	0,515	0,780	17,5	0,581
5	0,014	n.d.	1,281	0,118	1,4	0,647	0,770	18,6	0,837
6	0,058	1,6	1,420	0,142	2,2	0,693	0,715	20,2	1,014
7	0,030	n.d.	1,395	0,151	1,9	0,652	0,923	23,2	0,849
$\bar{m}$	0,034	1,3	1,275	0,141	1,7	0,623	0,775	20,0	0,812
$s/\sqrt{n}$ (a)	0,009	0,3	0,082	0,010	0,2	0,021	0,067	1,5	0,052
CV%	62,9	33,5	15,7	19,1	17,6	9,0	23,0	19,5	16,9

(a) erro padrão da média.

Tabela 8 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de feijoeiro cultivado em condições de campo - controle.

Amostra n°	Número de plantas	Parte aérea			Raiz e nódulos		
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ¹⁵ N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ¹⁵ N (átomos%)
8	4	2,385	74,2	0,367	0,445	6,81	0,365
9	4	3,449	99,3	0,363	0,795	11,8	0,364
10	4	3,156	95,0	0,365	0,636	9,73	0,365
11	4	3,164	98,6	0,363	0,671	13,7	0,365
m (por planta)		0,760	22,9	0,365	0,159	2,63	0,365
s/ $\sqrt{n}$		0,057	1,5	0,001	0,018	0,37	0,001
CV(%)		15,0	13,0	0,53	22,8	28,1	0,14

ção isotópica, enquanto que as raízes, órgãos ativos na absorção do nitrogênio do solo com concentração natural em ^{15}N , mostram o menor valor.

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da fixação do dinitrogênio das plantas cultivadas na câmara. Verifica-se na citada tabela, que os coeficientes de variação (CV%) apresentam-se muito altos. Esses valores são devidos à inclusão nos cálculos dos resultados obtidos com as plantas de número 3 e 4, que mostraram baixa nodulação e desenvolvimento quando comparada com as demais. Não se considerando para efeito de cálculo estatístico os resultados dessas plantas, os coeficientes de variação revelam-se com valores médios (10 a 20%) e resultantes da variabilidade da massa de matéria seca das amostras.

Dos resultados apresentados na Tabela 9, verifica-se que no período considerado em média $5,5 \pm 0,9$ mg de N/planta (24% do N-total/planta) adveio da fixação, e 90% desse nitrogênio foi translocado para a parte aérea. No sistema radicular 75% do nitrogênio fixado é encontrado nos nódulos.

Considerando o período de tempo do 22º ao 31º dia do ciclo vegetativo da cultura do feijoeiro, período esse anterior à floração, pode-se estimar com base nos valores obtidos a fixação média de 1,1 kg de N/ha.

As Figuras 12a e 12b, construídas com os dados que constam do Apêndice 3 (pag. 140), evidenciam a variação com o tempo e por planta, da matéria seca de nódulos e atividade redutora da enzima nitrogenase dos nódulos radiculares. O período de tempo em que foi realizada a medi-

Tabela 9 - Concentração de ^{15}N (átomos % excesso), nitrogênio total (mg/planta) e nitrogênio fixado (mg/planta e % do N-total) em feijoeiro cultivado em condições de campo, na câmara de medida da fixação simbiótica do nitrogênio, utilizando atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, à 1,876 átomos % excesso (216 horas).

Planta n°	Conc. ^{15}N (átomos% exc.)			Nitrogênio total (mg/planta)	Nitrogênio fixado (mg/planta)				Nitrogênio fixado (% do N-total)(a)			
	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Planta toda
1	1,010	0,275	0,471	25,7	0,54	0,22	5,82	5,58	2,1	0,9	22,6	25,6
2	0,933	0,255	0,501	26,7	0,55	0,23	6,38	7,16	2,1	0,9	23,9	26,9
3		0,230	0,333	14,6		0,18	2,33	2,51		1,2	16,0	17,2
4	0,518	0,150	0,216	18,9		0,11	2,01	2,12		0,6	10,6	11,2
5	0,916	0,282	0,472	20,0		0,21	4,68	4,89		1,1	23,4	24,5
6	1,055	0,328	0,649	24,2	1,01	0,38	6,99	8,38	4,2	1,6	28,9	34,6
7	1,030	0,287	0,484	25,1		0,29	5,99	6,28		1,2	23,9	25,0
<hr/>												
	Média			22,2	0,70	0,23	4,89	5,42	2,8	1,1	21,3	23,6
	±s/√n			± 1,7	±0,16	±0,03	±0,75	±0,89	±0,7	±0,1	± 2,3	± 2,8
	CV(%)			20,0	38,4	37,0	40,6	43,6	43,3	28,6	28,4	31,6

(a) N-total da planta toda.

Figura 12 a e b - Variação com o tempo e por planta da matéria seca de nódulos, e da atividade redutora da enzima nitrogenase, no feijoeiro cultivado em condições de campo.

da da fixação com $^{15}\text{N}_2$ encontra-se indicado nas citadas figuras. A redução da massa de nódulos e paralização da atividade fixadora, deveu-se às elevadas temperaturas que ocorreram a partir do 23º dia do ciclo da cultura.

O trabalho experimental de medida da fixação do dinitrogênio no feijoeiro sob condições de campo, desenvolveu-se por curto período do ciclo vegetativo da cultura, mas poderia ser estendido com elevações periódicas da concentração de ^{15}N na câmara.

4.2. Medida da fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro, em condições de casa de vegetação

4.2.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$

A Tabela 10 apresenta os valores das concentrações de ^{15}N (átomos % exc.) em função do tempo, na atmosfera admitida aos vasos cultivados com feijoeiro (Figura 5). As composições em % de volume dos gases N_2 , O_2 , Ar e CO_2 , correspondentes as amostragens realizadas, estão relacionadas no Apêndice 4 (páginas 141 a 144).

As Figuras 13 e 14 apresentam as funções exponenciais de diluição da concentração de ^{15}N , na atmosfera dos vasos. Para o feijoeiro cultivado em solo TRE, consideraram-se as concentrações de ^{15}N verificadas nos amostradores c e d; para o tratamento com LVA, tomaram-se os valores obtidos em d e e (Figura 5 e Tabela 10).

As concentrações médias de ^{15}N : 0,940 e 0,912 átomos % em excesso, respectivamente nos tratamentos com solo TRE e LVA foram obtidas

Tabela 10 - Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) na atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em contato com o sistema radicular de feijoeiro, cultivado em vasos, durante 1145 horas.

Tempo (h)	Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) ^(a)		
	Início do sistema (Amostrador c)	Meio do sistema (Amostrador d)	Final do sistema (Amostrador e)
1		1,37	
16	1,18	1,34	
40			0,925
46	0,935	0,945	0,915
65	0,875	0,885	0,835
111	0,745	0,795	0,765
142	0,507	0,599	0,522
158	0,505	0,525	0,481
162	Reposição de $^{15}\text{N}_2$		
165	2,47	2,19	2,35
212	2,20	2,17	2,01
231	2,00	1,97	2,04
233	1,93	1,94	
280	1,64	1,62	1,57
281			1,49
304	1,49	1,41	1,12
327	1,34	1,39	1,33
382	1,11	1,11	1,05
400	1,01	1,09	1,04
447	0,865	0,865	0,825
495	0,655	0,635	0,583
498	Reposição de $^{15}\text{N}_2$		
502	1,27	1,24	1,23
548	1,00	1,03	0,955
616	0,765	0,765	0,695
640	0,645	0,655	0,398
662	0,575	0,575	0,228
666	Reposição de $^{15}\text{N}_2$		
672	1,06	1,06	0,765
718	0,865	0,875	0,845
784	0,655	0,615	0,655
832	0,530	0,523	0,509
880	0,418	0,453	0,415
952	0,247	0,334	0,106
960	Reposição de $^{15}\text{N}_2$		
976	1,04	1,02	1,10
1029			0,795
1072	0,685	0,755	0,675
1119	0,457	0,509	0,474
1145	0,407	0,466	0,401
1145	Final		

(a) Átomos % ^{15}N em excesso = Átomos % ^{15}N na amostra - 0,365 átomos % ^{15}N .

Figura 13 - Diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos, com feijoeiro cultivado em TRE.

Figura 14 - Diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos, com feijoeiro cultivado em LVA.

pela equação 19, considerando o tempo de 1145 horas de duração do experimento.

$$\bar{y} = \frac{\int_0^{t_1} y_1 dt + \int_{t_1}^{t_2} y_2 dt + \dots + \int_{t_4}^{t_5} y_5 dt}{\int_0^{t_5} dt} \dots\dots\dots (19)$$

onde:

$\bar{y}$ - concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) no gás N_2 , no intervalo de tempo de 1145 horas.

$y_1, y_2, \dots, y_5$ - funções exponenciais de diluição da concentração de ^{15}N nos vasos.

t - tempo.

Os resultados de produção de matéria seca, nitrogênio e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro cultivado nos dois solos para as condições: exposição das raízes à atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e ao ar atmosférico, constam dos Apêndices 5, 6 e 7 (páginas 145 a 147). Com os referidos resultados foram elaboradas as Tabelas 11 e 12.

As produções médias de matéria seca e nitrogênio de feijoeiro cultivado em TRE e LVA, para a condição da exposição a atmosfera com $^{15}\text{N}_2$ (Tabela 11), não diferem significativamente pelo Teste t , embora o primeiro tratamento mostre valores mais elevados. O mesmo se verifica para a condição de exposição à atmosfera normal.

Tabela 11 - Produção média de matéria seca e nitrogênio, de feijoeiro cultivado em vasos com solos TRE e LVA para as condições: exposição do sistema radicular a atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e ao ar atmosférico.

Tratamento (solo)	Exposição do sistema radicular e atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$			Exposição do sistema radicular e atmosfera normal		
	Número de repetição	Matéria seca (g/vaso)	Nitrogênio (mg/vaso)	Número de repetição	Matéria seca (g/vaso)	Nitrogênio (mg/vaso)
TRE	5	14,07 (a) ±3,34	249,6 (a) ±51,5	3	13,08 ±2,48	210,8 ±14,7
LVA	7	11,41 ±1,16	216,0 ±25,8	4	11,27 ±3,16	177,6 ±65,7

(a) média e desvio padrão (s)

A tendência observada do feijoeiro cultivado em TRE apresentar valores mais elevados que aqueles em LVA, pode ser devida a fatores nutricionais determinados pela disponibilidade de nutrientes nos dois solos.

O Teste t também não evidencia diferença significativa entre as produções médias do feijoeiro cultivado no mesmo solo, nas duas condições experimentadas.

As concentrações médias de ^{15}N das diferentes partes do feijoeiro, para as condições de exposição ao $^{15}\text{N}_2$ e à atmosfera normal, encontram-se relacionadas na Tabela 12. Pode-se verificar pela citada tabela para a condição de exposição ao $^{15}\text{N}_2$, que as partes da planta do feijoeiro revelam concentrações de ^{15}N significativamente diferentes. Os nódulos e raízes, mostram respectivamente o maior e menor valor, enquanto as vagens, folhas e ramos, possuem concentrações isotópicas intermediárias. Nos Apêndices 5 e 6 (páginas 145 e 146) pode-se verificar que as concentrações de ^{15}N de vagens são sempre maiores que de folhas e ramos.

Para a condição de exposição à atmosfera normal, a concentração isotópica dos nódulos revela-se maior quando comparado às demais partes da planta. Esses resultados mostram-se semelhantes aos obtidos por SHEARER et alii (1980) com a soja.

Análises isotópicas do nitrogênio do solo TRE, indicaram os resultados contidos na Tabela 13.

Tabela 12 - Concentrações médias de ^{15}N (átomos %) no feijoeiro (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) cultivado em vasos com solos TRE e LVA, para as condições: exposição das raízes à atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e ao ar atmosférico.

Partes da planta	Concentração média de ^{15}N (átomos %)			
	Exposição das raízes ao $^{15}\text{N}_2$		Exposição das raízes ao ar atmosférico	
	TRE	LVA	TRE	LVA
Nódulos	1,076 ^a	1,001 ^a	0,371 ^a	0,370 ^a
Raízes	0,731 ^d	0,602 ^d	0,369 ^a	0,367 ^b
Folhas e ramos	0,946 ^c	0,753 ^c	0,366 ^b	0,366 ^{bc}
Vagens	1,002 ^b	0,868 ^b	0,366 ^b	0,365 ^c
DMS (Tukey à 5%)	0,034	0,075	0,0020	0,0019

Tabela 13 - Concentrações de ^{15}N (átomos %) do N-total e N-mineral (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) no solo TRE

Solo	Concentração de ^{15}N (átomos%)	
	N-total	N-mineral (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-)
TRE	0,370 ^(a)	0,380 ^(b)

a e b - média de 4 e 2 determinações, respectivamente

Comparando-se as abundâncias naturais de ^{15}N nas diferentes partes do feijoeiro (Tabela 12), com as concentrações isotópicas do nitrogênio do solo (Tabela 13) e do ar atmosférico (Apêndice 2), constata-se que a parte aérea e raízes possuem respectivamente concentrações isotópicas próximas a do ar atmosférico e do N do solo. Os nódulos, sítios fixadores do dinitrogênio, revelam abundâncias de ^{15}N diferentes daquela para o ar atmosférico.

As concentrações naturais de ^{15}N dos nódulos radiculares de feijoeiro indicam a ocorrência de fracionamento isotópico do nitrogênio. Uma hipótese foi sugerida por SHEARER et alii (1980), sobre a atividade desnitrificadora de certas estirpes de Rhizobium. Outra possibilidade recentemente aventada por SHEARER et alii (1982), refere-se ao fracionamento isotópico associado com a síntese de ureídeos (alantoina e ácido alantoico) e ao transporte desses compostos nitrogenados para a planta.

Os resultados do nitrogênio fixado (%) nas diferentes par-

tes das plantas de feijoeiro que receberam exposição ao $^{15}\text{N}_2$ são apresentados na Tabela 14. Pela citada tabela verifica-se que os nódulos, em relação às demais partes do feijoeiro, possuem a maior fração de nitrogênio fixado. Nas vagens a porcentagem de N-fixado revela-se maior que nas folhas e ramos; enquanto as raízes apresentam a menor fração.

Na Tabela 15 constam os resultados da fixação do N_2 atmosférico em feijoeiro cultivado nos solos TRE e LVA. Para os dois tratamentos cerca de 50% do nitrogênio fixado na planta toda, localizam-se nas vagens, e 25% em folhas e ramos. No sistema radicular 80 a 85% do N-fixado encontram-se nos nódulos. Desses resultados verifica-se que a maior parte do nitrogênio fixado é dirigido para o desenvolvimento das sementes, como sugerido por RUSCHEL et alii (1979b e 1982), e a quantidade de nitrogênio derivado da fixação, existente no sistema radicular principalmente nos nódulos, constituem uma parte significativa do N-total fixado.

Em média 164 mg/duas plantas (65% do N-total) e 111 mg/duas plantas (52% do N-total), representam respectivamente para feijoeiro cultivado em TRE e LVA, o total de nitrogênio fixado no período de tempo compreendido entre o 19º e 67º dia do ciclo da cultura. Com base nesses resultados e considerando que a medida foi realizada por 48 dias do ciclo do feijoeiro, pode-se estimar fixações de 16,4 e 11,1 kg de N/ha, para solos TRE e LVA.

Deve ser ressaltado que no presente experimento não se procedeu à fertilização nitrogenada e que as plantas, foram mantidas sob condições de umidade favoráveis. A Tabela 16 relaciona os valores de umida-

Tabela 14 - Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) em feijoeiro, cultivado em vasos com solos TRE e LVA, aos 67 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Vaso nº	Solo	Conc. ^{15}N no N_2 (átom. % exc.)	Concentração de ^{15}N (átomos. % exc.)					Nitrogênio fixado (a) (%)				
			Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	
1	TRE	0,940	0,729	0,439	0,641	0,670		77,6	46,7	68,2	71,3	
2	TRE	0,940	0,710	0,329	0,567	0,634		75,5	35,0	60,3	67,4	
3	TRE	0,940	0,762	0,390	0,611	0,659		81,1	41,5	65,0	70,1	
4	TRE	0,940	0,653	0,315	0,523	0,582		69,5	33,5	55,6	61,9	
5	TRE	0,940	0,671	0,337	0,559	0,635		71,4	35,9	59,5	67,6	
Média $\pm s/\sqrt{n}$			0,705 $\pm 0,020$	0,362 $\pm 0,023$	0,580 $\pm 0,021$	0,636 $\pm 0,015$		75,0 $\pm 2,1$	38,5 $\pm 2,5$	61,7 $\pm 2,2$	67,7 $\pm 1,6$	
6	LVA	0,912	0,455	0,168	0,274	0,358		49,9	18,4	30,0	39,3	
9	LVA	0,912	0,471	0,238	0,322	0,411		51,6	26,1	35,3	45,1	
10	LVA	0,912	0,570	0,232	0,364	0,471		62,5	25,4	39,9	51,6	
11	LVA	0,912	0,727	0,286	0,449	0,580		79,7	31,4	49,2	63,6	
12	LVA	0,912	0,619	0,208	0,392	0,493		67,9	22,8	43,0	54,1	
13	LVA	0,912	0,775	0,271	0,460	0,581		85,0	29,7	50,4	63,7	
14	LVA	0,912	0,802	0,243	0,451	0,625		87,9	26,6	49,5	68,5	
Média $\pm s/\sqrt{n}$			0,631 $\pm 0,053$	0,235 $\pm 0,015$	0,387 $\pm 0,027$	0,503 $\pm 0,037$		69,2 $\pm 5,9$	25,8 $\pm 1,6$	42,5 $\pm 3,0$	55,1 $\pm 4,0$	

(a) $\text{N-fixado (\%)} = (x/y) 100$
 onde: x - átomos % ^{15}N exc. na planta fixadora
 y - átomos % ^{15}N exc. no N_2 .

Tabela 15 - Nitrogênio fixado (mg/vaso e % do N-total) em feijoeiro cultivado em dois solos aos 67 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$

Vaso n°	Solo	Nitrogênio total(a) (mg/vaso)	Nitrogênio fixado (mg/vaso)					Nitrogênio fixado (% do N-total (a))				
			Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta
1	TRE	291,1	22,7	7,00	60,4	112,8	202,9	7,8	2,4	20,7	38,7	69,7
2	TRE	260,7	22,7	4,20	50,5	91,0	168,4	8,7	1,6	19,4	34,9	64,6
3	TRE	304,3	29,5	5,85	56,4	117,1	208,9	9,7	1,9	18,5	38,5	68,6
4	TRE	198,6	19,1	4,83	34,4	58,7	117,0	9,6	2,4	17,3	29,6	58,9
5	TRE	193,3	16,7	4,52	28,5	73,8	123,5	8,6	2,3	14,7	38,2	63,9
<hr/>												
Média		249,6	22,1	5,28	46,0	90,7	164,1	8,9	2,1	18,1	36,0	65,1
±s/√n		±23,0	±2,2 (13,5%)	±0,51 (3,2%)	±6,2 (28,0%)	±11,2 (55,3%)	±19,2 (100%)	±0,4	±0,2	±1,0	±1,7	±1,9
<hr/>												
8	LVA	215,0	23,8	3,26	14,7	39,5	81,3	11,1	1,5	6,8	18,4	37,8
9	LVA	267,4	29,4	5,25	29,9	47,5	112,1	11,0	2,0	11,2	17,8	41,9
10	LVA	199,2	28,2	4,88	18,1	46,2	97,4	14,2	2,5	9,1	23,2	48,9
11	LVA	221,0	32,3	6,71	35,3	55,6	129,9	14,6	3,0	16,0	25,2	58,8
12	LVA	199,9	21,2	4,29	37,6	33,8	95,9	10,6	2,1	18,8	16,9	43,5
13	LVA	188,3	28,5	3,71	30,6	52,0	114,8	15,1	2,0	16,3	27,6	61,0
14	LVA	221,0	32,6	5,38	20,4	83,9	142,3	14,8	2,4	9,2	38,0	64,4
<hr/>												
Média		216,0	28,0	4,78	26,7	51,2	110,7	13,1	2,2	12,5	23,9	51,6
±s/√n		±9,8	±1,6 (25,3%)	±0,44 (4,3%)	±3,4 (24,1%)	±6,1 (46,3%)	±7,9 (100%)	±0,8	±0,2	±1,7	±2,8	±3,8

(a) N-total de planta toda.

de % em volume dos solos TRE e LVA determinados ao final do experimento.

Tabela 16 - Umidade % em volume (θ) dos solos TRE e LVA, onde cultivou-se feijão expondo os sistemas radiculares ao $^{15}\text{N}_2$.

TRE		LVA	
Vaso nº	θ (%)	Vaso nº	θ (%)
1	46,2	8	22,6
2	49,7	9	22,0
3	46,6	10	22,7
4	46,7	11	24,9
5	46,5	12	23,3
7	46,5	13	23,4
		14	22,5
m $\pm$ s	47,0 $\pm$ 1,3		23,1 $\pm$ 0,9

A menor taxa de fixação verificada para o tratamento com LVA pode estar relacionada com aspectos da nutrição do feijoeiro nesse solo, visto que, os nódulos mostraram teores de nitrogênio fixado comparáveis aos do primeiro tratamento, mas a parte aérea das plantas evidenciaram baixas quantidades de N-fixado (Tabelas 14 e 15).

As Figuras 15a e b, construídas com os dados que constam do Apêndice 8 (página 148), ilustram para o experimento o ganho em nitrogênio pela parte aérea, peso de nódulos e atividade fixadora dos nódulos radiculares de feijoeiro, em função do tempo. O período em

Figura 15 a e b - Ganho em nitrogênio pela parte aérea, peso seco de nódulos e atividade redutora da nitrogenase de feijoeiro cultivado em vaso, em função do tempo.

que se procedeu a medida da fixação com $^{15}\text{N}_2$, está indicado nas citadas figuras.

Em condições de casa de vegetação, diferentemente do que se observou no experimento de campo, a massa de nódulos e a atividade redutora da enzima nitrogenase revelam-se crescentes com o tempo de cultivo do feijoeiro. Esses fatos indicam que se forem mantidas condições favoráveis de nutrição, e principalmente de umidade do solo como verificado por MONTANHEIRO (1980), a fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro é mantida por grande parte do ciclo da cultura.

4.2.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e uso do trigo como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico

4.2.2.1. Cultivo de abril a junho em Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa (LVA)

Os resultados da Tabela 17, elaborada com os dados dos Apêndices 9 e 10 (páginas 149 e 150), referem-se às quantidades médias de nitrogênio e concentrações de ^{15}N no feijoeiro e trigo adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Na referida tabela pode-se verificar que as concentrações médias de ^{15}N nas partes do feijoeiro revelam-se diferentes. As raízes e nódulos mostram o maior e menor valor, enquanto na parte aérea, as folhas e ramos apresentam maior concentração isotópica do que as vagens.

Para o trigo os valores médios de ^{15}N em átomos %, da par-

Tabela 17 - Quantidade média de nitrogênio e concentração de ^{15}N em feijoeiro e trigo que receberam adubação com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (cultivo de abril a junho).

Partes da planta	Feijoeiro		Trigo	
	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. de ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. de ^{15}N (átomos%)
Sistema radicular			14,0	0,550
Nódulos	32,0	0,427 ^d		
Raízes	28,4	0,499 ^a		
Parte aérea			54,3	0,584
Folhas e ramos	67,6	0,464 ^b		
Vagens	129,5	0,437 ^c		
Planta toda	257,5		68,3	
DMS (Tukey à 5%)		0,0067		0,051

te aérea e sistema radicular não se revelam diferentes, e são maiores que os obtidos para feijoeiro..

Os resultados contidos na Tabela 18 evidenciam a melhor utilização do N do fertilizante pelo feijoeiro, em comparação com o trigo.

O método de medida da fixação do dinitrogênio proposto por FRIED e MIDDELBOE (1977), empregando culturas fixadoras e não fixadoras do N₂ simbiótico sob mesma taxa de fertilização nitrogenada, supõem que as culturas devam absorver quantidades de nitrogênio do solo e do fertilizante numa mesma proporção.

A proporção do N absorvido do fertilizante e do solo, pela cultura de trigo, pode ser calculada com dados que constam das Tabelas 17 e 18 (equação 20).

$$\frac{\text{NPF}}{\text{NPS}} = \frac{14,7}{53,6} = 0,274 \dots\dots\dots (20)$$

onde: NPF - quantidade de nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (mg/vaso).

NPS - quantidade de nitrogênio na planta derivada do solo (mg/vaso).

Pela teoria básica do método a razão NPF/NPS obtida com o trigo deve ser a mesma na cultura do feijoeiro, para que seja válido o uso do princípio de diluição isotópica nos cálculos da fixação do dinitrogênio.

Tabela 18 - Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do fertilizante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) em feijoeiro e trigo cultivados em Latossolo Vermelho Amarelo, fase arenosa (cultivo de abril a junho).

Partes da planta	Feijoeiro ^(a)		Trigo ^(b)	
	NPF (mg/vaso)	EUF (%)	NPF (mg/vaso)	EUF (%)
Sistema radicular			2,73 ±1,63	4,4 ±2,6
Nódulos	1,86 ±0,29	3,0 ±0,5		
Raízes	3,82 ±0,70	6,1 ±1,1		
Parte aérea			11,98 ±1,23	19,2 ±2,0
Folhas e ramos	6,71 ±1,45	10,7 ±2,3		
Vagens	9,29 ±1,40	14,9 ±2,2		
Planta toda	21,67 ±2,72	34,7 ±4,3	14,71 ±2,86	23,6 ±4,6

a e b - média e desvio padrão ($m \pm s$) para 8 e 2 repetições respectivamente.

Com os dados obtidos no presente experimento (Tabela 18) não se verificam indicações a respeito da igualdade nas razões NPF/NPS para as culturas do feijoeiro e trigo. Mesmo assim, os cálculos da fixação do dinitrogênio foram feitos considerando-se válida a suposição básica do método. Deve ser ressaltado que na data da colheita (67 dias do plantio) tanto o trigo como o feijoeiro apresentavam-se visualmente, dentro da mesma faixa de idade fisiológica (enchimento das vagens).

Os resultados do nitrogênio fixado (%) no feijoeiro são apresentados na Tabela 19. Verifica-se pela citada tabela, a semelhança do observado no experimento com gás $^{15}\text{N}_2$ (item 4.2.1.), que os nódulos possuem a maior fração de nitrogênio fixado, em comparação às demais partes da planta. Nas vagens a porcentagem de N-fixado revela-se maior que em folhas e ramos, enquanto as raízes apresentam a menor fração.

Na Tabela 20 também se verificam resultados muito próximos aos obtidos no experimento com gás $^{15}\text{N}_2$ (item 4.2.1.). Do nitrogênio total fixado no feijoeiro cerca de 55% é encontrado nas vagens, e 23% em folhas e ramos. No sistema radicular a maior parte do nitrogênio fixado localiza-se nos nódulos. Em média a quantidade fixada foi de 155 mg de N/duas plantas, valor esse equivalente a 60% do N-total considerando-se a planta toda.

Da comparação dos resultados de fixação do dinitrogênio obtidos no presente experimento com aqueles verificados em 4.2.1., é notória a maior fixação no feijoeiro que recebeu fertilização nitrogenada, como também são maiores as produções médias de matéria seca e nitrogênio to

Tabela 20 - Nitrogênio fixado em feijoeiro cultivado em vasos com LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho).
Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora.

Número de repetições	Nitrogênio total (a) (mg/vaso)	Nitrogênio fixado (b) (mg/vaso) $\pm \sigma$ (c)					Nitrogênio fixado (% do N-total (d))				
		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
8	257,5	23,3	10,5	36,0	85,1	154,5	9,1	4,1	14,0	33,0	60,0
	$\pm 15,5$	$\pm 1,4$ (15%)	$\pm 2,1$ (7%)	$\pm 4,7$ (23%)	$\pm 9,0$ (55%)	$\pm 14,9$ (100%)					

(a) média e erro padrão da média para a planta toda.

(b) N-fixado (mg/vaso) = $x \cdot y$.

(c) $\sigma = [x^2 \cdot \sigma y^2 + y^2 \cdot (\sigma x/100)^2]^{1/2}$

Significando:

x - N-fixado (%)/100.

y - N-total na parte considerada do feijoeiro (mg/vaso)

σ - erro padrão.

(d) N-total da planta toda.

tais (Tabela 21). Esse fato pode ter relação com provável efeito sinérgico da adubação nitrogenada na fixação do N_2 , também verificado em condições semelhantes de fertilização, para a cultura de soja por RUSCHEL et alii (1979b).

Tabela 21 - Matéria seca e nitrogênio total de feijoeiro cultivado em LVA com e sem adubação nitrogenada equivalente a 25 kg/ha de N, aplicado no 19º dia do plantio (cultivo de abril a junho).

Com adubação nitrogenada(a)			Sem adubação nitrogenada(b)		
Nº de repetições	Matéria seca ^(c) (g/vaso)	Nitrogênio (mg/vaso)	Nº de repetições	Matéria seca (g/vaso)	Nitrogênio (mg/vaso)
8	14,64 ±2,60	257,5 ±43,9	11	11,36 ±1,96	202,0 ±45,5

(a) resultados que constam do Apêndice 9

(b) resultados que constam dos Apêndices 6 e 7

(c) os resultados representam a média e desvio padrão ($m \pm s$)

Na Tabela 22, elaborada com resultados das Tabelas 17, 18 e 20, pode ser observado que na parte aérea do feijoeiro, principalmente nas vagens, se concentram as maiores quantidades de nitrogênio proveniente da fixação, do fertilizante e do solo. Pode-se ainda verificar que para as condições do experimento, o nitrogênio derivado do fertilizante representou a menor fração do N-total em todas as partes da planta.

Tabela 22 - Nitrogênio derivado da fixação, do fertilizante e do solo em feijoeiro cultivado em LVA (cultivo de abril a junho).

Nitrogênio na planta	Nitrogênio (mg/vaso)				
	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
N-fixação	23,3 (72,8%)	10,5 (37,0%)	36,0 (53,6%)	85,1 (65,7%)	154,9 (60,2%)
N-fertilizante	1,9 (5,9%)	3,8 (13,4%)	6,7 (9,9%)	9,3 (7,2%)	21,7 (8,4%)
N-solo	6,8 (21,3%)	14,1 (49,6%)	24,9 (36,8%)	35,1 (27,1%)	80,9 (31,4%)
Total	32,0 (100%)	28,4 (100%)	67,6 (100%)	129,5 (100%)	257,5 (100%)

4.2.2.2. Cultivo de outubro a dezembro em Terra Roxa Estru- turada (TRE)

Os resultados de matéria seca, nitrogênio e concentração de ^{15}N no feijoeiro e trigo cultivados em TRE, estão contidos nos Apêndices 11 e 12 (páginas 151 e 152).

Na Tabela 23 encontram-se relacionadas as médias de quantidade de nitrogênio e concentração de ^{15}N das plantas que receberam fertilização com $(^{15}\text{NH}_4)_4\text{SO}_4$. Os valores de ^{15}N das plantas adubadas mostram-se mais elevados que os obtidos no experimento anterior, e são devidos à maior concentração do isótopo no fertilizante. Para o feijoeiro, as concentrações de ^{15}N em raízes, vagens, folhas e ramos não revelam diferen-

Tabela 23 - Quantidades médias de nitrogênio e concentração de ^{15}N em feijoeiro e trigo adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (cultivo de outubro a dezembro).

Partes da planta	Feijoeiro		Trigo	
	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. ^{15}N (átomos%)
Sistema radicular			23,9	1,143 ^b
Nódulos	2,3	0,521 ^b		
Raízes	13,0	0,705 ^a		
Parte aérea			129,5	1,823 ^a
Folhas e ramos	199,4	0,683 ^a		
Vagens	384,9	0,689 ^a		
Planta toda	599,6		153,4	
DMS		0,064		0,235
(Tukey à 5%)				

ças significativas e são maiores que a obtida nos nódulos.

No trigo adubado, o valor de ^{15}N nas raízes mostra-se menor que na parte aérea. Resultados semelhantes com a linhagem de trigo TICE-NA-2 foram observados por SAITO et alii (1981) e RUSCHEL et alii (1982). Como explicação desse fato, deve ser lembrado que aplicou-se a primeira parcela do fertilizante nitrogenado aos 25 dias do plantio, e nessa época muitas raízes já tinham sido formadas, com nitrogênio do solo e da semente.

Na Tabela 24 pode ser observado que o feijoeiro e trigo apresentaram a mesma eficiência de utilização do fertilizante nitrogenado. Esses resultados parecem indicar, segundo a suposição básica do método de medida da fixação do dinitrogênio proposto por FRIED e MIDDELBOE (1977), que as duas culturas absorveram nitrogênio do solo e do fertilizante na mesma proporção. Deve ser relatado também, que na data da colheita (60 dias do plantio) o feijoeiro e o trigo apresentavam a mesma idade fisiológica (enchimento das vagens).

Tendo por base as evidências apresentadas, a fixação do N_2 atmosférico no feijoeiro foi determinada pelo método da diluição isotópica e os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 25 e 26.

Nesse experimento a taxa de fixação do dinitrogênio considerando a planta toda, foi de 76%, o que equivaleu à quantidade média fixada de 457 mg de N/duas plantas.

Tabela 24 - Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do fertilizante $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) em feijoeiro e trigo cultivados em Terra Roxa Estruturada (cultivo de outubro a dezembro).

Partes da planta	Feijoeiro (a)		Trigo (a)	
	NPF (mg/vaso)	EUF (%)	NPF (mg/vaso)	EUF (%)
Sistema radicular			3,32 ± 0,39	5,31 ± 0,63
Nódulos	0,07 ± 0,05	0,11 ± 0,08		
Raízes	0,79 ± 0,16	1,27 ± 0,26		
Parte aérea			34,0 ± 1,8	54,4 ± 2,8
Folhas e ramos	11,3 ± 2,0	18,2 ± 3,1		
Vagens	22,1 ± 3,3	35,4 ± 5,2		
Planta toda	34,3 ± 5,0	55,0 ± 8,1	37,3 ± 1,9	59,7 ± 3,0

a - média e desvio padrão (m ± s) para 3 repetições.

Tabela 25 - Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) em feijoeiro cultivado em vasos com solo TRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro). Determinação pelo método de diluição isotópica com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora.

Conc. ^{15}N no trigo (a)(b) (átomos% exc.)	Conc. de ^{15}N no feijoeiro (a) (átom.% exc.)					Nitrogênio fixado (%) (c) $\pm \sigma$ (d)				
	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda (b)	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
1,343 $\pm 0,014$	0,145 $\pm 0,028$	0,335 $\pm 0,020$	0,314 $\pm 0,025$	0,321 $\pm 0,032$	0,319 $\pm 0,022$	89,2 $\pm 2,1$	75,1 $\pm 1,5$	76,6 $\pm 1,9$	76,1 $\pm 2,4$	76,2 $\pm 1,7$

(a) média e erro padrão da média para 3 repetições.

(b) média ponderada dos valores médios de todas as partes das plantas.

(c) N-fixado (%) = $(1 - x/y) \cdot 100$

(d) $\sigma = [(x^2/y^4 \cdot \sigma y^2 + \sigma x^2/y^2)^{1/2}] \cdot 100$

Significando:

x - (átomos % ^{15}N exc.) planta fix.

y - (átomos % ^{15}N exc.) planta não fix.

σ - erro padrão.

Tabela 26 - Nitrogênio fixado em feijoeiro cultivado em vasos, com solo IRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro). Determinação pelo método de diluição isotópica, com edição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando o trigo como planta controle não fixadora.

Número de repetições	Nitrogênio total (a) (mg/vaso)	Nitrogênio fixado (mg/vaso) (b) $\pm \sigma$ (c)					Nitrogênio fixado (% do N-total) (d)			
		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens
3	599,7 $\pm 32,2$	2,1 $\pm 0,5$ (0,5%)	9,8 $\pm 0,9$ (2,1%)	152,7 $\pm 12,2$ (33,4%)	292,9 $\pm 22,7$ (64,0%)	457,0 $\pm 26,6$ (100%)	0,4	1,6	25,5	48,8
										76,2

(a) média e erro padrão da média para a planta toda.

(b) N-fixado (mg/vaso) = $x \cdot y \cdot \frac{1}{2}$

(c) $\sigma = \left[x^2 \cdot \sigma_y^2 + y^2 \cdot (\sigma_x/100)^2 \right]^{1/2}$

Significando:

x - N-fixado (%)/100.

y - N-total na parte considerada do feijoeiro (mg/vaso).

σ - erro padrão.

(d) N-total da planta toda.

4.3. Medida da fixação do N_2 atmosférico na soja, em condições de casa de vegetação

4.3.1. Utilização de atmosfera enriquecida em $^{15}N_2$

As concentrações isotópicas do N_2 (átomos % de ^{15}N exc.) em função do tempo, na atmosfera dos vasos cultivados com a soja (Figura 7) encontram-se na Tabela 27, que foi construída a partir dos dados relacionados no Apêndice 13 (páginas 153 a 157). Com os valores médios de ^{15}N da tabela acima citada, elaborou-se a Figura 16, onde constam as funções exponenciais de diluição da concentração de ^{15}N , na atmosfera dos vasos. A concentração média de ^{15}N : 0,906 átomos excesso, foi obtida por integração das funções exponenciais, no tempo de 1097 horas de condução experimental, como apresentado em 4.2.1. (equação 19).

Os resultados obtidos para matéria seca, quantidades de nitrogênio e concentrações de ^{15}N da soja não nodulante e nodulante, mantidas sob condições de exposição radicular à atmosfera marcada com ^{15}N , encontram-se nos Apêndices 14 e 15 (páginas 158 e 159).

Os valores médios de ^{15}N nas diferentes partes da soja nodulante, relacionados na Tabela 28, mostram-se diferentes à semelhança do observado no experimento com feijoeiro (item 4.2.1.). Os nódulos e raízes revelam o maior e menor valor, enquanto a parte aérea possui concentração isotópica intermediária.

Tabela 27 - Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) na atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, em contato com o sistema radicular da soja, cultivada em vasos, durante 1097 horas (cultivo de outubro a dezembro).

Tempo (h)	Concentração de ^{15}N (átomos % exc. (a))			Média ± desvio padrão(s)
	Início do sistema (Amostrador b)	Meio do sistema (Amostrador c)	Final do sistema (Amostrador c)	
1	0,935	0,655		0,795±0,198
17	0,805	0,715	0,805	0,775±0,052
45	0,685	0,655	0,655	0,665±0,017
90	0,599	0,575	0,592	0,589±0,012
113	0,548	0,546	0,552	0,549±0,003
137	0,491	0,486	0,473	0,483±0,009
144	Reposição de $^{15}\text{N}_2$			
161	1,34	1,54	1,29	1,390±0,132
210	0,935	1,11	1,27	1,105±0,168
257	1,06	1,07	1,13	1,087±0,038
264	1,08	1,09	1,08	1,083±0,006
281	1,07	0,795	1,02	0,962±0,146
329	0,885	0,915	0,845	0,882±0,035
353	0,905	0,845	0,785	0,845±0,060
383	0,835	0,745	0,805	0,795±0,046
425	0,755	0,745	0,745	0,748±0,006
449	0,735	0,705	0,685	0,708±0,025
449	Reposição de $^{15}\text{N}_2$			
457	1,90	1,89	1,89	1,893±0,006
473	1,86	1,76	1,85	1,823±0,055
521	1,58	1,44	1,63	1,550±0,098
545	1,49	1,39	1,48	1,453±0,055
593	1,32	1,25	1,25	1,273±0,040
641	0,705	0,985	1,06	0,917±0,187
664	0,925	0,845	0,865	0,878±0,042
713	0,745	0,715	0,785	0,742±0,025
761	0,613	0,614	0,635	0,621±0,012
786	0,589	0,569	0,519	0,559±0,036
786	Reposição de $^{15}\text{N}_2$			
793	1,27	1,27	1,24	1,260±0,017
809	1,21	1,18	1,10	1,163±0,057
841	1,03	1,00	1,03	1,020±0,017
856	1,00	1,00	0,835	0,945±0,095
887	0,815	0,805	0,795	0,805±0,010
906	0,755	0,755	0,795	0,768±0,023
953	0,655	0,618	0,609	0,627±0,024
977	0,585	0,492	0,546	0,542±0,047
1026	0,494	0,425	0,475	0,465±0,036
1073	0,395	0,363	0,391	0,383±0,017
1097	0,357	0,321	0,331	0,336±0,019
1097	Final			

(a) Átomos % ^{15}N em excesso = Átomos % ^{15}N na amostra - 0,365 átomos % ^{15}N .

Figura 16 - Funções exponenciais de diluição da concentração de ^{15}N na atmosfera dos vasos com soja.

Tabela 28 - Quantidades médias de nitrogênio e concentração de ^{15}N na soja nodulante e não nodulante, cultivada sob condições de exposição radicular à atmosfera marcada com ^{15}N .

Partes da planta	Soja nodulante		Soja não nodulante	
	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/vaso)	Conc. ^{15}N (átomos%)
Sistema radicular			33,6	0,387
nódulos	98,3	1,079 ^a		
raízes	62,8	0,762 ^d		
Parte aérea			89,8	0,387
folhas e ramos	514,1	1,032 ^b		
vagens	57,1	0,987 ^c		
Planta toda	732		124,4	
(m $\pm$ s)	± 152		$\pm 25,9$	
DMS (Tukey a 5%)		0,037		

No Apêndice 14 pode ser observada a ocorrência de nódulos em um dos vasos contendo soja não nodulante, o que resultou em valores de ^{15}N pouco acima da abundância natural para as amostras dessas plantas. Mesmo assim verifica-se dos dados isotópicos e de N-total na Tabela 28, grandes diferenças entre as isolinhas de soja.

A porcentagem de nitrogênio fixado nos nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos da soja nodulante, determinados com os dados isotópicos, são apresentados na Tabela 29. Nos nódulos a maior parte do nitro-

Tabela 29- Concentração de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio fixado (%) na soja cultivada em vasos com solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Vaso n°	Conc. ^{15}N no N_2 (átom. % exc.)	Concentração de ^{15}N (átomos % exc.)				Nitrogênio fixado (%) (b)			
		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens
4	0,906	0,722	0,453	0,648	0,618	79,7	50,0	71,5	68,2
5	0,903	0,731	0,379	0,702	0,628	80,7	41,8	77,5	69,3
6	0,906	0,750	0,410	0,689	0,649	82,6	45,2	76,0	71,6
7	0,906	0,572	0,313	0,554	0,522	63,1	34,5	61,1	57,6
8	0,906	0,669	0,360	0,637	0,570	73,8	39,7	70,3	62,9
9	0,906	0,768	0,469	0,763	0,685	84,8	51,8	84,2	75,6
10	0,906	0,739	0,373	0,660	0,667	81,6	41,2	72,8	73,6
Média $\pm s/\sqrt{n}$ (a)		0,707 $\pm 0,025$	0,394 $\pm 0,020$	0,665 $\pm 0,025$	0,620 $\pm 0,022$	78,1 $\pm 2,6$	43,5 $\pm 2,3$	73,3 $\pm 2,7$	68,4 $\pm 2,4$

(a) erro padrão da média.

(b) N-fixado (%) = $(x/y) 100$.

significando: x - átomos % ^{15}N exc. na soja
y - átomos % ^{15}N exc. no N_2 .

gênio é proveniente da fixação (78%), enquanto nas raízes o N-fixado representa pouco mais de 40% do total. Na parte aérea, as folhas e ramos mostram maior porcentagem de N-fixado que as vagens.

A Tabela 30 relaciona os resultados da fixação do nitrogênio na soja, obtidos com dados isotópicos e de N-total. Na citada tabela pode ser observado que 80% do nitrogênio fixado é encontrado na parte aérea; no sistema radicular a maior quantidade desse nitrogênio se concentra nos nódulos.

O N-fixado das vagens representou no presente experimento uma pequena parte do total fixado na soja. Este fato ocorreu em função da idade fisiológica das plantas, que se apresentavam na época da colheita, em estágio final de florescimento e início de formação das vagens. Deve ser lembrado que no início do desenvolvimento da soja houve retardo no crescimento, em virtude de queima das folhas provocada na aplicação de pesticida.

Considerando a idade fisiológica da soja na época da colheita e o tempo de medida da fixação do dinitrogênio, do 24º ao 70º dia do plantio, a quantidade média fixada foi de 528 mg de N/duas plantas(71% do N-total).

Na soja não nodulante a taxa de fixação obtida com dados isotópicos foi de 1,7%, equivalendo à quantidade fixada de 2 mg de N/ duas plantas. Esses resultados mostram-se desprezíveis comparados à fixação do N₂ simbiótico na soja nodulante.

Tabela 30- Nitrogênio fixado (mg de N/vaso e % do N-total) na soja cultivada em solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação por exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Vaso nº	Nitrogênio total(a)	Nitrogênio fixado (mg/vaso)					Nitrogênio fixado (% do N-total (a))				
		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
4	689,3	77,0	28,0	341,7	40,2	486,9	11,2	4,1	49,6	5,8	70,6
5	779,8	86,8	26,0	438,3	29,0	582,1	11,4	3,3	56,2	3,7	74,6
6	608,3	71,3	25,1	323,0	30,1	449,5	11,7	4,1	53,1	4,9	73,9
7	551,1	53,5	19,8	218,1	30,1	321,5	9,7	3,6	39,6	5,5	58,3
8	681,2	63,7	22,8	333,5	39,8	459,8	9,4	3,3	49,0	5,8	67,5
9	1011,6	86,4	40,5	623,8	68,7	819,4	8,5	4,0	61,7	6,8	81,0
10	844,3	99,6	30,0	406,9	37,3	573,8	12,4	3,7	50,6	4,6	71,3
Média	732,2	77,2	27,5	383,6	39,3	527,6	10,6	3,7	51,4	5,3	71,0
±s/vh	±57,3	±6,0	±2,5	±47,9	±5,2	±58,8	±0,5	±0,1	±2,6	±0,4	±2,7
		(14,6%)	(5,2%)	(72,7%)	(7,5%)	(100%)					

(a) N-total da planta toda.

Nesse experimento as plantas de soja permaneceram sob condições controladas de umidade de solo. A Tabela 31 apresenta os resultados de umidade % em volume do solo, determinados ao final do experimento. Os valores mais baixos de umidade do solo para os vasos com soja nodulante, indicam maior transpiração dessas plantas.

Tabela 31 - Umidade % em volume (θ) do solo TRE, onde cultivou-se a soja expondo os sistemas radiculares ao $^{15}\text{N}_2$.

Vaso nº	Isolinha de soja	θ (%)
1	não nodulante	36,8
2	não nodulante	37,9
3	nodulante	28,0
5	nodulante	26,9
6	nodulante	24,2
7	nodulante	32,8
8	nodulante	22,4
9	nodulante	21,6
10	nodulante	22,8

Os resultados de análises de ^{15}N do nitrogênio do solo, no vaso mantido sem plantas sob exposição ao $^{15}\text{N}_2$ (Tabela 32), não evidenciaram a fixação do dinitrogênio por microrganismos de vida livre.

A Figura 17, elaborada com dados que constam do Apêndice 16 (página 160), mostra valores crescentes de matéria seca de nódulos e atividade redutora da enzima nitrogenase, para soja cultivada em vasos,

Figura 17 - Matéria seca de nódulos e atividade redutora da nitrogênio em função do tempo, na soja cultivada em vaso.

nos primeiros setenta dias de cultivo.

Tabela 32 - Concentrações de ^{15}N (átomos %) do N-total e N-trocável (NH_4^+ , NO_3^- e NO_2^-) no solo TRE mantido por 45 dias sob atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Profundidades do solo no va so (cm)	Concentração de ^{15}N (átomos%)	
	N-total	N-mineral (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-)
0 - 5	0,369	0,377
5 - 10	0,370	0,374
10 - 20	0,371	0,373

4.3.2. Adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo e uso da isolinha não nodulante da soja como planta controle não fixadora do N_2 simbiótico

As médias de produção de nitrogênio e concentrações de ^{15}N das isolinhas de soja, adubadas e não adubadas com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, encontram-se na Tabela 33 e foram obtidas com dados relacionados nos Apêndices 17 e 18 (páginas 161 e 162).

Com os resultados da tabela acima citada observou-se que as quantidades totais de nitrogênio na soja nodulante, adubada e não adubada, diferem significativamente pelo Teste t ao nível de probabilidade de 5%. Na isolinha não nodulante a produção total de nitrogênio das plantas que receberam ou não fertilização nitrogenada, é a mesma.

Tabela 33 - Valores médios de nitrogênio e concentração de ^{15}N nas isolinhas de soja nodulante e não nodulante, que receberam ou não adubação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, enriquecido a 5,89 átomos % de ^{15}N .

Partes da planta	Soja nodulante				Soja não nodulante			
	Adubado		Não adubado		Adubado		Não adubado	
	Nitrogênio (mg/veso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/veso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/veso)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg/veso)	Conc. ^{15}N (átomos%)
Sistema radicular								
nódulos	137,0	0,419 ^c	113,3	0,372 ^a	29,3	1,138 ^b	33,4	0,372
raízes	77,4	0,645 ^a	100,8	0,368 ^b				
Parte aérea								
folhas e ramos	655,2	0,552 ^b	577,6	0,367 ^b	103,1	1,684 ^a	101,2	0,372
vagens	213,1	0,442 ^c	161,3	0,367 ^b				
Planta toda (m $\pm$ s)	1084 $\pm$ 37		953 $\pm$ 43		132,4 $\pm$ 12,9		134,6 $\pm$ 36,7	
DMS (Tukey a 5%)		0,066		0,0041		0,436		0,0038

As quantidades de nitrogênio nas plantas deste experimento revelaram-se maiores comparadas às da soja do experimento com gás $^{15}\text{N}_2$. Como mencionado em 4.3.1., deve ser considerado que as plantas daquele experimento sofreram injúrias provocadas por pesticidas.

As concentrações de ^{15}N nas diferentes partes da soja nodulante fertilizada com $^{15}\text{NH}_4^+$ (Tabela 33), revelam-se diferentes. As raízes e nódulos mostram respectivamente o maior e menor valor, enquanto na parte aérea a concentração isotópica nas folhas e ramos é maior que nas vagens.

Para a soja não nodulante adubada, a concentração de ^{15}N nas raízes mostrou-se menor que na parte aérea, a semelhança do que se verificou para o trigo em experimento analisado anteriormente (item 4.2.2.2).

Na Tabela 34 pode ser observado que a soja nodulante e não nodulante apresentam resultados iguais de nitrogênio derivado do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF), com relação à planta toda.

Considerando que as isolinhas da soja são geneticamente idênticas exceto na capacidade de nodulação, os resultados da Tabela 34 parecem indicar que a mesma quantidade do N do solo foi absorvido pelas duas culturas.

Tendo por base essas considerações a fixação do dinitrogênio na soja foi calculada pelo método da diluição isotópica, segundo FRIED e MIDDELBOE (1977), e os resultados são apresentados nas Tabelas 35 e 36.

Os valores contidos na Tabela 35 indicam como verificado no experimento anterior, que os nódulos possuem a maior porcentagem de N-fixado em comparação às demais partes do planta, enquanto as raízes apresentam a menor fração. Na parte aérea o valor de N-fixado (%) foi maior nas vagens que em folhas e ramos. Em média 87% do nitrogênio total da soja foi derivado da fixação.

Pode ser observado pelos resultados dependentes da produção que foi fixado na soja a quantidade de 945 mg de N/duas plantas. Do total fixado 80% foi encontrado na parte aérea, 6% nas raízes e 14% nos nódulos.

Tabela 34 - Nitrogênio na planta derivado do fertilizante (NPF) e eficiência de utilização do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (EUF) nas isolinhas de soja nodulante e não nodulante, cultivadas em vaso

Partes da planta	Soja nodulante ^(a)		Soja não nodulante ^(a)	
	NPF (mg/vaso)	EUF (%)	NPF (mg/vaso)	EUF (%)
Sistema radicular			4,0 ±0,6	6,4 ±0,8
Nódulos	1,2 ±0,3	1,9 ±0,5		
Raízes	3,8 ±0,5	6,0 ±0,8		
Parte aérea			24,3 ±1,6	38,9 ±2,5
Folhas e ramos	21,9 ±2,0	35,1 ±3,2		
Vagens	2,9 ±1,0	4,7 ±1,6		
Planta toda	29,8 ±2,3	47,7 ±3,7	28,3 ±1,2	45,2 ±1,9

(a) média e desvio padrão ($m \pm s$) para 3 repetições.

Tabela 35- Concentração média de ^{15}N (átomos % exc.) e nitrogênio derivado da fixação (%) na soja cultivada em vasos com solo TRÉ, aos 70 dias do plantio. Determinação pelo método de diluição isotópica com edição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, utilizando a soja não nodulante como planta controle não fixadora.

Conc. ^{15}N na soja não fix. (átomos % ^{15}N exc.)	Concentração de ^{15}N na soja fixadora (a)				Nitrogênio fixado (%) (c) $\pm \sigma$ (d)			
	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Planta toda (b)	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Planta toda
1,192	0,047	0,277	0,185	0,075	96,1	76,8	84,5	87,2
$\pm 0,096$	$\pm 0,005$	$\pm 0,029$	$\pm 0,012$	$\pm 0,009$	$\pm 0,5$	$\pm 3,1$	$\pm 1,6$	$\pm 1,2$

(a) média e erro padrão da média para 3 repetições.

(b) média ponderada dos valores médios de todas as partes das plantas.

(c) N-fix. (%) = $(1 - x/y) \cdot 100$

(d) $\sigma = \left[(x^2/y^4 \cdot \sigma_y^2 + \sigma_x^2/y^2)^{1/2} \right] \cdot 100$

Significando:

x - (átomos % ^{15}N exc.) planta fix.

y - (átomos % ^{15}N exc.) planta não fix.

σ - erro padrão.

Tabela 36 - Nitrogênio fixado na soja cultivada em vasos, com solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação pelo método de diluição isotópica, com adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, empregando a soja não nodulante como planta controle não fixadora.

Número de repetições	Nitrogênio total (a) (mg/vaso)	Nitrogênio fixado (mg/vaso) (b) $\pm$ σ (c)				Nitrogênio fixado (% do Ntotal (a))			
		Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos
3	1083,7	131,7	59,4	554,5	189,7	945,0	12,2	5,5	51,2
	$\pm 21,1$	$\pm 6,6$	$\pm 0,3$	$\pm 16,2$	$\pm 18,8$	$\pm 22,5$			
		(14%)	(6%)	(59%)	(21%)	(100%)			
							12,2	5,5	51,2
									87,2

(a) média e erro padrão da média para a planta toda.

(b) N-fix. (mg/vaso) = $x \cdot y \cdot 1/2$

(c) $\sigma = [x^2 \sigma_y^2 + y^2 (\sigma_x/100)^2]^{1/2}$

Significando:

x - Nd fix. (%) / 100

y - N-total na parte considerada da soja (mg/vaso)

σ - erro padrão.

(d) N-total da planta toda.

A Tabela 37 construída com resultados que constam das Tabelas 33, 34 e 36, evidencia para as condições do experimento, que o nitrogênio derivado do fertilizante representa a menor fração do N-total em todas as partes da planta.

Tabela 37 - Nitrogênio derivado da fixação do fertilizante e do solo na soja cultivada em solo TRE.

Nitrogênio na planta	Nitrogênio (mg/vaso)				
	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
N-fixação	131,7 (96,1%)	59,4 (76,7%)	554,5 (84,5%)	199,7 (93,7%)	945,3 (87,2%)
N-fertilizante	1,2 (0,9%)	3,8 (4,9%)	21,9 (3,3%)	2,9 (1,4%)	29,8 (2,8%)
N-solo	4,1 (3,0%)	14,2 (18,4%)	79,8 (12,2%)	10,5 (4,9%)	108,6 (10,0%)
Total	137,0 (100%)	77,4 (100%)	656,2 (100%)	213,1 (100%)	1083,7 (100%)

4.3.3. Uso das variações naturais de ^{15}N das isolinhas de soja nodulante e não nodulante.

Os resultados de variações naturais ($\delta^{15}\text{N}$) apresentados na Tabela 38, indicam que na soja nodulante as raízes e nódulos são enriquecidos em ^{15}N com relação à parte aérea. Na isolinha não nodulante, a parte aérea e radicular mostram a mesma razão isotópica.

Como foi observado para as concentrações naturais de ^{15}N

Tabela 38 - Valores $\delta^{15}\text{N}$ e nitrogênio total (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de isolinhas de soja nodulante e não nodulante, cultivadas em vasos com solo TRE, aos 70 dias do plantio.

Isolinha de soja	Vaso nº	Número de plantas	Nódulos		Raízes		Folhas e ramos		Vagens		Planta toda	
			$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N-total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N-total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N-total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N-total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	N-total (mg)
Nodulante	1 C	2	11,25	114,2	12,45	109,2	3,59	588,4	0,61	191,5	4,86	1003,3
	2 C	2	12,61	94,6	8,77	97,3	1,93	593,3	0,99	143,9	3,59	929,1
	3 C	2	11,35	131,1	6,31	95,9	5,18	551,2	0,86	148,6	5,48	926,8
	m s/vh CV(%)		11,74 0,44 6,5	113,3 10,5 16,1	9,18 1,78 33,6	100,8 4,2 7,2	3,57 0,94 45,5	577,6 13,3 4,0	0,82 0,11 23,6	161,3 15,1 16,3	4,64 0,56 20,8	953,1 25,1 4,6
Não nodulante	4 C	2	n.d.	7,0	19,01	31,3	17,43	112,9			17,77	151,2
	5 C	2	n.d.	6,8	24,63	35,0	17,57	118,2			19,23	160,0
	6 C	2		nihil	26,13	20,0	28,07	72,5			27,65	92,5
	m s/vh CV(%)				23,32 2,19 16,3	28,8 4,5 27,2	21,02 3,52 29,0	101,2 14,4 24,7			21,55 3,08 24,8	134,6 21,2 27,3

(a) média ponderada de todas as partes das plantas.

(b) soma do N-total de todas as partes das plantas.

no feijoeiro, as variações da razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ nas isolinhas de soja indicam a existência de fracionamento isotópico associado ao processo de fixação do N_2 atmosférico.

Na Tabela 39 constam os resultados da fixação do dinitrogênio calculados com valores de $\delta^{15}\text{N}$ das isolinhas nodulante e não nodulante da soja.

Em decorrência dos elevados valores $\delta^{15}\text{N}$ de nódulos na isolinha nodulante da soja, a fração do nitrogênio fixado (%) nos nódulos radiculares não é comparável aos obtidos em experimentos anteriores. Na parte aérea os resultados da fixação do dinitrogênio (Tabela 39) mostram-se concordantes com a determinação por adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo (Tabela 35).

4.3.4. Determinação por diferença nos teores de nitrogênio de isolinhas nodulante e não nodulante da soja

As produções de nitrogênio das isolinhas de soja obtidas nos experimentos anteriores, foram utilizadas na determinação da fixação do N_2 atmosférico pelo método da diferença (Tabela 40).

Em todos os tratamentos a taxa de fixação porcentual do dinitrogênio foi a mesma quer determinada para a planta toda ou para a parte aérea.

O nitrogênio fixado (mg/vaso) em relação à parte aérea evidenciou em todos os casos quantidades 20% menores que as obtidas para a

Tabela 39 - Fixação do dinitrogênio na soja cultivada em solo TRE, aos 70 dias do plantio. Determinação pelas variações naturais de ^{15}N em isolinhas de soja fixadora e não fixadora do N_2 .

Nitrogênio fixado (%) (a) $\pm \sigma$ (b)					Nitrogênio fixado (mg/vaso) (c) $\pm \sigma$ (d)				
Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda	Nódulos	Raízes	Folhas e ramos	Vagens	Planta toda
45,5 $\pm 8,1$	57,4 $\pm 10,3$	83,4 $\pm 5,0$	96,2 $\pm 0,7$	78,5 $\pm 4,0$	51,6 $\pm 10,3$ (6,8%)	57,9 $\pm 10,7$ (7,8%)	481,7 $\pm 30,9$ (64,5%)	155,2 $\pm 14,6$ (20,8%)	748,2 $\pm 42,9$ (100%)

(a) obtido da equação 14

$$(b) \sigma = \left[(x^2/y^4 \cdot \sigma y^2 + \sigma x^2/y^2)^{1/2} \right] \cdot 100$$

Significando: x - ($\delta^{15}\text{N}$) soja nodulante

y - ($\delta^{15}\text{N}$) soja não nodulante

σ - erro padrão

(c) N-fixado (mg/vaso) = z . k

$$(d) \sigma = \left[z^2 \sigma k^2 + k^2 (\sigma z/100)^2 \right]^{1/2}$$

onde: z - N-fixado (%) / 100

k - N-total na parte considerada da soja

σ - erro padrão

Tabela 40 - Nitrogênio fixado em soja cultivada em vasos com solo IRE, aos 70 dias do plantio. Determinação por diferença no N-total com soja não nodulante para os tratamentos: sem adubação nitrogenada, adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (62,5 mg N/vaso), e com exposição a atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$.

Tratamento	Repetições	Isolinha de soja	Nitrogênio total (a) (mg/vaso)		Nitrogênio fixado na soja (a)		
			Planta toda	Parte aérea	Planta toda		Parte aérea
					(%)	(mg/vaso) (b)	(%)
Sem adubação nitrogenada	3	nodulante	953,1 ±25,1	739,0 ±23,1	85,9 ±2,3	818,5 ±32,9	86,3 ±2,0
	3	não nodul.	134,6 ±21,2	101,2 ±14,4			
Adubado com $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3	nodulante	1083,8 ±21,1	869,3 ±13,0	87,0 ±0,7	951,4 ±22,4	88,1 ±0,6
	3	não nodul.	132,4 ±7,5	103,1 ±5,0			
Exposição ao $^{15}\text{N}_2$	7	nodulante	732,2 ±57,3	571,2 ±51,2	83,0 ±2,6	607,8 ±60,2	84,3 ±2,9
	2	não nodul.	124,4 18,3	89,9 14,2			

(a) média e erro padrão da média.

(b) N-fix. (mg/vaso) = y - x.

Significando:

x - (N-total) soja não fixadora.

y - (N-total) soja fixadora.

planta toda. Esse mesmo valor porcentual foi obtido no experimento com $^{15}\text{N}_2$ (Tabela 30) e adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ (Tabela 36) para o nitrogênio fixado encontrado nos nódulos e raízes.

5. DISCUSSÃO

5.1. Metodologia de medida direta da fixação do dinitrogênio em leguminosa, por exposição radicular com $^{15}\text{N}_2$

A fixação do dinitrogênio no feijoeiro foi determinada por VICTÓRIA (1975) e SAITO (1978), em condições controladas de laboratório expondo por curtos períodos de tempo, plantas inteiras em atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$. VICTÓRIA (1975) sugeriu a utilização de baixo enriquecimento isotópico em estudos dessa natureza. MONTANGE et alii (1981) obtiveram medidas da fixação no feijoeiro e trevo com marcação do N_2 da atmosfera do solo, a 10 e 5 átomos % ^{15}N , em estudos em vasos conduzidos por 7 horas.

No presente trabalho foi desenvolvida uma metodologia para medir diretamente a fixação simbiótica do nitrogênio, por períodos de tempo significativos do ciclo de culturas do feijoeiro e soja, marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}\text{N}_2$ a baixo enriquecimento isotópico. Nos experimentos, estabeleceu-se o isolamento do solo explorado pelo sistema radicular das plantas, utilizando uma câmara no campo e vasos vedados em

casa de vegetação. Assim, reduzindo a difusão do ar atmosférico normal para o interior dos sistemas, foi possível controlar a concentração de gases na atmosfera do solo que recebeu N_2 marcado com ^{15}N .

Nos experimentos de campo e em vasos, foram mantidas concentrações volumétricas de oxigênio na faixa de 16 a 21% repondo-se o O_2 consumido. No controle do CO_2 evoluído foi necessário promover a circulação do ar nos sistemas forçando a retenção do dióxido de carbono em "trap" de cal sodada. Mesmo assim verificaram-se concentrações de CO_2 maiores que as normalmente obtidas para o ar do solo (2 a 10%).

Tem sido demonstrado que raízes e nódulos de feijoeiro (JACKSON e COLEMAN, 1959; COOKSON et alii, 1980) e da soja (COKER e SCHUBERT, 1981) possuem um sistema ativo de fixação do CO_2 , a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEP-carboxilase). CHRISTELLER et alii (1977) demonstraram ocorrer alta correlação entre a fixação do CO_2 e do N_2 em nódulos de Lupinus alba, mas verificaram também que a fixação do CO_2 não aumenta com concentrações de dióxido de carbono no exterior, acima de 2%. O mesmo foi verificado com raízes e nódulos de plantas intactas de soja, por COOKER e SCHUBART (1981). Assim, tendo por base os fatos constatados na literatura e considerando também que o CO_2 no ar do solo atinge concentrações de 1 a 2%, segundo DE-JONG e POUL (1976), pode-se inferir que os níveis do dióxido de carbono verificados nos experimentos com atmosferas marcadas em $^{15}N_2$, não influíram nas medidas da fixação do dinitrogênio no sentido de superestimar os resultados.

Um fator que pode subestimar as medidas de fixação por esse método é a temperatura do solo, uma vez que os sistemas experimentais sendo fechados, dificultam as trocas de calor com o ambiente, nas horas mais quentes do dia. GALLETTI et alii (1971) verificaram que temperaturas máximas de solo acima de 33°C , prejudicam a formação de nódulos na soja. Nos experimentos em casa de vegetação não se observou diferenças na matéria seca de nódulos no feijoeiro (Apêndices 6 e 8), como também na soja (Apêndices 15 e 17), quando cultivados em vasos fechados e abertos.

A vantagem do método com atmosfera marcada em $^{15}\text{N}_2$ em medidas da fixação do dinitrogênio, é a de quantificar diretamente o N-fixado em leguminosas, sem a utilização de plantas controle não fixadoras. Seu emprego em experimentos de vasos e em pequena escala no campo, mostrou ser viável com a marcação do N_2 da atmosfera do solo a baixos enriquecimentos de ^{15}N .

5.2. Medida da fixação em leguminosas por diluição isotópica. O método de FRIED e MIDDELBOE (1977)

O método proposto por FRIED e MIDDELBOE (1977) para medida da fixação em condições de campo, utiliza plantas fixadoras e não fixadoras sob mesma taxa de fertilização nitrogenada marcada com ^{15}N . A suposição básica do método, segundo o princípio de diluição isotópica, reside na igualdade das proporções entre o nitrogênio absorvido do solo e do fertilizante, pelas duas culturas. RENNIE (1979) sugere o uso desse método como sendo o mais adequado para se medir a fixação em experimentos de vaso e principalmente em campo.

Os resultados da fixação no feijoeiro em condições de vaso, utilizando o trigo como planta controle (item 4.2.2.) mostraram-se concordantes à determinação pelo método direto com $^{15}\text{N}_2$ (item 4.2.1.), embora não tenham sido observadas indicações conclusivas a respeito da suposição básica do método. Num segundo experimento (item 4.2.3.) foi verificado que o feijoeiro e o trigo possuíam idênticas quantidades de nitrogênio absorvido do fertilizante, sendo o mesmo fato constatado para isolinhas nodulante e não nodulante da soja (item 4.3.2.). Esses resultados indicam a validade do método de FRIED e MIDDELBOE (1977) em determinações para condições de vaso, onde os sistemas radiculares de plantas nodulantes e não nodulantes explorando o mesmo volume de solo, absorvem quantidades proporcionais de nitrogênio das fontes disponíveis (fertilizante e solo).

A validade desse método em condições de campo como proposto por FRIED e MIDDELBOE (1977) pode ser questionada, tendo em vista que plantas fixadoras e não fixadoras podendo explorar diferentes volumes de solo, certamente apresentarão diferenças na proporção do nitrogênio absorvido do fertilizante e do solo.

Estudos em condições de vaso utilizando o método de FRIED e MIDDELBOE (1977) podem utilizar o $^{15}\text{NO}_3^-$ ou $^{15}\text{NH}_4^+$, desde que resultados isotópicos de nódulos e raízes sejam considerados no cálculo da fixação total. Esse procedimento tem fundamento nos estudos de RABIE et alii (1980), que demonstraram ocorrer diferentes distribuições de nitrogênio e concentrações de ^{15}N , nas raízes e parte aérea da soja crescidas em $^{15}\text{NO}_3^-$ e $^{15}\text{NH}_4^+$.

5.3. Fixação do N₂ no feijoeiro e soja

No experimento com feijoeiro em condições de campo usando ¹⁵N₂ foi obtida fixação de 5,5 mg de N/planta, do 22º ao 31º dia do ciclo da cultura. A estimativa com dados de redução de acetileno (Apêndice 3 e Figura 12b) para o mesmo período, indicou fixação de 0,9 mg de N/planta valor esse 6 vezes menor que o obtido com ¹⁵N₂. Resultados subestimativos de N-fixado na soja pela técnica de redução de acetileno foram também verificados por LEGG e SLOGER (1975) e BODDEY et alii (1982) através de comparações com a técnica isotópica de medida da fixação, marcando-se a matéria orgânica do solo com ¹⁵N. Os autores justificaram os baixos valores de fixação por redução de acetileno, como devido a perdas e danos de nódulos, na colheita de material para a incubação.

As determinações da fixação no feijoeiro com técnicas isotópicas revelaram valores de 60 a 80 mg de N-fixado por planta, na primeira época de cultivo (abril a junho). Na segunda época (outubro a dezembro) obteve-se fixação de 230 mg de N/planta, resultado esse 3 vezes maior que os verificados na época anterior. Uma vez que foram mantidas idênticas condições de nutrição e umidade do solo nas duas épocas de estudo, a maior quantidade fixada no feijoeiro cultivado de outubro a dezembro, parece ter relação com a atividade fotossintética das plantas em condições de dias longos, aliadas a temperaturas ambientes mais elevadas. Os resultados da produção total de matéria seca (Apêndices 5 e 11) de feijoeiro cultivado no solo TRE nas épocas consideradas, vem reforçar essa justificativa.

Determinações da fixação do dinitrogênio na soja pelos métodos: adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, variação natural da razão $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e diferença do N-total, utilizando isólinhas nodulante e não nodulante, mostraram valores muito próximos e cerca de 2 vezes maiores que o obtido para o feijoeiro cultivado na mesma época.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais e tendo-se em conta os objetivos propostos, podem ser ressaltadas as seguintes conclusões:

- a . O isolamento do ambiente do solo explorado pelo sistema radicular de leguminosas, usando uma câmara em condições de campo e vasos vedados em casa de vegetação, torna possível o controle das concentrações volumétricas de gases e a marcação do nitrogênio molecular da atmosfera do solo com ^{15}N .
- b . A concentração de ^{15}N no ar do solo nos sistemas experimentais decre
ce exponencialmente em função do tempo, devido a difusão não controlada
da do ar atmosférico para o interior dos sistemas.
- c . A diluição exponencial, em função do tempo, da concentração de ^{15}N no N_2 do ar do solo, possibilita o uso de modelos matemáticos na deter
minação do valor médio da concentração do isótopo, no ambiente dos sistemas fixadores.

- d . Em experimentos de medida da fixação do N_2 simbiótico por tempos prolongados é necessário repor $^{15}N_2$, restabelecendo-se o nível da concentração do isótopo no ar do solo.
- e . Os sistemas experimentais com marcação da atmosfera em $^{15}N_2$ não mostraram influências no desenvolvimento das plantas leguminosas.
- f . A metodologia com marcação da atmosfera do solo em $^{15}N_2$ é útil para medir a fixação integrada do nitrogênio em leguminosas, por períodos específicos ou por todo o ciclo das culturas.
- g . A fixação simbiótica no feijoeiro do 22º ao 31º dia do plantio, determinada em condições de campo marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}N_2$, foi de 5,5 mg de N por planta (24% do N-total/planta).
- h . A fixação integrada do nitrogênio nas culturas do feijoeiro (do 19º ao 67º dia do plantio) e da soja (do 24º ao 70º dia do plantio) determinadas em condições de casa de vegetação marcando-se a atmosfera do solo com $^{15}N_2$, foram respectivamente: 80 mg de N/planta (65% do N-total/planta) e 265 mg de N/planta (71% do N-total/planta).
- i . Para condições de experimentação em vasos e com as colheitas realizadas no final do ciclo das culturas, a suposição básica do método de quantificação da fixação do nitrogênio de Fried e Middelboe é válida, pois plantas leguminosas e do controle, apresentam quantidades proporcionais de nitrogênio, absorvido do solo e do fertilizante aplicado.

- j . A fixação simbiótica no feijoeiro determinada com técnicas usando ^{15}N (atmosfera marcada com $^{15}\text{N}_2$ e adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo) mostrou-se 3 vezes maior para a época de cultivo de outubro a dezembro (230 mg de N/planta) do que de abril a junho (60 a 80 mg de N/planta), para condições de experimentação com vasos.
- k . Medidas simultâneas da fixação simbiótica na soja utilizando os métodos: adição de $^{15}\text{NH}_4^+$ ao solo, variação natural das razões $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e por diferença no N-total, usando como planta controle a isolinha não nodulante da soja, evidenciaram os mesmos resultados para as condições de experimentação com vasos e com as colheitas realizadas no final do ciclo das plantas.

LITERATURA CITADA

- AMARGER, N., A. MARIOTTI e F. MARIOTTI, 1977. Essai d'estimation du taux d'azote fixé symbiotiquement chez le Lupin par le traçage isotopique naturel (^{15}N). C.R. Acad. Sc. Paris: Série D, 284:2179-2180.
- AMARGER, N., A. MARIOTTI, F. MARIOTTI, J.C. DURR, C. BOURGUIGNON e B. LAGACHERIE, 1979. Estimate of simbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using varioations in ^{15}N natural abundance. Plant and Soil. The Hague, 52:269-280.
- BELL, F. e P.S. NUTMAN, 1971. Experiments on nitrogen fixation by nodulated lucerne. Plant and Soil, The Hague (Special volume):231-264.
- BERGERSEN, F.J., 1973. The use ^{15}N in N_2 -fixation experiments. Campinas, Instituto Agronômico de Campinas. 39p. (Mimeografado).
- BODDEY, R.M., P.M. CHALK, R.L. VICTÓRIA e E. MATSUI, 1982. The ^{15}N isotope dilution technique applied to measure nitrogen fixation by nodulated soybean. Rio de Janeiro, EMBRAPA-PNPBS. 18p. (Mimeografado).

- BREMNER, J.M., 1965a. Inorganic forms of nitrogen In: BLACK, C.A., ed. Methods of Soil Analysis. Madison, American Society of Agronomy. v. 2., p. 1179-1237.
- BREMNER, J.M., 1965b. Isotope-ratio analysis of nitrogen in nitrogen-15 tracer investigations. In: BLACK, C.A., ed. Methods of Soil Analysis. Madison, American Society of Agronomy. v. 2, p. 1256-1286.
- BREMNER, J.M., 1975. Use of nitrogen-tracer techniques for research on N-fixation. In: AYANABA A. e P.J. DART, eds. Biological nitrogen fixation in forming systems of the tropics. New York, John Wiley. p. 335-352.
- BURRIS, R.H., 1972. Nitrogen fixation-assay methods and techniques. In: SAN PIETRO, A., ed.. Methods in Enzymology. New York, Academic Press. v. 24, p. 415-431.
- BURRIS, R.H., 1974. Methodology. In: A. QUISPEL ed.. The Biology of nitrogen fixation. Amsterdam, North-Holland. p. 9-33.
- BURRIS, R.H. e C.E. MILLER, 1941. Application of ^{15}N to the study of biological nitrogen fixation. Science, New York, 93:114-115.
- BURRIS, R.H., F.J. EPPLING, H.B. WAHLIN e P.W. WILSON, 1943. Studies of biological nitrogen fixation with isotopic nitrogen. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., Madison, 7:258-262.

- BURRIS, R.H. e P.W. WILSON, 1957. Methods for measurement of nitrogen of nitrogen fixation. In: COLOWICK, S.P. e N.O. KAPLAN, eds.. Methods in Enzymology. New York, Academic Press. v. 4, p. 355-366.
- CAMPBELL, N.E.R., R. DULAR, H. LEES, 1967. The production of $^{13}\text{N}_2$ by 50MeV protons for use in biological nitrogen fixation. Can. J. Microbiol. Ottawa, 13:587-599.
- CHRISTELLER, J.T., W.A. LAING e W.D. SUTTON, 1977. Carbon dioxide fixation by Lupin root nodules. I. Characterization, association with phosphoenolpyruvate carboxylase, and correlation with nitrogen fixation during nodule development. Plant Physiol. Bethesda, 60: 47-50.
- COKER, G.T.III e K.R. SCHUBERT, 1981. Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules. I. Characterization and comparison with N_2 fixation and composition of xylem exudate during early nodule development. Plant Physiol. Bethesda, 67:691-696.
- COOKSON, C., H. HUGUES, J. COOMBS, 1980. Effects of combined nitrogen on anaplerotic carbon assimilation and bleeding sap composition in Phaseolus vulgaris L.. Planta. Berlin, 148:338-345.
- DELWICHE, C.C. e P.L. STEYN, 1970. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. Environ. Sci. Techn. Washington, 4: 929-935.

- DE-POLLI, H., 1975. Ocorrência de fixação de $^{15}\text{N}_2$ nas gramíneas tropicais Digitaria decumbens e Paspalum notatum. Piracicaba, ESALQ/USP, 95 p. (Dissertação de Mestrado).
- DE-POLLI, H., E. MATSUI, J. DÖBEREINER e E. SALATI, 1977. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by $^{15}\text{N}_2$ incorporation. Soil Biol. Biochem. Oxford, 9:119-123.
- EPSTEIN, E., 1975. Introdução e histórico. In: _____. Nutrição mineral das plantas: princípios e perspectivas. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos. p. 3-12.
- FRIED, M. e H. BROESHART, 1975. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil. The Hague, 43: 707-711.
- FRIED, M. e L.A. DEAN, 1952. A concept concerning the measurement of available soils nutrients. Soil Sci. Baltimore, 73:263-271.
- FRIED, M. e V. MIDDELBOE, 1977. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil. The Hague, 47:713-715.
- FURTADO, N.F., 1967. Sistemas de unidades: teoria dos erros. In: SEARS, F.W. Física. Rio de Janeiro, Livro Técnico. cap. 2, p. 61-103.
- GALLETTI, P., A.A. FRANCO, H. AZEVEDO e J. DÖBEREINER, 1971. Efeito da temperatura do solo na simbiose da soja anual. Pesq. Agropec. Bras.: Sér. Agron. Rio de Janeiro, 6:1-8.

- HAUCK, R.D., 1973. Nitrogen tracers in nitrogen cycles studies. Past use and future needs. J. Environ. Qual., Maryland, 2:317-327.
- HAUCK, R.D. e J.M. BREMNER, 1976. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. Adv. Agron. New York, 28:219-266.
- HAM, G.E., 1975. The acetylene-ethylene assay and other measures of nitrogen fixation in field experiments. In: AYANABA A. e P.J. DART, eds. Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics. New York, John Wiley, p.325-334.
- HAM, G.E., 1978. Use of ^{15}N in avaluating symbiotic N_2 fixation of field-grown soybeans. In:IAEA. Isotopes in biological dinitrogen fixation. Viena. p.151-162. (Panel Proceedings Series).
- HARDY, R.W.F., R.C. BURNS, R.D. HOLSTEN, 1973. Applications of the acetylene-athylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem., Oxford, 5:47-81.
- HARDY, R.W.F., R.D. HOLSTEN, E.K. JACKSON e R.C. BURNS, 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. Bethesda, 43:1185-1207.
- HEATH, R.L., 1973. Table of isotopes. In: WEAST, R.C., ed. Handbook of chemistry and physics. 53^a ed. Cleveland, The Chemical Rubber Co., p.B-248.

- HURWITZ, C. e P.W. WILSON, 1940. Direct estimation of biological nitrogen fixation. A gasometric method. Ind. Eng. Chem.: Anal. Ed., Washington, 12:31-33.
- INFORZATO, R. e S. MIYASAKA, 1963. Sistema radicular do feijoeiro em dois tipos de solo do Estado de São Paulo. Bragantia. Campinas, 22:477-481.
- JACKSON, W.A. e N.T. COLEMAN, 1959. Fixation of dioxide by plant root through phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant and Soil. The Hague, 11:1-16.
- OE-JONG, E.; e E.A. PAUL, 1976. The composition of the soil atmosphere and its relationship to soil aeration and respiration. In: FINKLE, O.W., ed. Encyclopedia of Earth Science Series. New York, Reinhold Book Co., v. 6b: Soil Science and Applied Geology 35p. (Mimeografado).
- KOHL, D.H. e G. SHEARER, 1980. Isotopic fractionation with symbiotic N₂ fixation and uptake of NO₃⁻ by plants. Plant Physiol. Bethesda, 66: 51-56.
- KOHL, D.H., G. SHEARER e J.E. HARPER, 1980. Estimates of N₂ fixation based on differences in the natural abundance of ¹⁵N in nodulating and nonnodulating isolines of soybeans. Plant Physiol. Bethesda, 66: 61-65.
- KRUG, F.J., 1982. Determinação de espécies químicas de interesse em plantas e solos. Piracicaba, CENA/USP, 14p. (Mimeografado).

- LEGG, J.O. e C. SLOGER, 1975. A tracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In: Second International Conference on Stable Isotopes, Oak Brook, Ill. Proceedings... p.661-666.
- MATSUI, E., P.B. VOSE, N.S. RODRIGUES e A.P. RUSCHEL, 1981. Use of ^{15}N enriched gas to determine N_2 -fixation by undisturbed sugar-cane plant in the field. In: VOSE, P.B. e A.P. RUSCHEL, eds. Associative N_2 -fixation, Boca Raton, CRC Press. v. 2, p.153-161.
- MAYLAND, H.F. e T.H. MCINTOSH, 1966. Availability of biologically fixed atmospheric nitrogen-15 to higher plants. Nature. London, 209:421-422.
- MONTANGE, O., F.R. WAREMBOURG e R. BARDIN, 1981. Utilisation du $^{15}\text{N}_2$ pour estimer la fixation d'azote et sa repartition chez les legumineuses. Plant and Soil, The Hague, 63:131-139.
- MONTANHEIRO, M.N.S., 1980. Controle da água do solo em vasos em experimentos sobre utilização de nutrientes pelo feijoeiro (Phaseolus vulgaris, L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 56p. (Tese de Doutorado).
- NAUDÉ, S.M., 1930. The isotopes of nitrogen mass 15 and oxygen masses 18 and 17 and their abundance. Phys. Rev., Lancaster, 36:333-346.
- NICHOLAS, D.J.O., D.J. SYLVESTER e J.F. FOWLER, 1961. Use of radioactive nitrogen in studying nitrogen fixation in bacterial cells and their extracts. Nature. London, 189:634-636.

- PIMENTEL GOMES, F., 1970. Curso de Estatística Experimental. 4. ed. Piracicaba, Nobel. 430p..
- PROKSCH, G., 1969. Routine analysis of ^{15}N in plant material by mass-spectrometry. Plant and Soil. The Hague, 31:380-384.
- RABIE, R.K., Y. ARIMA e K. KUMAZAWA, 1980. Uptake and distribution of combined nitrogen and its incorporation into seeds of nodulated soybean plants as revealed by ^{15}N studies. Soil Sci. Plant. Nutr., Tokyo, 26: 427-436.
- RENNIE, R.J., 1979. Comparison of ^{15}N aided methods for determining symbiotic dinitrogen fixation. Rev. Écol. Biol. Sol., 16:455-463.
- RENNIE, D.A., E.A. PAUL e L.E. JOHNS, 1976. Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. Can. J. Soil Sci.. Ottawa, 56:43-50.
- RENNIE, R.J., D.A. RENNIE e M. FRIED, 1978. Concepts of ^{15}N usage in dinitrogen fixation studies. In: IAEA. Isotopes in biological dinitrogen fixation. Viena p.107-133 (Panel Proceedings Series).
- RITTENBERG, D., 1946. The preparation of gas sample for mass-spectrographic analysis. In: WILSON, O.W., A.O.C. NIER e S.P. REIMANN, eds. Preparation and Measurement of the Isotopic Tracers. Michigan, Ann Arbor, J.W. Edwards, p.31-42.

ROSS, P.J., A.E. MARTIN e E.F. HENZELL, 1964. A gas-tight growth chamber for investigating gaseous nitrogen changes in the soil: plant: atmosphere systems. Nature. London, 204:444-447.

RUBEN, S., W.Z. HASSID e M.O. KAMEN, 1940. Radioactive nitrogen in the study of N_2 fixation by non-leguminous plants. Science. New York, 91:578-579.

RUSCHEL, A.P., 1975. Fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. Piracicaba, ESALQ/USP, 73p. (Tese de Doutorado).

RUSCHEL, A.P., Y. HENIS e E. SALATI, 1975. N-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugar-cane seedlings. Soil Biol. Biochem., Oxford, 7:181-182.

RUSCHEL, A.P., E. SALATI e P.B. VOSE, 1979a. Nitrogen enrichment of soil plant by Rhizobium phaseoli - Phaseolus vulgaris symbiosis. Plant and Soil. The Hague, 51:425-429.

RUSCHEL, A.P., P.B. VOSE, R.L. VICTÓRIA e E. SALATI, 1979b. Comparison of isotope techniques and nonnodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, Glycine max. Plant and Soil. The Hague, 53:513-525.

RUSCHEL, A.P., P.B. VOSE, E. MATSUI, R.L. VICTÓRIA e S.M.T. SAITO, 1982. Field evaluation of N_2 -fixation and nitrogen utilization by Phaseolus bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. Plant and Soil.

The Hague, 65:397-407.

SAITO, S.M.T., 1978. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em feijoeiro (Phaseolus vulgaris, L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 98p. (Tese de Doutorado).

SAITO, S.M.T., E. MATSUI e E. SALATI, 1980. $^{15}\text{N}_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in Phaseolus vulgaris. Physiol. Plant. Copenhagen, 49:37-42.

SAITO, S.M.T., R.L. VICTÓRIA e A.P. RUSCHEL, 1981. Avaliação da fixação simbiótica de N_2 em Phaseolus vulgaris por diluição isotópica com $^{15}\text{NH}_4^+$ e $^{15}\text{NO}_3^-$. In: Seminário Regional Sobre o Uso De Técnicas Nucleares Em Estudos Das Relações Solo-Planta-Atmosfera, Piracicaba. (no prelo).

SHEARER, G., L. FELDMAN, B.A. BRYAN, J.L. SKEETERS, O.H. KOHL, N. AMARGER, F. MARIOTTI e A. MARIOTTI, 1982. ^{15}N abundance of nodules as an indicator of N metabolism in N_2 -fixing plants. Plant Physiol. Bethesda, 70:465-468.

SHEARER, G., O.H. KOHL e J.E. HARPER, 1980. Distribution of ^{15}N among plant parts of nodulating and nonnodulating isolines of soybeans. Plant Physiol. Bethesda, 66:57-60.

SNEDECOR, G.W. e W.G. COCHRAN, 1974. The comparison of two samples. In: Statistical Methods, 6 ed., Ames, Iowa State University Press. p.91-119.

- STANIER, R.Y., M. DOUDOFF e E.A. DELBERG, 1969. Relações simbióticas dos microrganismos com plantas e animais. In: _____. Mundo dos Micróbios. São Paulo, Edgard Blücher. p.538-556.
- STEVENSON, G., 1958. Use of ^{15}N in the study of fixation of atmospheric nitrogen by non-nodulated seed plants. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy. Geneva, 27:51-57.
- TRIVELIN, P.C.O., E. SALATI e E. MATSUI, 1973. Preparo de amostras para análise de ^{15}N por espectrometria de massa. Piracicaba, CENA. 41p. (Boletim Técnico, nº 002).
- VICTÓRIA, R.L., 1975. Uso de $^{15}\text{N}_2$ com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. Piracicaba, ESALQ/USP. 93p. (Dissertação de Mestrado).
- VIRTANEN, A.I., T. MOISIO, R.M. ALLISON e R.H. BURRIS, 1954. Fixation of molecular nitrogen by excised root nodules of the Alnus. Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen, 8:1730-1731.
- VOSE, P.B., A.P. RUSCHEL e E. SALATI, 1978. Determination of N_2 -fixation, especially in relation to the employment of nitrogen-15 and of natural isotope variation. In: II Latin American Botanical Congress, Brasília. 10p. (Mimeografado).
- VOSE, P.B., A.P. RUSCHEL, R.L. VICTÓRIA, S.M.T.SAITO e E. MATSUI, 1981. 15 -nitrogen as a tool in biological nitrogen fixation research. In: International Workshop on Biological Nitrogen Fixation Technology

for Tropical Agriculture, Cali, 19p. (Mimeografado).

WADA, H., S. PANICHSAKPATANA, M. KIMURA e Y. TAKAI, 1979. Application of

N_2/Ar ratio method for N_2 fixation studies in submerged soil. Soil Sci. Plant Nutr. Tokyo, 25:449-452.

WEBER, C.R., 1966. Nodulating and nonnodulating soybean isolines. II.

Response to applied nitrogen and modified soil conditions. Agron. J. Washington, 58:46-49.

WITTY, J.F. e J.M. DAY, 1978. Use of $^{15}N_2$, in evaluating asymbiotic N_2 fixation. In: IAEA. Isotopes in biological dinitrogen fixation.

Viena. p.135-149. (Panel Proceedings Series).

APÊNDICE

Apêndice 1 - Composição das espécies moleculares: N₂, O₂, Ar e CO₂ (% de volume) e concentração de ¹⁵N (átomos %) no ar do solo a diferentes profundidades na câmara de medida de fixação do N₂ atmosférico em feijoeiro, em função do tempo.

Tempo (h)	Profundidade na câmara (cm)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Concentração de ¹⁵ N (átomos %)
		N ₂	O ₂	Ar	CO ₂	
0,0	Reservatório					7,21
	0	5,83	23,49	70,42	0,25	
	5	3,29	22,97	73,18	0,56	
	10	2,98	23,61	72,59	0,82	
	20	2,58	23,62	73,14	0,66	
	30	8,32	23,86	67,12	0,10	
	40	5,37	23,64	70,02	0,96	
15,8	Reservatório	42,43	21,27	35,51	0,78	5,89
	0	43,17	20,75	35,34	0,74	5,77
	5	43,02	20,22	35,81	0,96	5,68
	10	44,19	19,97	34,83	1,02	5,29
	20	44,96	19,69	34,45	0,90	5,14
	30	45,68	19,99	33,13	1,20	4,83
39,5	Reservatório	50,96	18,04	29,30	1,70	4,11
63,3	Reservatório	53,00	22,95	21,91	2,14	2,99
	0	53,43	22,89	21,78	1,90	2,98
	5	53,91	22,53	21,59	1,97	2,88
	10	55,28	22,35	20,32	2,06	2,70
	20	55,36	22,13	20,38	2,13	2,68
	30	56,82	21,91	19,11	2,16	2,48
	40	59,35	21,30	16,92	2,43	2,14
87,5	Reservatório	59,30	19,18	17,41	3,61	2,13
111,5	Reservatório	66,44	16,94	12,69	3,93	1,48
142,5	Reservatório	66,61	22,19	8,28	2,92	1,06
	0	68,26	22,37	8,18	1,19	1,03
	5	67,39	21,00	7,73	3,88	0,993
	10	67,56	21,03	7,29	4,11	0,951
	20	67,89	21,34	7,09	3,68	0,936
	30	68,80	21,04	6,68	3,49	0,882
	40	69,94	20,69	5,87	3,50	0,803
184,0	Reservatório	74,63	17,51	4,80	3,06	0,668
	0	75,03	17,75	4,79	2,44	0,664
	5	75,18	17,62	4,66	2,53	0,653
	10	75,40	17,88	4,27	2,45	0,623
	20	75,83	17,65	4,40	2,12	0,633
	30	75,76	17,84	3,90	2,50	0,592
	40	76,20	18,37	3,39	2,04	0,550
207,0	Reservatório	76,36	16,11	3,62	3,91	0,564
	0	76,73	16,21	3,48	3,59	0,556
	10	76,46	16,39	3,35	3,80	0,540
	20	77,01	16,33	3,17	3,48	0,526
216,0	Final do experimento					

Apêndice 2 - Composição de N_2 , O_2 , Ar e CO_2 (% de volume) e concentração de ^{15}N (átomos %) do ar atmosférico, obtidas por espectrometria de massa, em 12 amostras coletadas em diferentes datas.

Amostra nº	Composição das espécies moleculares em % de volume				Concentração de ^{15}N (átomos %)
	N_2	O_2	Ar	CO_2	
1	77,87	21,00	1,05	0,08	0,3667
2	77,81	21,08	1,05	0,06	0,3654
3	77,72	21,14	1,05	0,08	0,3655
4	77,70	21,15	1,05	0,10	0,3663
5	77,52	21,34	1,05	0,10	0,3648
6	77,64	21,27	1,05	0,05	0,3647
7	77,57	21,29	1,06	0,08	0,3646
8	77,73	21,16	1,06	0,05	0,3648
9	77,54	21,27	1,05	0,14	0,3653
10	77,56	21,34	1,05	0,05	0,3660
11	77,56	21,35	1,05	0,05	0,3649
12	77,61	21,29	1,05	0,05	0,3653
m	77,65	21,22	1,05	0,07	0,3654
$\pm s/\sqrt{n}^{(a)}$	0,03	0,03	0,00	0,01	0,0002

(a) erro padrão da média.

Apêndice 3 - Matéria seca de nódulos e redução de C_2H_2 a C_2H_4 em raízes noduladas de feijoeiro, cultivado no campo.

Tempo (dias do plantio)	Número de plantas	Matéria seca de nódulos (g)	C_2H_2 reduzido (n mol C_2H_4 / planta . h)
13	3	0,016	97,8
	3	0,006	181
	4	0,007	303
	m(por planta)±s		194±103
	0,003±0,002		
20	3	0,025	474
	3	0,014	
	3	0,018	481
	3	0,015	601
	3	0,015	547
	m(por planta)±s		525±60
	0,008±0,002		
27	3	0,090	393
	3	0,103	
	3	0,099	386
	3	0,066	345
	3	0,025	663
	m(por planta)±s		447±146
	0,026±0,011		
37	3	0,019	167
	3		96,5
	3	0,015	106
	3	0,055	75,9
	3	0,103	
	m(por planta)±s		111±39
	0,016±0,014		
45	3	0,039	0
	3	0,014	0
	3	0,028	0
	3	0,064	0
	m(por planta)±s		0
	0,012±0,007		
53	3	0	0
	3	0	0
	3	0	0
	3	0	0
	3	0	0

Apêndice 4 - Composição das espécies moleculares: N₂, O₂, Ar e CO₂ (% de volume) e concentração de ¹⁵N (átomos %) no gás do sistema de medida da fixação do N₂ atmosférico em feijoeiro, sob condições de casa de vegetação.

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ¹⁵ N (átomos%)
		N ₂	O ₂	Ar	CO ₂	
0	a					5,48
1	a	37,96	18,81	42,35	0,88	2,74
	d	48,52	19,11	31,66	0,71	1,73
16	a	46,96	22,85	28,79	1,40	1,55
	c	47,74	23,24	28,89	0,13	1,54
	d	45,33	22,19	31,65	0,83	1,70
40	e	52,33	19,77	25,40	2,50	1,29
46	a	49,13	24,62	23,84	2,22	1,28
	c	54,25	19,24	26,44	0,08	1,30
	d	54,35	14,00	29,03	2,62	1,31
	e	53,13	15,46	26,02	5,39	1,28
65	a	51,86	20,68	23,86	3,59	1,23
	c	54,05	19,91	24,98	1,05	1,24
	d	51,98	21,49	24,65	1,87	1,25
	e	53,64	20,02	23,88	2,46	1,20
111	a	57,57	18,63	23,27	0,53	1,14
	c	59,35	15,62	24,80	0,23	1,11
	d	59,32	13,29	24,65	2,74	1,16
	e	56,75	18,57	23,02	1,67	1,13
142	a	57,97	23,83	15,97	2,23	0,882
	c	59,58	23,95	16,12	0,35	0,872
	d	58,81	17,31	18,65	5,23	0,964
	e	57,84	23,41	15,98	2,77	0,887
158	c	62,32	20,63	16,86	0,19	0,870
	d	61,23	15,64	16,98	6,15	0,890
	e	60,28	19,87	15,67	4,18	0,846
165	a	47,78	20,54	30,01	1,66	2,99
	c	49,17	20,63	28,14	2,05	2,83
	d	49,69	18,99	25,99	5,34	2,55
	e	49,04	20,69	26,52	3,74	2,71
212	a	57,81	10,53	29,65	2,01	2,61
	c	55,64	9,53	27,76	7,07	2,56
	d	54,74	10,52	26,67	8,08	2,53
	e	53,45	16,43	24,44	5,68	2,37
231	a	60,66	9,70	27,67	1,96	2,36
	c	58,53	6,77	26,52	8,18	2,36
	d	56,66	6,71	25,46	11,17	2,33
	e	53,68	13,62	24,88	7,82	2,40
233	c	51,40	16,93	22,99	8,68	2,29
	d	51,69	16,21	23,08	9,02	2,30
280	a	59,06	14,17	22,12	4,64	2,00
	c	61,72	14,60	23,02	0,66	2,00
	d	63,06	7,01	23,12	6,81	1,98
	e	58,31	13,95	21,20	6,54	1,93

Continua

Continuação do Apêndice 4

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
281	a	55,93	17,97	19,90	6,21	1,89
	e	59,72	16,16	20,57	3,56	1,85
304	a	58,09	20,28	19,36	2,25	1,82
	c	61,61	16,25	21,05	1,09	1,85
	d	61,45	9,76	19,95	8,84	1,77
	e	62,04	13,27	17,54	7,15	1,48
327	a	57,03	21,53	17,32	4,11	1,68
	c	60,50	20,06	18,66	0,78	1,70
	d	60,84	6,53	19,43	13,21	1,75
	e	58,07	20,15	17,02	4,76	1,69
382	a	64,15	13,16	16,63	6,07	1,48
	c	64,07	11,27	16,43	8,23	1,47
	d	59,86	9,91	15,52	14,71	1,47
	e	59,24	19,12	14,09	7,55	1,41
400	a	57,39	26,05	12,75	3,80	1,33
	c	61,51	18,56	14,53	5,40	1,37
	d	58,69	15,77	14,85	10,69	1,45
	e	55,30	22,60	13,26	8,84	1,40
447	a	60,76	27,32	11,85	0,07	1,18
	c	64,56	16,99	13,23	5,22	1,23
	d	62,81	13,46	12,64	11,08	1,23
	e	58,25	26,05	12,06	3,64	1,19
495	a	56,82	27,76	6,80	6,61	1,01
	c	62,16	27,85	9,67	0,32	1,02
	d	61,77	16,04	9,48	12,70	1,00
	e	59,28	25,46	8,45	6,81	0,948
502	a	48,18	24,56	18,79	8,48	1,65
	c	50,55	25,73	17,54	6,18	1,63
	d	49,74	23,70	16,61	9,95	1,60
	e	49,24	23,15	16,45	11,15	1,59
548	a	58,58	26,64	14,49	0,29	1,28
	c	61,45	14,61	16,90	7,04	1,36
	d	58,22	14,35	15,89	11,53	1,39
	e	57,70	24,13	15,02	3,15	1,32
616	a	61,74	25,38	12,58	0,30	1,09
	c	61,43	14,74	13,18	10,64	1,13
	d	61,26	13,99	13,02	11,73	1,13
	e	56,74	26,33	11,12	5,81	1,06

Continua

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
640	a	59,63	28,46	10,48	1,43	0,990
	c	63,09	24,55	11,35	1,01	1,01
	d	62,35	15,40	11,44	10,81	1,02
	e	65,60	21,11	7,50	5,79	0,763
662	a	60,68	25,54	9,99	3,79	0,947
	c	63,13	26,36	10,39	0,12	0,940
	d	64,16	16,85	10,52	8,47	0,940
	e	72,09	17,73	5,24	4,95	0,593
672	a	54,56	22,58	22,75	0,12	1,47
	c	54,75	19,87	18,45	6,85	1,42
	d	52,56	18,11	17,79	11,54	1,42
	e	58,14	18,76	14,63	8,47	1,13
718	a	55,07	18,45	16,07	10,40	1,26
	c	57,30	16,93	16,08	9,69	1,23
	d	56,88	16,47	16,10	10,55	1,24
	e	57,75	16,20	15,75	10,30	1,21
784	a	67,26	18,06	14,34	0,35	1,02
	c	74,91	5,01	16,16	3,92	1,02
	d	68,47	5,92	13,98	11,63	0,980
	e	64,21	17,56	13,75	4,47	1,02
832	a	68,31	19,72	11,56	0,41	0,870
	c	73,76	10,66	13,14	2,44	0,895
	d	72,21	10,24	12,55	5,01	0,888
	e	67,15	18,14	11,40	3,32	0,874
880	a	62,71	22,81	8,97	5,51	0,786
	c	67,06	23,22	9,43	0,29	0,783
	d	65,37	15,17	9,98	9,47	0,818
	e	62,56	22,37	8,86	6,20	0,780
952	a	63,30	26,76	6,84	3,09	0,677
	c	68,59	18,03	6,10	7,28	0,612
	d	63,81	15,49	7,34	13,37	0,699
	e	71,27	18,99	3,09	6,65	0,471
976	a	47,70	26,90	22,40	2,99	1,46
	c	52,71	25,07	19,30	2,92	1,40
	d	50,88	20,67	18,26	10,19	1,38
	e	47,57	27,06	18,70	6,67	1,46

Continua

Continuação do Apêndice 4

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
1029	e	58,72	13,23	16,48	11,57	1,16
1072	a	63,83	19,96	15,38	0,82	1,04
	c	62,39	14,31	15,74	7,56	1,05
	d	62,00	8,85	17,06	12,10	1,12
	e	57,23	22,05	13,93	6,80	1,04
1119	a	62,38	23,88	10,34	3,40	0,812
	c	66,59	21,07	11,21	1,13	0,822
	d	62,14	16,90	11,76	9,20	0,874
	e	61,85	21,68	10,77	5,59	0,839
1145	a	64,27	23,90	10,26	1,56	0,800
	c	64,32	19,08	9,71	6,88	0,772
	d	61,87	18,82	10,49	8,82	0,831
	e	61,28	23,40	8,97	6,34	0,766

- (a) a - reservatório de gás
 c - início do sistema
 d - meio do sistema
 e - final do sistema

Apêndice 5-Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro, cultivado em vasos com solo TRE, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho), com exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por 1145 horas (48 dias).

Vaso n°	Número de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e Ramos			Vagens		
		Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
1*	2	1,15	29,3	1,100	1,13	15,0	0,808	6,15	88,6	1,007	8,55	158,2	1,038
2*	2	1,04	30,1	1,081	0,90	12,0	0,698	5,33	83,7	0,933	6,58	134,9	1,000
3*	2	1,51	36,4	1,133	1,06	14,1	0,759	6,19	86,7	0,977	9,13	167,1	1,025
4*	2	1,19	27,5	1,024	0,89	14,4	0,684	4,30	61,9	0,889	4,79	94,8	0,948
5*	2	1,03	23,4	1,042	0,95	12,6	0,706	3,66	48,0	0,925	4,73	109,3	1,001
7	1	1,09	27,8	1,047	0,71	10,9	0,722	3,33	52,3	0,864	3,93	80,6	0,969
$\bar{m}$													
(5 repetições*)		1,18	29,3	1,076	1,01	13,6	0,731	5,13	73,8	0,946	6,76	132,9	1,002
s/vn (a)		0,09	2,1	0,020	0,04	0,6	0,023	0,50	8,0	0,021	0,92	13,8	0,015
CV(%)		16,5	16,1	4,1	9,0	9,3	7,1	21,9	24,3	4,9	30,4	23,3	3,4

(a) erro padrão da média.

Apêndice 6 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro, cultivado em vasos com solo LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho), com exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por 1145 horas (48 dias).

Vaso n°	Número de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e Ramos			Vagens		
		Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
8	2	1,14	47,8	0,825	1,39	17,7	0,535	3,92	49,0	0,640	4,35	100,5	0,723
9	2	1,61	57,0	0,841	1,58	20,1	0,605	4,51	84,8	0,688	5,33	105,5	0,776
10	2	1,43	45,1	0,940	1,44	19,2	0,599	4,05	45,4	0,730	4,66	89,5	0,836
11	2	1,31	40,5	1,097	1,78	21,4	0,653	3,81	71,6	0,815	4,89	87,5	0,945
12	2	1,06	31,2	0,989	1,57	18,8	0,575	4,65	87,4	0,758	3,05	62,5	0,858
13	2	1,12	33,5	1,145	1,17	12,5	0,638	3,23	60,7	0,826	4,25	81,6	0,945
14	2	1,35	37,1	1,172	1,52	20,2	0,610	3,90	41,3	0,817	5,80	122,4	0,990
$\bar{m}$		1,29	41,7	1,001	1,49	18,6	0,602	4,01	62,9	0,753	4,62	92,8	0,868
$s/\sqrt{n}$ (a)		0,08	3,4	0,053	0,07	1,1	0,015	0,18	7,1	0,027	0,33	7,2	0,037
CV(%)		15,2	21,5	14,1	12,7	15,7	6,5	11,7	29,9	9,5	19,1	20,5	11,3

(a) erro padrão de média.

Apêndice 7 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro, cultivado em vaso com solos TRE e LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho), com exposição do sistema radicular à atmosfera normal.

Solo	Vaso	Número de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e Ramos			Vagens		
			Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitro- gênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
TRE	15	2	1,23	32,0	0,372	1,06	14,1	0,369	5,55	45,0	0,367	8,07	134,0	0,367
	16	2	0,69	22,8	0,370	0,98	14,3	0,369	5,17	48,1	0,368	5,06	126,5	0,365
	18	2	0,87	24,7	0,370	1,53	15,5	0,368	5,06	66,3	0,366	3,98	89,2	0,367
	m		0,93	26,5	0,371	1,19	14,6	0,369	5,28	53,1	0,366	5,70	118,6	0,366
	s/ $\bar{m}$ (a)		0,16	2,8	0,001	0,17	0,4	0,001	0,15	6,6	0,001	1,38	13,9	0,001
	CV(%)		29,6	18,3	0,3	25,0	5,2	0,2	4,9	21,7	0,2	37,2	20,6	0,3
	19	2	0,31	6,54	0,371	1,18	15,0	0,366	4,61	42,9	0,365	3,78	67,7	0,366
	20	2	0,27	4,94	0,370	1,31	15,7	0,369	3,61	33,6	0,367	3,61	74,0	0,366
	21	2	1,37	37,8	0,369	2,24	24,6	0,366	5,01	56,1	0,365	7,26	151,0	0,363
	22	2	0,50	15,4	0,371	1,81	19,4	0,367	4,19	54,9	0,366	4,00	90,8	0,365
LVA	m		0,61	16,2	0,370	1,64	18,7	0,367	4,36	46,9	0,366	4,66	95,9	0,365
	s/ $\bar{m}$ (a)		0,26	7,6	0,001	0,24	2,2	0,001	0,30	5,3	0,001	0,87	19,0	0,001
	CV(%)		84,4	94,0	0,3	9,7	23,5	0,4	12,9	22,8	0,3	37,3	39,7	0,4

(a) erro padrão da média.

Apêndice 8 - Matéria seca (parte aérea e nódulos), número de nódulos, nitrogênio na parte aérea e redução de C_2H_2 a C_2H_4 em raízes destacadas de feijoeiro, cultivado em vaso com LVA (período de abril a junho).

Tempo (dias do plantio)	Número de plantas	Matéria seca		Número de nódulos	Nitrogênio na parte aérea (mg)	C ₂ H ₂ reduzido	
		Parte aérea (g)	Nódulos (mg)			(μ mol C ₂ H ₄ /plante.h)	
14	5	0,984	61,6	75	38,3		1,10
	5	1,278	81,7	143	49,1		2,05
	5	0,954	51,2	93	30,1		1,15
	5	0,915	66,2	120	21,8		1,52
	5	0,939	83,6	139	25,5		1,21
m (por planta)±s		0,203±0,030	13,8±2,7	23±6	6,6±2,2		1,41±0,40
35	2	2,299	373	204	69,3		4,72
	2	2,054	207	193	57,7		7,42
	2	1,101	213	124	24,6		
	2	1,193	321	169	35,2		4,80
	2	2,138	151	180	48,3		7,66
m (por planta)±s		0,679±0,282	127±46	87±15	23,0±8,1		6,15±1,61
49	2	3,155	563	466	71,3		13,8
	2	2,854	379	297	62,5		10,5
	2	3,315	600	531	59,0		7,94
	2	4,555	703	386	101,6		13,6
	2	2,984	446	199	74,6		7,58
m (por planta)±s		1,686±0,342	270±65	188±66	36,9±6,4		10,7±3,0
67	2	8,39	310	260	110,6		
	2	7,22	273	145	107,6		
	2	12,27	1372	753	207,1		
	2	8,19	495	121	145,7		
	2	4,51±1,11	306±258	160±48	71,4±23,1		

Apêndice 9 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro, cultivado em vasos com LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho), que recebeu adubação nitrogenada (82,5 mg de N/vaso) com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido a 1.347 átomos % em ^{15}N .

Vaso	Número da plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e ramos			Vagens		
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
1	2	1,54	37,9	0,431	3,62	33,3	0,492	5,57	59,0	0,470	5,23	107,7	0,447
2	2	0,98	26,0	0,427	1,72	30,8	0,510	3,72	48,7	0,477	3,63	84,6	0,443
3	2	1,28	32,8	0,435	1,55	25,7	0,505	5,13	96,4	0,467	6,14	123,4	0,448
4	2	1,10	32,3	0,425	1,54	24,5	0,503	5,32	66,5	0,465	6,23	133,3	0,437
5	2	1,26	32,1	0,420	1,82	24,2	0,484	5,51	68,9	0,445	7,04	150,7	0,426
6	2	1,06	30,2	0,433	1,33	22,9	0,501	4,20	55,0	0,471	5,61	106,0	0,437
7	2	1,81	35,8	0,419	2,31	29,3	0,492	5,63	81,1	0,455	8,42	166,1	0,422
8	2	1,72	29,1	0,424	3,25	36,1	0,501	5,22	65,3	0,461	6,54	144,5	0,434
$\bar{m}$		1,36	32,0	0,427	2,14	28,4	0,499	5,04	67,6	0,464	6,11	129,5	0,437
$s/\sqrt{n}$ (a)		0,11	1,3	0,002	0,30	1,7	0,003	0,25	5,4	0,004	0,49	11,2	0,003
CV(%)		23,7	11,7	1,4	40,0	16,8	1,7	13,9	22,4	2,2	22,8	24,4	2,1

(a) erro padrão da média.

Apêndice 10-Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de trigo cultivado em vasos com LVA, aos 67 dias do plantio (cultivo de abril a junho) para as situações: adubado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido a 1,347 átomos % de ^{15}N (62,5 mg de N/vaso) e sem adubação nitrogenada.

Vaso	Número de plantas	Raízes		Parte aérea			Planta toda	
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio total (b) (mg)
Marcado com ^{15}N	9	2,25	9,5	0,528	5,37	56,9	0,558	66,4
	10	2,96	18,4	0,572	4,62	51,7	0,610	70,1
	$\bar{m}$	2,61	14,0	0,550	5,00	54,3	0,584	60,3
	s/ $\sqrt{n}$	0,35	4,5	0,022	0,38	5,2	0,026	1,9
Natural	CV(%)	19,2	45,0	5,7	10,6	6,8	6,3	5,6
	11	2,10	10,3	0,367	4,76	59,5	0,367	66,3
	12	2,22	10,9	0,385	4,20	44,5	0,366	55,4
	$\bar{m}$	2,16	10,6	0,366	4,48	52,0	0,367	62,6
	s/ $\sqrt{n}$	0,06	0,3	0,001	0,28	7,5	0,001	7,2
	CV(%)	3,9	4,0	0,4	8,8	20,4	0,2	16,3

(a) erro padrão da média.

(b) soma do N-total de todas as partes das plantas.

(c) média ponderada de todas as partes das plantas.

Apêndice 11 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) de feijoeiro cultivado em vasos com solo TRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro), para as situações: adubado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido a 5,69 átomos % de ^{15}N (52,5 mg de N/vaso) e sem adubação nitrogenada.

Vaso	Número	nº de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e ramos			Vagens		
			Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
Marcado com ^{15}N	7 D	2	0,12	3,36	0,563	0,67	15,1	0,711	12,55	229,7	0,677	17,90	390,2	0,734
	8 D	2	0,05	1,28	0,467	0,65	11,3	0,667	12,26	182,7	0,643	16,77	429,3	0,627
	9 D	2	0,09	2,43	0,533	0,78	12,5	0,736	11,06	185,8	0,728	13,35	335,1	0,705
	$\bar{m}$ s/m (a)		0,09	2,36	0,521	0,77	13,0	0,705	11,96	199,4	0,683	16,01	384,9	0,689
Natural	7 C	2	0,02	0,60	0,028	0,06	1,1	0,020	0,48	15,2	0,025	1,37	27,3	0,032
	8 C	2	40,5	44,2	9,4	14,4	15,0	5,0	6,6	13,2	6,3	14,8	12,3	8,0
	$\bar{m}$ s/m (c)		0,21	5,54	0,376	1,23	22,1	0,370	12,15	156,7	0,369	18,53	425,5	0,368
	CV(%)		0,04	1,46	0,001	0,25	4,5	0,001	0,79	10,2	0,001	0,12	29,6	0,001
			31,0	37,3	0,4	29,4	29,2	0,6	9,2	9,2	0,6	0,9	9,9	0,2

(a) erro padrão da média.

Apêndice 12 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N de trigo, cultivado em vasos com solo IRE, aos 60 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro), para as situações: adubado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, enriquecido a 5,89 átomos % de ^{15}N (62,5 mg de N/vaso) e sem adubação nitrogenada.

Vaso	Número de plantas	Raízes			Parte aérea			Planta toda		
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%) (b)	
^{15}N	10 D	4	2,85	26,8	1,124	8,57	132,0	1,865	158,8	1,740
	11 D	4	2,38	25,7	1,113	8,10	120,7	1,841	146,4	1,713
	12 D	4	1,87	19,3	1,191	8,54	135,8	1,762	155,1	1,691
	$\bar{m}$		2,37	23,9	1,143	8,40	129,5	1,823	153,4	1,715
Marg do co	s/n (a)		0,28	2,4	0,024	0,15	4,6	0,031	3,7	0,014
	CV(%)		20,7	16,9	3,7	3,1	6,1	3,0	4,1	1,4
Natural	10 C	4	3,19	25,8	0,371	8,22	97,8	0,373	123,6	0,373
	11 C	4	1,94	16,5	0,371	7,89	97,8	0,371	114,3	0,371
	12 C	4	1,57	14,9	0,372	7,68	88,3	0,372	103,2	0,372
	$\bar{m}$		2,23	19,1	0,371	7,93	94,6	0,372	113,7	0,372
	s/n (a)		0,49	3,4	0,001	0,16	3,2	0,001	5,9	0,001
	CV(%)		38,0	30,9	0,2	3,4	5,8	0,3	9,0	0,3

(a) erro padrão da média.

(b) média ponderada dos valores médios de todas as partes da planta.

Apêndice 13- Composição das espécies moleculares: N_2 , O_2 , Ar e CO_2 (% de volume) e concentração de ^{15}N (átomos %) no gás do sistema de medida da fixação do N_2 atmosférico em soja, sob condições de casa de vegetação.

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos %)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
0	a	58,33	22,17	19,37	0,13	1,59
1	a	55,63	21,44	22,26	0,67	1,33
	b	51,73	20,23	27,98	0,07	1,30
	c	46,96	18,56	33,34	1,14	1,02
17	a	54,47	20,42	24,55	0,56	1,17
	b	55,86	18,38	24,96	0,80	1,17
	c	56,08	17,24	24,37	2,30	1,08
	d	53,79	20,48	24,82	0,91	1,17
45	a	55,90	21,27	21,26	1,57	1,03
	b	55,79	21,63	22,40	0,19	1,05
	c	56,25	20,76	21,52	1,47	1,02
	d	56,11	20,71	21,38	1,80	1,02
90	a	55,53	23,29	19,17	2,01	0,960
	b	58,76	18,65	20,18	2,41	0,964
	c	59,79	15,51	19,69	5,01	0,940
	d	55,49	23,24	19,17	2,09	0,957
113	a	55,02	24,73	18,54	1,71	0,927
	b	59,17	19,21	18,74	2,87	0,913
	c	58,94	16,91	18,41	5,74	0,911
	d	55,47	24,22	17,86	2,45	0,917
137	a	54,52	27,14	15,97	2,37	0,865
	b	57,60	24,88	16,26	1,27	0,856
	c	58,08	20,54	16,38	4,99	0,851
	d	55,59	26,14	15,42	2,85	0,838
161	a	57,37	25,38	14,38	2,87	1,71
	b	60,17	25,08	13,80	0,96	1,70
	c	59,55	20,49	14,81	5,15	1,90
	d	56,75	26,60	14,46	2,19	1,65
210	a	60,97	22,30	14,51	2,22	1,65
	b	74,23	12,23	12,90	0,65	1,30
	c	68,24	12,15	13,64	5,97	1,47
	d	61,12	22,00	14,35	2,53	1,63

Continua

Continuação do Apêndice 13

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
257	a	62,11	22,95	12,68	2,26	1,48
	b	70,15	13,38	13,50	2,98	1,42
	c	67,13	13,55	13,05	6,27	1,43
	d	61,70	22,95	12,74	2,61	1,49
264	a	61,70	22,78	12,30	3,22	1,43
	b	63,07	23,76	12,73	0,45	1,44
	c	62,40	23,09	12,68	1,83	1,45
	d	62,02	22,78	12,44	2,75	1,44
281	a	62,02	22,71	12,23	3,04	1,43
	b	63,63	23,60	12,64	0,13	1,43
	c	69,67	12,81	10,58	6,94	1,16
	d	64,16	19,20	12,02	4,62	1,38
329	a	60,25	22,75	11,19	5,80	1,35
	b	67,41	13,09	11,17	8,32	1,25
	c	66,65	11,85	11,34	10,16	1,28
	d	66,75	14,71	10,62	7,92	1,21
353	a	62,51	24,06	10,10	3,33	1,29
	b	66,68	15,66	11,16	6,49	1,27
	c	66,26	14,33	10,53	8,88	1,21
	d	67,48	14,26	9,98	8,28	1,15
383	a	63,53	24,15	9,97	2,35	1,20
	b	65,03	24,63	10,19	0,16	1,20
	c	69,51	8,59	9,88	12,02	1,11
	d	64,78	22,44	9,66	3,11	1,17
425	a	63,15	24,23	9,33	3,29	1,14
	b	66,84	23,15	9,32	0,70	1,12
	c	67,72	14,76	9,58	7,94	1,11
	d	65,43	21,41	9,15	4,01	1,11
449	a	62,85	24,69	8,89	3,57	1,10
	b	63,56	24,52	8,87	3,05	1,10
	c	67,75	14,14	9,22	8,89	1,07
	d	64,32	24,09	8,42	3,17	1,05
457	a	64,27	24,55	8,96	2,22	2,29
	b	65,42	25,42	9,09	0,07	2,26
	c	64,62	23,36	8,91	3,11	2,25
	d	64,28	23,14	8,76	3,83	2,25

Continua

Continuação do Apêndice 13

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
473	a	63,77	24,77	8,80	2,66	2,26
	b	67,28	22,86	8,94	0,92	2,22
	c	70,40	10,71	9,08	9,81	2,12
	d	66,03	21,91	8,76	3,30	2,21
521	a	65,00	21,84	7,87	5,30	1,98
	b	72,31	12,77	8,46	6,45	1,94
	c	74,18	6,32	7,94	11,56	1,80
	d	64,95	21,99	7,84	5,23	1,99
545	a	66,34	20,83	7,51	5,31	1,87
	b	71,90	12,81	7,95	7,34	1,85
	c	73,36	8,15	7,63	10,87	1,75
	d	67,89	18,56	7,51	6,04	1,84
593	a	66,25	23,74	6,59	3,42	1,68
	b	66,63	23,21	6,65	3,51	1,68
	c	74,13	9,20	7,08	9,59	1,61
	d	69,12	20,36	6,51	4,01	1,61
641	a	67,44	22,12	5,83	4,62	1,48
	b	78,24	12,16	4,68	4,92	1,07
	c	77,31	6,44	6,05	9,69	1,35
	d	68,90	20,42	5,70	4,98	1,42
664	a	70,54	20,77	5,17	3,52	1,27
	b	76,39	14,45	5,65	3,51	1,29
	c	80,12	4,63	5,55	9,70	1,21
	d	74,25	16,75	5,17	3,83	1,23
713	a	69,64	19,92	4,47	5,97	1,13
	b	77,54	9,47	4,92	8,07	1,11
	c	78,13	5,02	4,79	12,06	1,08
	d					1,13
761	a	69,34	23,26	3,92	3,48	1,02
	b	79,13	9,49	4,28	7,11	0,978
	c	80,77	1,65	4,48	13,10	0,979
	d	69,82	22,15	3,88	4,15	1,00
786	a	70,96	23,21	3,74	2,09	0,959
	b	70,91	22,90	3,72	2,46	0,954
	c	78,56	7,91	4,06	9,47	0,934
	d	74,93	16,96	3,56	4,54	0,884

Continua

Continuação do Apêndice 13

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
793	a	70,25	20,38	3,61	5,75	1,63
	b	73,56	22,16	3,80	0,47	1,63
	c	72,49	20,18	3,69	3,65	1,63
	d	71,93	18,85	3,59	5,63	1,60
809	a	71,50	20,18	3,64	4,68	1,62
	b	80,26	11,46	3,96	4,32	1,57
	c	79,38	6,89	3,83	9,89	1,54
	d	77,21	13,12	3,59	6,08	1,49
841	a	69,94	18,20	3,17	8,70	1,41
	b	76,43	19,82	3,38	0,37	1,39
	c	73,98	18,76	3,16	4,10	1,36
	d	72,57	17,93	3,24	6,26	1,39
856	a	70,85	18,53	3,16	7,46	1,40
	b	82,04	5,73	3,57	8,66	1,36
	c	80,46	2,31	3,45	13,78	1,36
	d	77,22	10,68	2,99	9,11	1,20
887	a	75,16	18,99	1,78	4,07	1,18
	b	76,95	19,58	1,82	1,65	1,18
	c	76,37	18,70	1,79	3,14	1,17
	d	76,02	18,46	1,78	3,75	1,16
906	a	75,59	19,33	1,80	3,28	1,17
	b	75,59	19,05	1,74	3,63	1,12
	c					1,12
	d	75,45	18,87	1,77	3,92	1,16
953	a	74,86	20,60	1,65	2,89	1,02
	b	74,80	20,11	1,64	3,45	1,02
	c	83,04	5,83	1,79	9,34	0,983
	d	79,34	14,45	1,69	4,52	0,974
977	a	69,97	24,98	1,51	3,54	0,966
	b	70,06	24,49	1,49	3,96	0,952
	c	77,67	12,06	1,56	8,70	0,857
	d	72,92	21,67	1,51	3,90	0,913
1026	a	70,20	24,64	1,43	3,73	0,865
	b	70,46	24,12	1,43	3,99	0,859
	c	83,16	8,06	1,60	7,18	0,790
	d	73,18	21,29	1,45	4,08	0,840

Continua

Continuação do Apêndice 13

Tempo (h)	Amostras coletadas nos amostradores (a)	Composição das espécies moleculares em % de volume				Conc. ^{15}N (átomos%)
		N_2	O_2	Ar	CO_2	
1073	a	70,90	24,22	1,37	3,52	0,762
	b	71,39	23,72	1,37	3,52	0,760
	c	80,73	6,38	1,52	11,37	0,728
	d	73,28	21,76	1,40	3,56	0,756
1097	a	72,19	22,89	1,37	3,54	0,735
	b	81,07	8,01	1,52	9,40	0,722
	c	80,68	6,75	1,48	11,09	0,686
	d	77,88	14,89	1,43	5,80	0,696

(a)

- a - reservatório de gás
- b - início do sistema
- c - meio do sistema
- d - final do sistema.

Apêndice 14- matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N na soja não nodulante cultivada em vasos, com solo TRE, aos 70 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro), com exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por 1097 horas (46 dias).

Vaso nº	Nº de Plantas	Nódulos			Raízes			Parte aérea			Planta toda	
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (a) (átomos%)
1	2	0,06	2,3	0,710	4,55	36,4	0,382	14,22	104	0,391	142,7	0,394
2	2	-	-	-	3,57	30,4	0,373	10,37	75,7	0,383	106,1	0,380
Média:					4,06	33,4	0,378	12,30	89,8	0,387	124,4	0,387

(a) Média ponderada de todas as partes da planta.

Apêndice 15 - Matéria seca, nitrogênio total, concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) na soja nodulante cultivada em vasos, com solo TRÉ, aos 70 dias do plantio (cultivo de outubro a dezembro), com exposição do sistema radicular à atmosfera enriquecida em $^{15}\text{N}_2$, por 1097 horas (46 dias).

Vaso n°	n° de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e ramos			Vagens		
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
4	2	2,10	95,6	1,094	4,95	55,9	0,821	25,55	477,8	1,015	2,26	59,0	0,995
5	2	2,28	110,1	1,103	5,75	62,1	0,747	26,19	565,7	1,069	1,45	41,9	0,595
6	2	1,91	86,1	1,122	4,91	55,5	0,778	25,28	424,7	1,056	1,48	42,0	1,016
7	2	1,94	84,8	0,944	5,08	57,4	0,681	22,43	356,6	0,921	1,61	52,3	0,889
8	2	1,80	86,2	1,041	6,10	57,3	0,728	27,42	474,4	1,004	2,23	63,3	0,937
9	2	2,15	101,9	1,140	7,24	78,2	0,837	31,52	740,7	1,130	3,69	90,8	1,052
10	2	2,55	122,1	1,111	7,01	72,9	0,741	25,86	558,6	1,027	2,06	50,7	1,034
$\bar{m}$		2,10	98,3	1,079	5,86	62,8	0,762	26,32	514,1	1,032	2,14	57,1	0,987
s/ $\sqrt{n}$ (a)		0,10	5,3	0,025	0,37	3,5	0,021	1,04	46,7	0,024	0,29	6,4	0,022
CV(%)		12,1	14,4	6,2	16,5	14,5	7,1	10,4	24,0	6,3	35,4	29,5	5,8

(a) erro padrão da média.

Apêndice 16- Matéria seca (parte aérea e nódulos), número de nódulos e redução de C_2H_2 a C_2H_4 em raízes destacadas de soja nodulante cultivada em vaso com solo TRE.

Tempo (dias do plantio)	Número de plantas	Matéria seca		Número de nódulos	C_2H_2 reduzido (μ mol de C_2H_4 / planta.h)
		Parte aérea (g)	Nódulos (g)		
23	3	1,372	0,040	23	
	3	1,244	0,012	9	1,22
	3	1,247	0,018	14	
	3	1,755	0,030	16	1,47
	m (por planta)±s	0,468±0,080	0,008±0,004	5±2	1,35±0,18
31	3	2,881	0,210	39	4,71
	3	2,340	0,143	37	2,87
	3	2,145	0,137	30	2,87
	3	2,298	0,111	40	2,78
	m (por planta)±s	0,805±0,107	0,050±0,014	12±2	3,31±0,94
42	3	5,300	0,519	71	7,51
	3	5,739	0,707	57	8,27
	3	4,031	0,883	62	12,66
	3	5,224	0,582	63	6,33
	m (por planta)±s	1,691±0,244	0,224±0,053	21±2	8,69±2,76
52	3	14,515	1,366	129	20,24
	3	11,467	1,357	114	16,01
	3	9,741	1,249	158	27,23
	3	9,500	1,185	170	10,86
	m (por planta)±s	3,769±0,771	0,430±0,029	48±9	18,59±6,92
63	3	22,54	2,651	288	61,62
	3	22,67	2,444	180	116,29
	3	23,18	2,500	202	50,42
	3	20,55	2,727	280	111,14
	m (por planta)±s	7,41±0,39	0,860±0,044	79±18	84,87±33,69

Apêndice 17 - Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N (nódulos, raízes, vagens, folhas e ramos) na soja nodulante cultivada em vasos, com 70 dias de crescimento, com 70 dias do plantio para os tratamentos: adubado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, enriquecido a 5,89 átomos % de ^{15}N (62,5 mg de N/vaso) e sem adubação nitrogenada.

Vaso	Número de plantas	Nódulos			Raízes			Folhas e ramos			Vagens		
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)
^{15}N Marcado com	1 D	2,66	142,3	0,414	7,61	86,0	0,602	28,42	667,9	0,529	7,78	224,8	0,436
	2 D	2,69	145,3	0,429	7,92	89,5	0,632	31,18	673,5	0,557	6,45	174,2	0,429
	3 D	2,33	123,5	0,413	5,03	56,8	0,700	24,70	627,4	0,569	7,70	240,2	0,460
Natural	$\bar{m}$	2,56	137,0	0,419	6,85	77,4	0,645	28,10	656,2	0,552	7,31	213,1	0,442
	s/n	0,12	6,8	0,005	0,92	10,4	0,029	1,88	14,6	0,012	0,43	20,0	0,009
	CV(%)	7,8	8,6	2,1	23,2	23,2	7,8	11,6	3,8	3,7	10,2	16,2	3,7
^{15}N Natural	1 C	2,34	114,2	0,371	8,27	109,2	0,369	32,51	588,4	0,365	7,28	191,5	0,367
	2 C	2,08	94,6	0,372	6,90	97,3	0,367	28,25	593,3	0,369	5,39	143,9	0,368
	3 C	2,41	131,1	0,373	7,80	95,9	0,367	31,32	551,2	0,367	5,76	148,6	0,368
^{15}N Natural	$\bar{m}$	2,28	113,3	0,372	7,66	100,8	0,368	30,69	577,6	0,367	6,14	161,3	0,367
	s/n	0,10	10,5	0,001	0,40	4,2	0,001	1,27	13,3	0,001	0,58	15,1	0,001
	CV(%)	7,6	16,1	0,3	9,1	7,2	0,3	7,2	4,0	0,5	16,3	16,3	0,3

(a) erro padrão de média.

Apêndice 18- Matéria seca, nitrogênio total e concentração de ^{15}N na soja não nodulante, cultivada em vasos, com solo TRE, aos 70 dias do plantio para os tratamentos: adubado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ enriquecido e ^{15}N (62,5 mg de N/vaso) e sem adubação nitrogenado.

Vaso nº de plantas	Número	Módulos			Raízes			Folhas e ramos			Planta toda	
		Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Matéria seca (g)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (átomos%)	Nitrogênio (mg)	Conc. ^{15}N (b) (átomos%)
cad	4 D 2				2,30	22,8	1,180	10,90	94,8	1,885	117,6	1,749
	5 D 2				2,74	29,6	1,141	12,19	112,1	1,500	141,7	1,425
	6 D 2	0,13	5,5	0,602	3,52	29,9	1,105	11,77	102,4	1,667	137,8	1,520
	$\bar{x}$				2,85	27,4	1,169	11,62	103,1	1,684	132,4	1,554
	$s/\bar{x}$ (a)				0,36	2,3	0,014	0,38	5,0	0,111	7,5	0,036
	CV(%)				21,7	14,7	2,1	5,7	8,4	11,5	9,8	10,6
Mat [a]	4 C 2	0,21	7,0	0,374	2,77	31,3	0,371	11,76	112,9	0,370	151,2	0,370
	5 C 2	0,18	6,8	0,373	2,97	35,0	0,371	11,25	118,2	0,373	160,0	0,373
	6 C 2				2,02	20,0	0,372	6,33	72,5	0,372	92,5	0,372
	$\bar{x}$				2,59	28,8	0,371	10,45	101,2	0,372	134,6	0,372
	$s/\bar{x}$ (a)				0,29	4,5	0,001	1,07	14,4	0,001	21,2	0,001
	CV(%)				19,4	27,2	0,2	17,7	24,7	0,4	27,3	0,4

(a) erro padrão da média.

(b) média ponderada dos valores de todas as partes das plantas.