



(Foto: Agência Brasil. Reprodução)

Capa. Equilíbrio entre produtividade e conservação do solo depende do retorno dos elementos essenciais e da gestão da matéria orgânica, como mostra o avanço das práticas biológicas.

# Bases científicas para uma agricultura biológica

\* Johanna Döbereiner

\*\* José Ivo Baldani

## Resumo

A agricultura biológica visa reciclar nutrientes sem químicos, mas enfrenta desafios na disseminação de dados sólidos e assistência técnica. Embora pragas e erosão possam ser mitigadas por práticas de rotação de culturas, suas vantagens são frequentemente exageradas sem base científica. A manutenção da fertilidade exige a reposição dos nutrientes extraídos, destacando a importância do equilíbrio entre práticas biológicas e convencionais.

**Palavras-chave:** Agricultura biológica; Sustentabilidade; Fertilidade do solo; Nutrientes; Práticas agrícolas.

## Introdução

O termo agricultura biológica está sendo usado para definir sistemas agrícolas baseados largamente numa reciclagem dos nutrientes sem haver acréscimo de fertilizantes e pesticidas obtidos por processos químicos. Infelizmente este tipo de agricultura está sendo explorado por correntes demagógicas que se aproveitam da atual motivação ecológica da população e tentam envolvê-la em definições mal fundadas e muitas vezes exageradas. Não há mistérios na “agricultura biológica” e o seu potencial e suas limitações são bem conhecidos e facilmente compreendidos pelo leigo (não-agrônomo). Entretanto, há pouquíssimos trabalhos, como os de Commoner<sup>[16]</sup>, Berardi<sup>[5]</sup> e Lokeretz et al.<sup>[42]</sup>, que comparam cientificamente a viabilidade econômica da agricultura biológica ou predominantemente biológica com o sistema agrícola convencional.

Sistemas agrícolas baseados nos conhecimentos científicos sobre as possibilidades reais da substituição total ou parcial da adubação química, principalmente a com nitrogênio por processos biológicos, nos Estados Unidos (*corn belt*) podem dar rendimentos equivalentes se rotações de cultura inteligentemente adaptadas a cada caso são usadas<sup>[42]</sup>. Nesses sistemas, pragas e doenças são parcialmente autocontroladas reduzindo assim também a necessidade de uso de defensivos. A grande barreira encontrada na expansão desse sistema biológico é que a avaliação

*“Pode-se calcular daí que a soja, ao fixar o N<sub>2</sub> do ar, economiza ao país anualmente mais que um bilhão de dólares em divisas.”*

dos resultados quase sempre se baseia exclusivamente na produção. Não são consideradas as possibilidades de melhoria das condições físicas do solo, o autocontrole de pragas e doenças e a redução da erosão. A assistência técnica a esse tipo de agricultura também é restrita por ser considerada um sistema não convencional, menos bem fundado em experimentação.

Por outro lado, são divulgados em inúmeros artigos e conferências conceitos que propagam vantagens ecológicas sem fundamento lógico e muito menos científico da “agricultura biológica”, “biodinâmica”, “macrobiótica” etc. Que mais complicado e misterioso o nome, mais atração tem para as grandes massas da população.

Como dito acima, não há mistério nem necessidade para nomes complicados. Uma cultura de milho, feijão ou soja retira do solo os nutrientes N, P, K, Ca, S, Mg e uma série de micronutrientes que precisam ser restituídos para manter a fertilidade do solo. Em regiões tropicais com precipitações elevadas, há ainda lixiviação destes mesmos nutrientes para as camadas profundas do solo e muitas vezes para as águas fluviais e é, por isso, que, de uma maneira geral, os solos de regiões tropicais são mais pobres e menos produtivos.

Para manter a fertilidade de um solo ou, o que é muito mais difícil, recuperar solos erodidos, é necessário que se acrescentem as quantidades dos elementos perdidos. Na agricultura convencional, principalmente nos países industrializados, estes elementos são simplesmente acrescentados em várias formas químicas, altamente solúveis e em excesso para compensar as perdas adicionais de sua lixiviação. Este tipo de agricultura, entretanto, principalmente em regiões quentes, leva a uma progressiva decomposição de um importante componente do solo que é a matéria orgânica. Essa, junto com a argila, representa a fração coloidal do solo e é responsável pela capacidade de retenção de água do solo e pela retenção de parte dos nutrientes, os cátions (K, Ca, Mg<sup>++</sup> e micronutrientes) em forma permutável. Nessa forma, os elementos são disponíveis para a planta, mas é minimizada a lixiviação. A matéria orgânica ainda incorpora e libera nutrientes, principalmente o nitrogênio, sendo muito pouco retido nos coloides e, portanto, o elemento mais facilmente lixiviado. A matéria orgânica do solo consiste em detritos vegetais decompostos pela microflora e fauna do solo e parcialmente polimerizados, formando moléculas complexas, os ácidos húmicos, responsáveis pela relativa resistência do húmus do solo à degradação. A taxa da síntese de húmus normalmente está em equilíbrio com a degradação<sup>[13]</sup> e depende da disponibilidade de restos vegetais e de seu teor de nitrogênio. Quando há deficiência de N, o equilíbrio é quebrado e ocorre constante



perda de matéria orgânica [34, 13]. O nível crítico para isso corresponde aproximadamente ao conteúdo de C e N nos tecidos dos microrganismos (C/N em torno de 10), e se não há nitrogênio suficiente, o excesso de carbono é perdido pela respiração em forma de  $\text{CO}_2$ .

Essas explicações, mesmo que sejam simplificadas aqui, mostram que não há mistérios nem milagres no constante ciclo dos elementos minerais e da matéria orgânica. O que a planta ou a chuva retiram tem que ser restituído, se a fertilidade do solo precisa ser mantida. É propósito deste trabalho resumir os avanços científicos recentes que permitem substituição parcial dessas retiradas, pelo manejo apropriado dos processos biológicos do solo.

## Nitrogênio

O nitrogênio representa a maior parcela nos insumos agrícolas (75% dos custos dos fertilizantes), sendo que somente 39% do adubo nitrogenado

consumido é produzido por empresas nacionais<sup>[40]</sup>. Felizmente, é justamente este o elemento que pode ser obtido do ar através de associações de plantas com microrganismos procariontes.

Esses podem reduzir o N, da atmosfera, formando  $\text{NH}_3$ , utilizado pela planta. Na Figura 1, apresentamos um esquema das transformações de nitrogênio na terra e que indica um ciclo constante entre solo, planta e atmosfera deste elemento. Com isso, a fixação biológica de N, junto com a fotossíntese, representa os processos básicos responsáveis pela manutenção da vida na terra.

## Fixação de $\text{N}_2$ em leguminosas

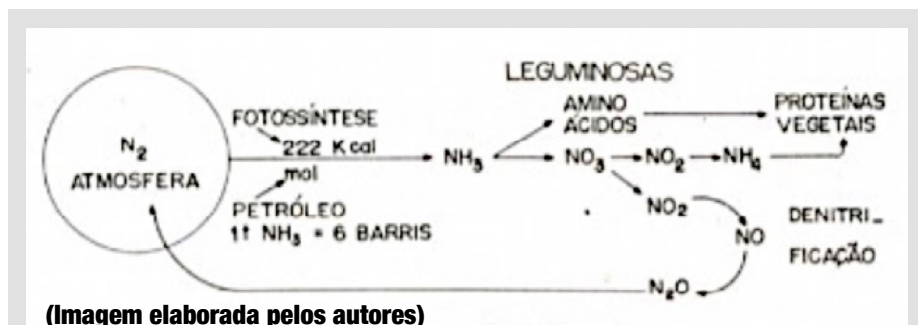
Há várias associações de bactérias fixadoras de  $\text{N}_2$  com plantas superiores, sendo a simbiose das leguminosas com *Rhizobium* a mais perfeita e também a com maior possibilidade de exploração na agricultura. As raízes das leguminosas são infestadas,

logo após a germinação, por bactérias do gênero *Rhizobium*, que provocam a formação de pequenos nódulos onde as bactérias encontram um nicho perfeito com proteção contra efeitos ambientais e alimentação pelo fornecimento de produtos fotossintéticos da planta. Em troca, a bactéria fornece à planta o  $\text{NH}_3$ , proveniente da fixação de  $\text{N}_2$ . O funcionamento desta simbiose é o esquematizado na Figura 2.

Nos nódulos, é formada a leg-hemoglobina que garante acesso rápido de oxigênio necessário para a respiração da bactéria sem permitir inativação da enzima responsável pela fixação de  $\text{N}_2$ , a nitrogenase. Assim, no campo, pode-se facilmente reconhecer nódulos de leguminosas que fixam N, ativamente, pela coloração vermelha de seu interior.

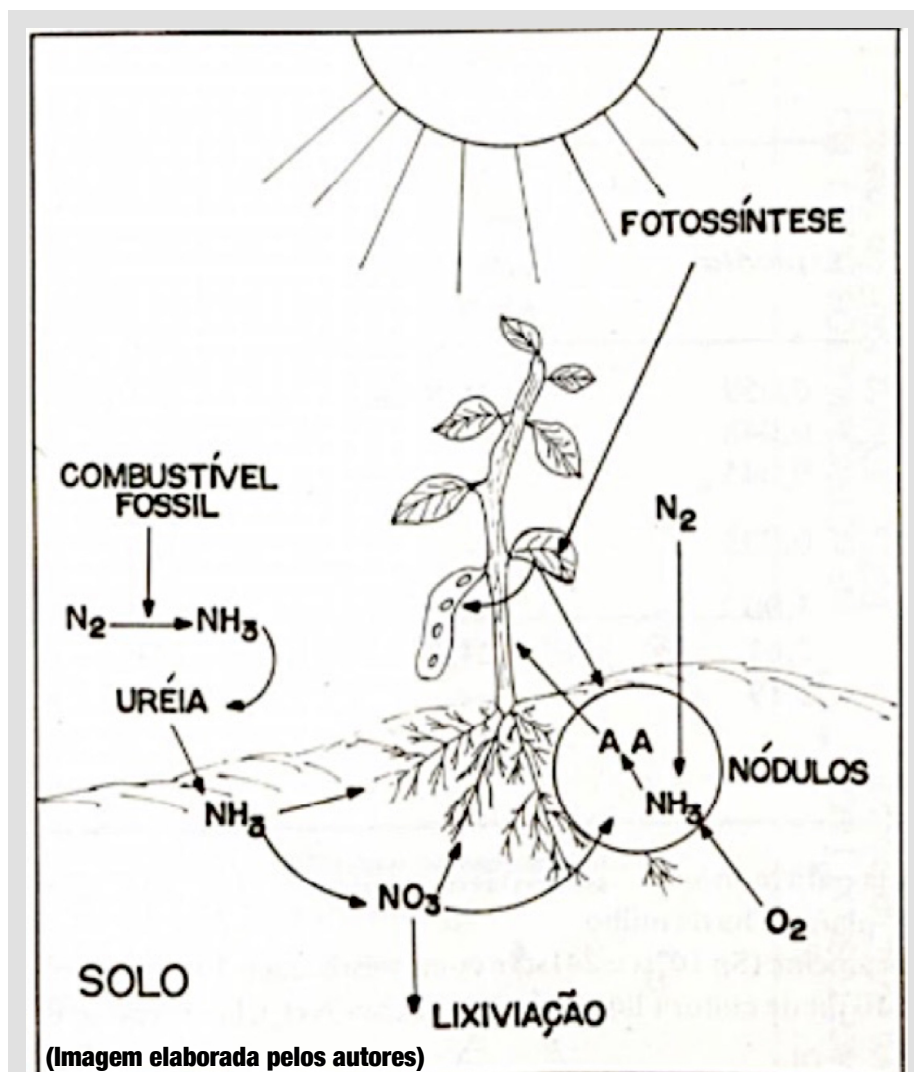
## Leguminosas herbáceas

O exemplo mais impressionante da importância da fixação de N, no desempenho da agricultura brasileira é a soja. As variedades de soja hoje cultivadas no Brasil obtêm todo o nitrogênio necessário a altas produções (2 a 3 t/ha) através da simbiose com *Rhizobium*. Quinze milhões de toneladas de grãos com 6% de N representam um montante de 0,9 milhão de toneladas de N, adubo este



**Figura 1.** Ciclo do nitrogênio na terra: o nitrogênio molecular ( $\text{N}_2$ ) da atmosfera é transformado em amônia ( $\text{NH}_3$ ) utilizando 222 kcal por mol. Esta grande quantidade de energia pode ser proveniente da energia solar (fixação biológica) ou de combustíveis fósseis (fertilizantes químicos). Nas leguminosas, o  $\text{NH}_3$  é incorporado diretamente em aminoácidos e proteínas, enquanto os fertilizantes químicos sofrem primeiro a transformação em nitrato ( $\text{NO}_3$ ), que pode ser perdido pela lixiviação ou sofrer denitrificação.

*"A utilização indiscriminada de fertilizantes nitrogenados, sem dúvida, acarreta perigos de contaminação do meio ambiente."*



**Figura 2.** Transformações de nitrogênio durante um cultivo de leguminosas: a energia para a fixação de  $N_2$  nos nódulos vem da fotossíntese (energia solar), através do fornecimento de açúcares às bactérias que, em troca, devolvem à planta o N fixado em forma de aminoácidos (AA). Caso seja feita adubação com ureia, esta é transformada em  $NH_3$  e  $NO_3$ , e interfere no funcionamento do nódulo diminuindo a fixação de  $N_2$ .

que no mercado de hoje custa Cr\$ 135.000,00 por tonelada. Pode-se calcular daí que a soja ao fixar o  $N_2$  do ar economiza ao país anualmente mais que um bilhão de dólares em divisas. Este montante de nitrogênio economizado, somente pela soja, no Brasil, corresponde a 30% do total dos adubos previstos para a América Latina ( $2,7 \times 10^9$ t) em 1981<sup>[37]</sup>.

Além da soja, o feijão, o feijão-de-corda, o amendoim, a

ervilha, o guandu, a crotalaria, uma infinidade de leguminosas forrageiras e a maioria das espécies florestais nativas são leguminosas fixadoras de  $N_2$  e poderão ser melhor explorados. A exploração das leguminosas deixa ampla margem de melhoramento e intensificação. Carece de estudos que identifiquem os vários fatores ambientais como ainda intrínsecos do genótipo planta e bactéria, que limitam

o desempenho da simbiose com *Rhizobium* indispensável ao fornecimento do nitrogênio necessário.

A soja no Brasil somente chegou ao destaque que tem hoje por ser uma cultura autossuficiente em relação à adubação nitrogenada e isso porque, desde 1965, o melhoramento da soja, além de outros fatores essenciais, é feito no sentido de aperfeiçoar a simbiose em *Rhizobium*, ao passo que nos Estados Unidos a seleção de cultivares foi feita com elevadas dosagens de N mineral. Estimativas realizadas por Hardy e Havelka<sup>[36]</sup> indicam que apenas 25% do nitrogênio necessário para elevadas produções de soja naquele país provém da fixação biológica.

Nas áreas de cerrado do Brasil, a expansão da fronteira agrícola foi conquistada principalmente pela cultura da soja. Nessas áreas se conseguem, hoje, produções de até 4.000/ha sem o uso de nitrogênio mineral e em áreas de lavoura extensiva. Esse êxito se deve, em parte, à introdução e seleção de variedades em níveis zero de nitrogênio, e à utilização de sementes inoculadas<sup>[29]</sup>.

Por outro lado, a inoculação da soja tem proporcionado aumentos de produção já que esta planta requer estirpes específicas, não somente para espécie, mas ainda, para muitas cultivares, e responde dramaticamente à inoculação se as bactérias específicas não estão presentes, em número suficiente no solo. A interação *Rhizobium* x cultivar fica bem ilustrada no Quadro 1<sup>[50]</sup>. Os problemas da nodulação da soja, no primeiro ano de seu plantio, em áreas de

**Quadro 1.** Especificidade hospedeira na inoculação de cereais crescidos no campo com *Azospirillum* spp.

Planta	Inoculante	Peso seco g/planta <sup>a</sup>	N total g/planta <sup>a</sup>	N total devido à inoculação kg N/ha	Produção de grãos ton/ha <sup>b</sup>
Trigo	<i>A. brasilense</i> <sup>c</sup>	3,17	0,059	26,9	1,19
	<i>A. lipoferum</i> <sup>c</sup>	2,67	0,048	4,1	1,17
	Testemunha <sup>d</sup>	2,73	0,045	—	0,87
D. M. S. (1%)		0,12	0,003	—	n. s.
Milho	<i>A. lipoferum</i> <sup>c</sup>	205	3,00	40,2	2,94
	<i>A. brasilense</i> <sup>c</sup>	180	2,63	21,7	2,66
	Testemunha <sup>d</sup>	151	2,19	—	2,59
D. M. S. (1%)		43	0,62	—	n. s.

<sup>a</sup> Médias de 3 coletas e 6 repetições.

<sup>b</sup> Baseado na população de 5 vezes 104 plantas/ha.

<sup>c</sup> Avaliação de 4 linhas centrais de 6 metros para cada parcela. Dados médios de 6 repetições.

<sup>d</sup> Avaliação de 4 linhas centrais de 6 metros para cada parcela. Dados médios de 6 repetições.

<sup>e</sup> Estirpes isoladas de milho (234, 242) e sorgo (209) e suas respectivas mutantes selecionadas para resistência à estreptomicina. A inoculação foi feita no plantio pela adição de 20 ml/planta de cultura líquida crescida com NH Cl (2 mM) contendo 10<sup>7</sup> células/ml. No tratamento testemunha foi adicionado suspensão de bactérias mortas.  
(Fonte: Döbereiner, 1981 [24])

cerrados, após solução preliminar empírica, através de seleção de uma “superestirpe”<sup>[66]</sup>, agora também já têm sua explicação científica. Através da calagem e adubação, estes solos sofrem profundas modificações no seu ecossistema que provocam um desequilíbrio microbiológico.

Há um aumento desproporcional na população de actinomicetos que atinge 89% da microflora e um aumento de bactérias resistentes à estreptomicina<sup>[2]</sup>, indicando acumulação deste antibiótico em microssítios. Brown<sup>[9]</sup> já observou aumentos na proporção de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de várias leguminosas. A Figura 3 mostra um exemplo da multiplicação de actinomicetos na superfície das raízes de milho e feijão e de bactérias

resistentes à estreptomicina no interior de raízes. Assim, parece possível que há acúmulos de estreptomicina nas raízes como resultado da fertilização e calagem de solos de cerrados. Um levantamento da resistência à estreptomicina de *Rhizobium* isolado de soja plantada nos cerrados revelou que 86% das estirpes foram resistentes a 80 ppm ou mais deste antibiótico, confirmando a hipótese acima. A “superestirpe” de *Rhizobium* que resolveu os problemas de inoculação da soja nos cerrados

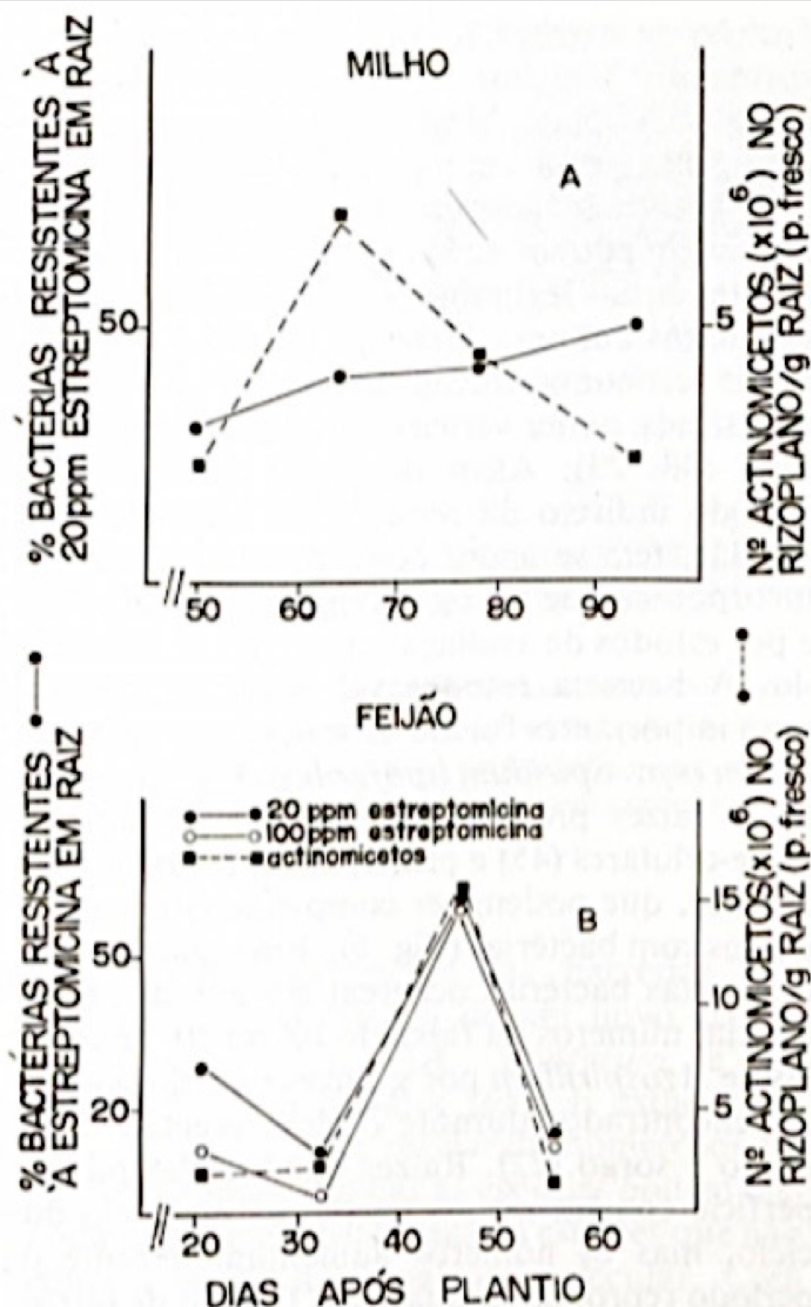
*“Há muitos subsídios científicos para se desenvolver sistemas agrícolas cada vez mais ‘biológicos’, sem prejuízo da produtividade.”*

também é resistente a este antibiótico.

Os trabalhos de melhoramento do feijão (*Phaseolus vulgaris*) no Brasil e no resto do mundo não consideraram a capacidade desta planta de fixar o nitrogênio. Isso devido à sensibilidade desta planta a muitos fatores ambientais, de um lado, e, do outro, devido à suposição, principalmente nos países industrializados, de que o ciclo curto do feijão não permite a acumulação de quantidades de N suficientes a elevadas produções, através da fixação biológica<sup>[11]</sup>. A pesquisa nos últimos anos no Brasil<sup>[30]</sup> e na Inglaterra (Day, comunicação pessoal), entretanto, mostrou a possibilidade do fornecimento por fontes biológicas de todo o nitrogênio necessário para uma produção de feijão de 1.600 kg/ha. Isso representa quase três vezes a produção média do Brasil (Figura 4).

Estudos sobre a interferência da acidez do solo (principalmente toxidez de Al e Mn) foram intensificados desde 1975. Diferenças entre genótipos de plantas foram identificadas. Foi demonstrado que um dos fatores limitantes da fixação de N<sub>2</sub> em feijão é a dificuldade de assimilar molibdênio de solos ácidos, mesmo que este elemento tenha sido aplicado. Molibdênio é o elemento chave da nitrôgenase e, portanto, indispensável ao funcionamento da simbiose. Estudos da interação do metabolismo do nitrato do solo com a fixação de nitrogênio mostraram possibilidades de complementá-la com baixas dosagens





(Imagem elaborada pelos autores)

Figura 3. Aumento da população de actinomicetos e da % de bactérias resistentes à estreptomicina após a calagem e fertilização de solos ácidos (2). A figura representa apenas os tratamentos com efeitos mais característicos. Nota-se o aumento da população de actinomicetos na superfície da raiz (rizoplasma) e das bactérias resistentes a 20 ppm de estreptomicina nas raízes maceradas do milho e à 100 ppm de estreptomicina nas raízes do feijão.

de nitrogênio mineral, durante o enchimento do grão, mas não no início do ciclo<sup>[32]</sup>.

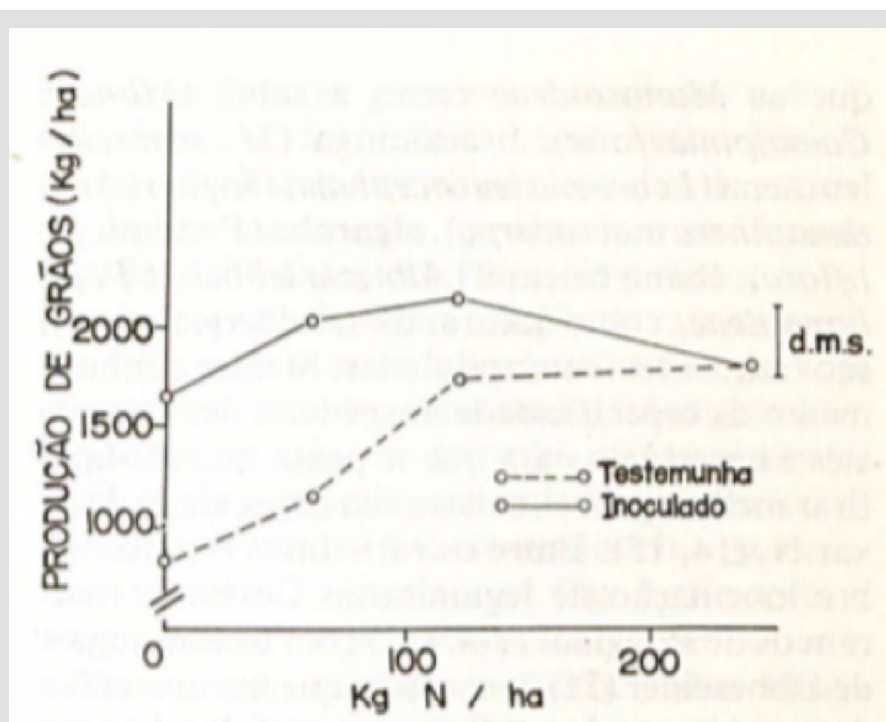
Várias leguminosas forrageiras foram estudadas para estabelecimento,

em pastagens de morro, com capim-gordura (PVA). *Stylosanthes* foi estabelecido e perdurou durante quatro anos de pastoreio, quando semeado em covas somente com fosfato,

Siratiro e *Centrosema* somente perduraram se semeados com pellet de micronutrientes (FTE) e fosfatos na cova<sup>[19]</sup>. Graves problemas de deficiência de micronutrientes em vários outros solos (PVA e LVA) foram confirmados em experimentos de vasos, onde a aplicação somente do molibdênio dobrou a fixação de nitrogênio e a produção de leguminosas forrageiras. Efeitos altamente significativos foram ainda observados em experimentos fatoriais<sup>[18,31]</sup>, onde se constatou deficiência de zinco, ferro, boro e manganês, em solos deste tipo no Rio de Janeiro. É importante ressaltar que há deficiência de manganês nas encostas e toxidez deste elemento em baixadas adjacentes.

Foi elaborado um teste biológico para avaliar deficiência de molibdênio, teste este que deu correlação altamente significativa com a resposta da planta<sup>[33]</sup>. De acordo com análises efetuadas com este teste nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Espírito Santo, Bahia e Sergipe, aproximadamente 50% dos solos são deficientes em Mo.

Outros experimentos mostraram possibilidades de selecionar estirpes de *Rhizobium* mais tolerantes a temperaturas excessivas do solo (Fonseca, O. O. M.; Lee, K. K.; Franco, A. A., dados não publicados). A fixação de nitrogênio nos nódulos de feijão inoculado com os inoculantes habituais é prejudicada se a temperatura do solo ultrapassa 32°C, mas as estirpes selecionadas conseguem tolerar 37°C ou mais. O papel do tamanho da



(Imagem elaborada pelos autores)

**Figura 4.** Comparação dos efeitos da inoculação com os da adubação com nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris*). Observa-se um efeito da inoculação que corresponde ao efeito da aplicação de 100 kg de N/ha, e ainda a falta de resposta à inoculação junto com altas doses de N aplicadas em forma de adubos.

semente e das folhas cotiledonais no fornecimento de material energético para a formação de nódulos em *Stylosanthes* foi identificado como fator decisivo do estabelecimento desta leguminosa forrageira em pastos já estabelecidos.

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

## Leguminosas arbóreas

A família Leguminosae mais provavelmente se originou nos trópicos, onde ocorre o maior número de espécies (4.618 espécies contra 3.269 em regiões temperadas), sendo que mais de 95% de leguminosas de clima temperado são Papilionoideae, enquanto Mimosoideae e Caesalpinioideae são predominantemente tropicais<sup>[50]</sup>. A grande maioria das leguminosas que ocorrem nas florestas e savanas tropicais são árvores, sendo que 95% de Mimosoideae, 97% de Caesalpinioideae e 38% de Papilionoideae são espécies lenhosas<sup>[65]</sup>.

Mas nem todas as leguminosas são capazes de fixar  $N_2$  em associação com

Rhizobium e poucas delas foram examinadas a respeito de nodulação. Das espécies de Mimosoideae testadas, 98% são capazes de fixar nitrogênio em contraste com 60% de Papilionoideae e 38% de Caesalpinioideae<sup>[7]</sup>. As espécies da subfamília Caesalpinioideae, como pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), pau-ferro (*Caesalpinia ferrea*), ainda não foram encontradas com nódulos, enquanto as Mimosoideae como a sabiá (*Mimosa Caesalpiniaefolia*), bracatinga (*M. scabrella*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), angico (*Anadenanthera macrocarpa*), algaroba (*Prosopis juliflora*), ébano oriental (*Albizia lebbek*) e Papilionoideae, como jacarandá (*Dalbergia nigra*), são frequentemente noduladas. Melhor conhecimento da especificidade hospedeira dessas espécies é necessário para que se possa inoculá-las e tirar melhor proveito desta sua capacidade de fixar  $N_2$ <sup>[14, 15]</sup>. Entre os raríssimos estudos sobre inoculação de leguminosas florestais figuram os de Poggiani *et al.*<sup>[52]</sup>, com bracatinga e de Döbereiner<sup>[21]</sup> com sabiá, que mostrou taxa de crescimento de mudas mais que dobrado e um aumento de pega de 52% para 94%.

Entre as espécies mais promissoras para produção de lenha, carvão vegetal e polpa para indústria de papel, mais que a metade são leguminosas<sup>[47]</sup>. Estas espécies representam uma alternativa interessante para o eucalipto, pois, além de fornecer madeira, ainda podem fornecer forragem fresca ou feno e complementos proteicos valiosos nas vagens; forragens estas que podem

ser manejadas de forma que produzam nas épocas secas e carentes principalmente no Nordeste<sup>[26]</sup>. As espécies mais recomendadas para forragem são *Leucaena leucocephala*, *Sesbania grandiflora*, *Gliricidia sepium*, *Mimosa scabrella* e *M. caesalpinidefolia*<sup>[7,26]</sup>.

Recentemente está sendo ainda recomendado o plantio de leguminosas lenhosas como adubação verde<sup>[17]</sup>. As folhas de várias espécies como a *Leucaena* e *Sesbania* podem ser cortadas regularmente e usadas como adubo verde e o plantio intercalado dessas espécies com culturas anuais como o feijão e milho representa um sistema inteiramente novo, onde, usando a folhagem como adubação verde ou mulch até 500 kg N/ha por ano, podem ser obtidos através de fixação biológica de  $N_2$ <sup>[35,8]</sup>. Outras espécies promissoras para adubação verde são a *Gliricidia sepium*, *Acacia mearnsii*, *Albizia spp*, *Calliandra calothyrsus* e *Mimosa scabrella*, a bracinga<sup>[7]</sup>.

Várias espécies, como, por exemplo, a bracinga, perdem grande quantidade de folhas ricas em N que se compõem facilmente formando húmus<sup>[47]</sup>, contribuindo para o aumento da matéria orgânica e fertilidade do solo, mesmo que seja explorado apenas para madeira.

## Fixação de $N_2$ em gramíneas

Apesar da disponibilidade de leguminosas de grão, forrageiras e florestais, a extensão da fixação de nitrogênio aos cereais e gramíneas forrageiras tem sido o grande desafio da

pesquisa no assunto. Mesmo que apenas parte do nitrogênio possa ser fornecida pela associação com bactérias fixadoras desse elemento, a economia em adubos chegaria a proporções semelhantes às das leguminosas, devido à importância dessas culturas. Fixação de nitrogênio em níveis economicamente interessantes foi demonstrada numa variedade de gramíneas e cereais<sup>[48,23]</sup>. Além de dados obtidos pelo método indireto da redução de acetileno<sup>[27,10,11]</sup>, tem-se agora confirmação através da incorporação de nitrogênio marcado ( $^{15}N_2$ )<sup>[20]</sup> e por estudos de avaliação direta do N assimilado. A bactéria responsável pelas associações mais importantes foi identificada como *Azospirillum* (syn. *Spirillum lipoferum*) (Figura 5); infecta as raízes proliferando em espaços inter e entrecelulares [45] e principalmente nos protoxilemas, que podem ser completamente preenchidos com bactérias (Figura 6). Em regiões tropicais, essas bactérias ocorrem em grande abundância; números na faixa de  $10^6$  ou  $10^7$  de células de *Azospirillum* por g raízes ou solo podem ser encontrados durante o ciclo vegetativo de milho e sorgo<sup>[22]</sup>. Raízes esterilizadas na superfície contêm menos bactérias no início do ciclo, mas os números aumentam durante o período reprodutivo quando a fixação de nitrogênio nas raízes de vários cereais atinge o seu máximo. Parece, portanto, que a fixação de nitrogênio ocorre principalmente no interior das raízes<sup>[45]</sup>.

Uma vez estabelecidas as associações de gramíneas e cereais com *Azospirillum*, foram iniciados trabalhos sobre a ecologia e a fisiologia das

associações para esclarecimento de seu mecanismo. Reclassificação das bactérias responsáveis com a criação de um novo gênero com duas espécies (*A. lipoferum* e *A. brasilense*) foi necessária<sup>[65]</sup>. E estudos da fisiologia da bactéria revelaram numerosos fatos interessantes. Ambas as espécies podem dissimilar nitrato e nitrito, mas há estirpes que não reduzem nitrito a nitrogênio molecular. Com exceção deste grupo, as demais formas de *Azospirillum* são denitrificadores, isto é, além de fixarem nitrogênio, possuem o metabolismo para o processo oposto, sendo a perda de nitrogênio mineral em forma gasosa (Figura 1). A dissimilação do nitrato, ou como também pode ser chamada a respiração de nitrato, por outro lado, pode substituir o oxigênio para promover fixação de nitrogênio quando o oxigênio se torna escasso<sup>[48,49]</sup>. Vários tipos de mutantes de *Azospirillum*, que perderam a nitrato e/ou a nitrito redutase, foram obtidos, alguns dos quais capazes de fixar nitrogênio na presença de níveis elevados de nitrato no solo<sup>[44]</sup>. Entendimento da interação de todas essas características representa a base do desenvolvimento de associações onde será possível complementar a fixação de nitrogênio com adubos nitrogenados minerais sem prejuízo para a primeira e com melhor aproveitamento dos últimos.

Recentemente, foi ainda demonstrada especificidade hospedeira na associação das gramíneas<sup>[3]</sup>. Em um solo uniformemente inoculado, raízes de milho foram infectadas apenas por *A. lipoferum*,





(Imagem elaborada pelos autores)

Figura 5. *Azospirillum* *brasilense* observado no microscópio eletrônico com aumento de 14.000 × (62).



(Imagem elaborada pelos autores)

Figura 6. Infecção de raízes de milho inoculado com *Azospirillum*, no campo. Note presença de bactérias no protoxilema (PX), vasos secundários que se estendem ao longo do xilema (X), sistema condutor da seiva na raiz (28).

enquanto trigo e arroz selecionaram para *A. brasilense*. Ampliação destes estudos para o campo revelou a infestação de várias outras gramíneas tropicais por *A. lipoferum*, e dos cereais temperados por *A. brasilense*. Entre as estirpes isoladas de raízes de ambas as espécies predominaram formas não denitrificantes<sup>[1]</sup>. Mas, além disso, as estirpes de *Azospirillum*, isoladas de raízes de milho, como o Rhizobium de nódulos de soja crescido no cerrado, foram mais tolerantes à estreptomicina que as do solo ou da rizosfera<sup>[25]</sup>. A multiplicação seletiva de actinomicetos e bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera do milho já foi vista na Figura 3. No solo, a estreptomicina é inativada em horas e, portanto, não tem igual efeito. Essas observações, parcialmente já feitas por outros autores, muitos anos atrás, explicam ainda porque bacterioses, como ocorrem em batata ou tomate, podem ser combatidas eficientemente com rotação de cultura com milho, arroz e trigo. Como é relativamente fácil fazer bactérias resistentes a certos antibióticos, essas observações abrem um largo campo de possibilidades de manipular a microflora do solo e, especificamente, da rizosfera, e de introduzir bactérias desejadas.

A urgência de se obter gramíneas e cereais que possam cobrir parte de suas necessidades em nitrogênio pela fixação biológica levaram a tentativas prematuras de resolver este problema complexo através da simples inoculação com a

primeira bactéria à mão<sup>[4,6,12,57,59]</sup> independente de sua origem ou eficiência.

Mesmo na simbiose das leguminosas, já quase há um século estabelecida, a inoculação com estirpes de *Rhizobium*, especificamente selecionadas, raras vezes proporciona aumentos espetaculares de produção sob condições de campo. Os avanços recentes discutidos neste trabalho mostram claramente que a melhor identificação das interações planta-bactéria são necessários para indicar as características desejadas de *Azospirillum*, *Bacillus* ou outras bactérias fixadoras de  $N_2$  que serão vantajosos para o desenvolvimento da planta hospedeira nas várias associações.

Mesmo assim, nos últimos anos, acumulou-se suporte para o uso da inoculação de cereais com *Azospirillum* que proporcionou aumentos significativos do crescimento da planta e mesmo da produção sob condições de campo<sup>[41,60]</sup>. A inoculação de milho forrageiro e *Setaria italica* proporcionaram aumentos na ordem de 2,2 e 0,65 ton/ha na matéria seca e 77,1 e 14,7 kg N/ha no nitrogênio incorporado na matéria seca<sup>[41]</sup>. É interessante que não parecem ocorrer *Azospirillum spp.* nos solos destes experimentos feitos em Israel, o que faz com que o efeito da inoculação seja mais pronunciado.

Os conhecimentos recentes da especificidade hospedeira nas associações de *Azospirillum* levaram a resultados promissores também no Brasil (Quadro 1). Os aumentos na incorporação

de N em milho e trigo devidos à inoculação com as estirpes apropriadas de *Azospirillum* podem ser atribuídos tanto ao aumento da matéria seca como o do N% e, portanto, sugerem efeitos através da fixação de N, e não efeitos hormonais como sugerido por Tien et al.<sup>[63]</sup>. Os aumentos de N na planta na ordem de 40 kg/ha correspondem aos efeitos de uma aplicação de 60 g/ha em forma de  $NH_4 NO_3$ . A importância da seleção de estirpes de *Azospirillum* ficou ainda mais evidenciada nos resultados apresentados nos Quadros 2 e 3.

Esses resultados promissores, entretanto, não deviam levar a mais uma onda precipitada de querer inocular indiscriminadamente. Ainda falta muito para se definir condições e bactérias apropriadas para cada situação.

Assim, os últimos 10 anos de pesquisa sobre fixação de N em gramíneas indicam as seguintes práticas para sua exploração a curto prazo:

1. Maximização da fixação de N, espontânea pela utilização de fórmulas de adubação apropriadas, isto é, níveis baixos de N, altos de P complementados com Mo.

2. Melhoramento de plantas para maior fixação de  $N_2$ .

3. Inoculação com estirpes selecionadas de *Azospirillum* quando forem disponíveis.

4. Interações dos genótipos planta e bactéria e níveis baixos de NO precisam ser melhor explorados, pois representam a chave para a complementação da fixação de

N, com N mineral em cereais e gramíneas forrageiras.

## Fósforo

Enquanto o nitrogênio pode ser obtido do ar, o fósforo e os demais elementos retirados na colheita têm que ser restituídos por fertilizantes. Por isso, o fósforo, na maioria dos solos tropicais, é o fator principal limitante do desenvolvimento das culturas. O adubo fosfatado mais utilizado é o superfosfato manufaturado através do tratamento de fosfatos naturais ou de rocha com ácido sulfúrico, tratamento este que torna os fosfatos solúveis. Os vários processos biológicos não acrescentam fósforo ao sistema solo-planta, mas podem solubilizar os fosfatos do solo e os naturais aplicados como adubos. Como o Brasil tem reservas muito grandes de fosfatos naturais (como Araxá e Patos, por exemplo), a substituição dos processos químicos que utilizam enxofre, sendo importado, por processos biológicos, atinge importância semelhante à da fixação do N, do ar. O "Biosuper", introduzido na Austrália<sup>[61]</sup>, não apresenta grandes vantagens para nós. Consta do preparo de pellets contendo fosfatos, enxofre e bactérias oxidantes do enxofre (*Thiobacillus*). Nestes, uma vez expostos à umidade do solo, imitam os processos químicos; isto é, as bactérias oxidam o S formando ácido sulfúrico que solubiliza no solo os fosfatos naturais. Muito se fala recentemente no papel das micorrizas na solubilização

**Quadro 2.** Efeito da inoculação de milho var. AG 259 crescido em condições de campo, com estirpes de *A. lipoferum* e suas mutantes resistentes à estreptomicina (20 ppm).

Inoculantes <sup>d</sup>	Peso seco <sup>a</sup> g/2 plantas	N total <sup>b</sup> g/2 plantas	$\Delta$ N total devido à inoculação kg N/ha	Produção grãos <sup>c</sup> ton/ha
209	273	3,2	2,5	1,72
209st	267	3,3	5,0	1,45
234	272	3,2	2,5	1,53
234st	282	3,4	7,5	1,48
242	250	2,7	10,0	1,50
242st	301	3,9	20,0	1,45
Testemunha	248	3,1	—	1,02
D. M. S. (5%)	32,8	0,58		n. s.

<sup>a</sup> Médias de 3 coletas e 6 repetições.

<sup>b</sup> Baseado na população de 5 vezes 104 plantas/ha.

<sup>c</sup> Avaliação de 4 linhas centrais de 6 metros para cada parcela. Dados médios de 6 repetições.

<sup>d</sup> Avaliação de 4 linhas centrais de 6 metros para cada parcela. Dados médios de 6 repetições.

<sup>e</sup> Estirpes isoladas de milho (234, 242) e sorgo (209) e suas respectivas mutantes selecionadas para resistência à estreptomicina. A inoculação foi feita no plantio pela adição de 20 ml/planta de cultura líquida crescida com NH<sub>4</sub>Cl (2 mM) contendo 10<sup>7</sup> células/ml. No tratamento testemunha foi adicionado suspensão de bactérias mortas.

(Fonte: Baldani et al., 1982 [2])

**Quadro 3.** Efeito da inoculação de milho IPEACS Sintético III, crescido em condições de campo com estirpes de *A. lipoferum* isoladas de diferentes plantas de via fotossintética C.

Planta	Inoculante	Peso seco g/planta <sup>a</sup>	N total g/planta <sup>b</sup>	N total devido à inoculação kg N/ha	Produção de grãos ton/ha <sup>c</sup>
Trigo	<i>A. brasilense</i> <sup>e</sup>	3,17	0,059	26,9	1,19
	<i>A. lipoferum</i> <sup>e</sup>	2,67	0,048	4,1	1,17
	Testemunha <sup>d</sup>	2,73	0,045	—	0,87
D. M. S. (1%)		0,12	0,003	—	n. s.
Milho	<i>A. lipoferum</i> <sup>e</sup>	205	3,00	40,2	2,94
	<i>A. brasilense</i> <sup>e</sup>	180	2,63	21,7	2,66
	Testemunha <sup>d</sup>	151	2,19	—	2,59
D. M. S. (1%)		43	0,62		n. s.

<sup>a</sup> Médias de 3 coletas e 6 repetições.

<sup>b</sup> Baseado na população de 5 vezes 10<sup>4</sup> plantas/ha.

<sup>c</sup> Avaliação de 4 linhas centrais de 6 metros para cada parcela. Dados médios de 6 repetições.

<sup>d</sup> Estirpes enroladas de raízes de milho (102<sup>st</sup>; 113, 117, 234<sup>st</sup>, 241<sup>st</sup>, 242<sup>st</sup>), sorgo (200 e 209<sup>st</sup>) e tiririca (214<sup>st</sup>). Inoculação foi feita no plantio pela adição de índices ml/planta de cultura líquida crescida com NH<sub>4</sub>Cl (2mM) contendo 10<sup>7</sup> células/ml. A testemunha recebeu suspensão de bactérias mortas.

<sup>e</sup> Estirpes selecionadas para resistência a vários níveis de estreptomicina.

(Fonte: Baldani et al., 1982 [2])

dos fosfatos<sup>[39,43,55,56,64]</sup>. No caso de culturas anuais, se trata de associações endotróficas de certos fungos mais ou menos específicos que são muito difíceis de cultivar no laboratório, mas que através de extensos micélios ectotróficos aumentam a superfície do sistema radicular, aumentando, portanto, a eficiência da extração dos fosfatos presentes no solo ou em fosfatos naturais<sup>[38,58]</sup>. A inoculação com micorrizas endotróficas pode mostrar aumentos dramáticos da produção em experimentos com solo esterilizado<sup>[53]</sup>. No campo, entretanto, é difícil estabelecer fungos selecionados e que competem com os já naturalmente existentes. A produção de esporos em quantidades necessárias para a inoculação no campo ainda é problemática<sup>[43]</sup>. Mesmo assim, tem-se obtido alguns resultados promissores em experimentos de inoculação sob condições de campo quando se fez uma pré-inoculação das plântulas ou peletização de sementes<sup>[39,54,55]</sup>. Bem mais promissoras são as chances de inocular sementeiras com solo esterilizado como, por exemplo, de café<sup>[43]</sup> ou fruteiras, onde a inoculação com esporos, ou simplesmente solo contendo esporos selecionados pode proporcionar efeitos dramáticos no desenvolvimento das mudas. Lopes<sup>[43]</sup> mostrou ainda que, análoga à simbiose das leguminosas, há certa especificidade hospedeira nas micorrizas endotróficas, sendo certos fungos melhores para café e outros para o siratro. Como o



processo da fixação biológica de  $N_2$  é altamente estimulado pela disponibilidade de fosfatos, observam-se efeitos sinérgicos de micorrizas e *Rhizobium*, especialmente quando são usados fosfatos naturais<sup>[46]</sup>.

Outras possibilidades biológicas de solubilizar fosfatos são pouco conhecidas, mas existem. Aplicação de diversos materiais orgânicos como esterco, adubação verde, composto de lixo e mesmo vinhaça provocam aumentos grandes da microflora do solo, que assimila, com maior eficiência que a planta, fosfatos em forma pouco solúvel e assim os transformam em fosfatos orgânicos que então serão liberados na medida que os microrganismos se decompõem, uma vez que as fontes energéticas se esgotaram.

## Outros elementos

Para o fornecimento do potássio e outros elementos maiores (Ca, Mg, S) e menores (Mo, Fe, Cu, B, Zn, Co), não se conhecem alternativas biológicas, a não ser a sua liberação das reservas do solo através da intemperização das rochas e decomposição da matéria orgânica.

## Rotação de culturas

O desenvolvimento de sistemas agrícolas *p r e d o m i n a n t e m e n t e* “biológicos”, se os processos acima descritos podem assim ser chamados, depende da integração de dados científicos obtidos em experimentos com leguminosas e gramíneas com práticas agrônômicas.

O conceito “antiquado” de rotação de culturas que foi responsável pela manutenção da produtividade no tempo dos nossos antepassados hoje está perfeitamente justificado pelas vantagens no combate a doenças e pragas, de ervas daninhas e principalmente na alternância de leguminosas com gramíneas, onde os primeiros contribuem para o fornecimento de nitrogênio aos segundos. A rotação trigo-soja praticada no sul é um exemplo muito simplificado e rotações mais complexas, como, por exemplo, arroz-soja-milho-crotalaria-feijão-amendoim-milho — três anos forrageiras, ou, soja-milho-amendoim-arroz — três anos forrageiras, representam alternativas para as regiões de cerrado e muitas outras. Com os problemas atuais do suplemento energético, a inclusão na rotação de glebas com florestas de ciclo curto para lenha (bracatinga, sabiá, *Leucaena*) oferecem boas perspectivas para a recuperação de solos esgotados. Há outras inúmeras possibilidades de consorciação, adubação verde e cultivos alternados que podem contribuir para uma rotação de cultura, ainda mais equilibrada e produtiva e que se oferecem pelos achados recentes resumidos neste trabalho. Nenhuma delas representa mistérios “biodinâmicos” que envolvam atividades pouco definidas da microflora e fauna do solo, mas apenas uma sequência lógica dos eventos ora descritos. É verdade que há poucos resultados experimentais que comprovam vantagens de um ou outro sistema integrado de rotação de culturas, principalmente nos trópicos, e consideramos isso

uma das prioridades principais na pesquisa agrícola aplicada. É ainda o tipo do experimento que qualquer fazendeiro educado pode e deve fazer, com o lápis na mão, para avaliar vantagens econômicas a prazo mais longo e não imediato.

## Ecologia

Quais seriam então as vantagens “ecológicas” da “agricultura biológica”, também muitas vezes salientadas com demagogia? A utilização indiscriminada de fertilizantes nitrogenados, sem dúvida, acarreta perigos de contaminação do meio ambiente, principalmente de águas potáveis, já que este elemento é normalmente aplicado em doses elevadas e é facilmente lixiviado. Em nosso meio há poucos casos de gravidade, mas na Califórnia, por exemplo, como no *cornbelt* dos Estados Unidos<sup>[16]</sup>, o aparecimento de nitrato e nitrito nas águas tem atingido níveis alarmantes. Uma agricultura baseada na fixação biológica de nitrogênio elimina completamente este perigo. As bactérias param de fixar nitrogênio do ar, quando há concentrações deste elemento no solo que satisfazem as suas necessidades e as plantas assimilam nitrato do solo, se este está disponível, em vez de alimentar as bactérias para que as mesmas possam fixar o nitrogênio do ar. Assim o sistema biológico está em equilíbrio com o meio ambiente e jamais haverá acumulação de excessos de N através da fixação biológica.

Não se conhecem casos de poluição com o uso de outros fertilizantes, porque o fosfato é pouco móvel e permanece

na camada superficial do solo onde foi colocado e outros elementos não são aplicados em quantidades excessivas.

A rotação da cultura mencionada acima diminui pragas, doenças e invasores e, com isso, a necessidade do uso de defensivos.

Concluimos, portanto, que há muitos subsídios científicos para se desenvolver sistemas agrícolas cada vez mais “biológicos”, sem prejuízo da produtividade. Eles são economicamente viáveis e deveriam ser muito melhor explorados. Por outro lado, a preocupação exagerada de eliminar de vez qualquer adubação e defensivos químicos sem fundamento científico não somente trará sérios prejuízos para a produtividade agrícola e a sua rentabilidade como ainda afastará o agricultor das reais vantagens dos sistemas agrícolas acima descritos.

Texto publicado originalmente em:

DÖBEREINER, J.; BALDANI, J. I. Bases científicas para uma agricultura biológica. *Ciência & Cultura*, São Paulo, v. 34, n. 7, p. 869-881, 1982.

\* Este texto foi atualizado segundo o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa.

\* Johanna Döbereiner foi engenheira agrônoma pioneira em biologia do solo. Pesquisadora do atual Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia da Embrapa, suas pesquisas foram fundamentais para que o Brasil desenvolvesse o Programa Nacional do Alcool e se tornasse o maior produtor mundial de soja do mundo.

\*\* José Ivo Baldani é pesquisador da Embrapa Agrobiologia e professor colaborador da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

## Referências

- BALDANI, J. I.; PEREIRA, P. A. A.; ROCHA, R. E. M.; DÖBEREINER, J. Especificidade na infecção de raízes por *Azospirillum* spp em plantas com via fotossintética C3 e C4. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 16, n. 3, 1981.
- BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; XAVIER, D. F.; BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. *Revista de Microbiologia*, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 250-263, 1982.
- BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 12, p. 433-439, 1980.
- BARBER, L. E.; TJEPKEMA, J. D.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 32, n. 1, p. 108-113, 1976.
- BERARDI, G. M. Organic and conventional wheat production: Examination of energy and economics. *Agro-Ecosystems*, v. 4, n. 3, p. 367-376, 1978.
- BOUTON, J. H.; SMITH, R. L.; SCHANK, S. C.; BURTON, G. W.; TYLER, M. E.; LITTELL, R. C.; GALLAHER, R. N.; QUESENBERRY, K. H. Response of pearl millet inbreds and hybrids to inoculation with *Azospirillum* brasilense. *Crop Science*, v. 19, p. 12-16, 1979.
- BREWBAKER, J. L.; DEN BELDT, O. V.; MACDICKEN, K. Nitrogen fixing tree resources: potentialities and limitations. In: WORKSHOP BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TECHNOLOGY FOR TROPICAL AGRICULTURE, 1981, Cali, Colômbia. *Anais [...]*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1981.
- BREWBAKER, J. L.; PLUCKNETT, D. L.; GONZALEZ, V. Varietal variation and yield trials of *Leucaena leucocephala* (“koa haole”) in Hawaii. *Hawaii Agricultural Experiment Station University of Hawaii*, v. 166, p. 1-29, 1972.
- BROWN, M. E. Stimulation of streptocymine-resistant bacteria in the rhizosphere of leguminous plant. *Journal of General Microbiology*, London, v. 24, p. 369-377, 1961.
- BÜLLOW, J. F. W.; DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 72, p. 2389-2393, 1975.
- BURTON, J. C. Pragmatic aspects of the Rhizobium: leguminous plant association. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington: Washington State University Press, 1974.

12. BURRIS, R. H.; OKON, Y.; ALBRECHT, S. L. Properties and reactions of *Spirillum lipoferum*. In: GRANHALL, U. *Environmental Role of Nitrogen-Fixing Blue-Green Algae and Asymbiotic Bacteria*. Stockholm: Ecological Bulletins/NFR26, 1978.
13. CAMPBELL, C. A. Soil organic carbon, nitrogen and fertility. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S. U. *Soil organic matter: developments in soil science*. Amsterdam: Elsevier, 1978.
14. CAMPÊLO, A. B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp. de leguminosas florestais. 1976. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1976.
15. CAMPÊLO, A. B.; CAMPÊLO, C. R. Eficiência da inoculação cruzada entre espécies da subfamília Mimosoideae. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 5, p. 333-337, 1970.
16. COMMONER, B. Lost-risk-benefit analysis of nitrogen fertilization: a case history. *Ambio*, Stockholm, v. 6, n. 2-3, p. 157-161, 1977.
17. CURRAN, H. *Giant ipil-ipil: green gold for the tropics*. 1976.
18. DE-POLLI, H.; SUHET, A. R.; FRANCO, A. A. Micronutrientes limitando a fixação de nitrogênio atmosférico e produção de Centrosema em solo podzólico vermelho amarelo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15., 1975, Campinas. *Anais [...]*. Viçosa: SBCS, 1975.
19. DE-POLLI, H.; CARVALHO, S. R.; LEMOS, P. F.; FRANCO, A. A. Effect of micronutrients on establishment of tropical legumes and persistence on a red yellow Podzolic soil hill pasture. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R. H.; HOLLANDER, A. *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. London: Plenum Press, 1977.
20. DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by <sup>15</sup>N, incorporation. *Soil biology & biochemistry*, Oxford, v. 9, p. 119-123, 1977.
21. DÖBEREINER, J. Efeito da inoculação de sementeiras de sabiá (*Mimosa caesalpinii* folia) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 2, p. 301-305, 1967.
22. DÖBEREINER, J. Potential for nitrogen fixation in tropical legumes and grasses. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R. H.; HOLLANDER, A. *Limitations and potentials for biological nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere*. London: Plenum Press, 1977.
23. DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. *Interciência*, v. 4, p. 200-205, 1979.
24. DÖBEREINER, J. Emerging technology based on BNF by associative nitrogen-fixing organisms. In: WORKSHOP BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TECHNOLOGY FOR TROPICAL AGRICULTURE, 1981, Cali, Colômbia. *Anais [...]*. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1981.
25. DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v. 25, n. 11, p. 1264-1269, 1979.
26. DÖBEREINER, J.; CAMPÊLO, A. B. Importance of legumes and their contribution to tropical agriculture. In: HARDY, R. W. F. *A treatise on dinitrogen fixation*. Section IV: Agronomy and ecology. Nova York: John Wiley, 1977.
27. DÖBEREINER, J.; DAY, J. M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W. E.; NYMAN, C. J. *Proceedings International Symposium on Nitrogen Fixation*. Pullman: Washington State University Press, 1974.
28. DÖBEREINER, J.; DE-POLLI, H. Nitrogen fixation in rhizocoenoses. In: SIMPÓSIO SOBRE AMBIENTE RADICULAR, Londrina, 1980.
29. DUQUE, F. F. *Comportamento de cultivares de amendoim, feijão comum e soja no Distrito Federal*. 1973. 69 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1973.
30. FRANCO, A. A.; DAY, J. M. *The role of lime and molybdenum on the symbiosis of Phaseolus vulgaris*. In: AMERICAN RHIZOBIUM CONFERENCE, 5., Raleigh, Carolina do Norte, 1975.
31. FRANCO, A. A. Micronutrient requirements of legume *Rhizobium* symbiosis in the tropics. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R. H.; HOLLANDER, A. *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. London: Plenum Press, 1977.



32. FRANCO, A. A.; PEREIRA, J. C.; NEYRA, C. A. Nitrogen utilization in *Phaseolus vulgaris* L. In: DÖBEREINER, J.; BURRIS, R.H.; HOLLAENDER, A. *Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics*. London: Plenum Press, 1977.
33. FRANCO, A. A.; PERES, J. R. R.; NERY, M. The use of *Azotobacter paspali* N-ase (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> reduction activity) to measure molybdenum deficiency in soils. *Plant and Soil*, v. 50, p. 1-11, 1978.
34. GREENLAND, D. J.; NYE, P. H. Increases in the carbon and nitrogen contents of tropical soils under natural fallows. *Journal of Soil Science*, v. 10, p. 284-289, 1959.
35. GUEVARRA, A.B.; WHITNEY, A. S.; THOMPSON, J. R. Influence of intra-row spacing and cutting regimes on the growth and yield of *Leucaena*. *Agronomy Journal*, v. 70, p. 1033-1037, 1978.
36. HARDY, R. W. F.; HAVELKA, U. D. Nitrogen fixation research: A key to world food. *Science*, v. 188, p. 633-643, 1975.
37. HARRIS, G. T.; HARRE, E. A. *World fertilizer situation and outlook 1978-1985*. Muscle Shoals: International Fertilizer Development Center, 1979.
38. HATTINGH, M. J.; GRAY, L. E.; GERDERNANN, J. W. Uptake and translocation of <sup>32</sup>P-labelled phosphate to onion roots by endomycorrhizal fungi. *Soil Science*, v. 116, p. 383-387, 1973.
39. HAYMAN, D. S.; MOSSE, B. Improved growth of white clover in hill grasslands by mycorrhizal inoculation. *Annals of Applied Biology*, v. 93, p. 141-148, 1979.
40. INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS - IPT. *Perspectivas para os fertilizantes nitrogenados no Brasil*. São Paulo: IPT, 1981.
41. KAPULNIK, Y.; SARIG, S.; NUR, I.; OKON, Y.; KIGEL, J.; HENIS, Y. Yield increases in summer cereal crops of Israel in fields inoculated with *Azospirillum*. *Experimental Agriculture*, v. 17, n. 2, p. 179-187, 1981.
42. LOCKERETZ, W.; SHEARER, G.; KOHL, D. H. Organic farming in the corn belt. *Science*, v. 211, n. 4482, p. 540-547, 1981.
43. LOPES, L. S. *Eficiência e especificidade das associações micorrízicas do tipo vesicular-arbuscular em gramíneas e leguminosas forrageiras e no cafeeiro Coffea arabica L.* 1980. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1980.
44. MAGALHÃES, L. M. S.; NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N<sub>2</sub>-fixing *Azospirillum* spp. *Archives of Microbiology*, v. 117, p. 247-252, 1978.
45. MAGALHÃES, F. M. M.; PATRIQUIN, D.; DÖBEREINER, J. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. *Revista Brasileira de Biologia*, Rio de Janeiro, v. 39, p. 587-596, 1979.
46. MOSSE, B.; POWELL, C. LI.; HAYMAN, D. S. Plant growth responses to vesicular-arbuscular mycorrhiza. IX Interactions between V.A. mycorrhiza, rock phosphate and symbiotic nitrogen fixation. *The New Phytologist*, v. 76, n. 2, p. 331-342, 1976.
47. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. *Firewood crops: shrub and tree species for energy production*. Washington: NAS, 1980.
48. NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. *Advances in Agronomy*, v. 29, p. 1-38, 1977.
49. NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J.; LALANDE, R.; KNOWLES, R. Denitrification by N<sub>2</sub>-fixing *Spirillum lipo ferum*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 23, p. 300-305, 1977.
50. NORRIS, D. O. Lime in relation to the nodulation of tropical legumes. In: HALLSWORTH, E. G. *Nutrition of the legumes*. Nova York: Academic Press, 1958.
51. PERES, J. R. R.; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1980.
52. POGGIANI, F.; SIMÕES, J. W.; FILHO, J. M. A. M.; MORAIS, A. N. Utilização de espécies florestais de rápido crescimento na recuperação de áreas degradadas. *Série Técnica IPEF*, Piracicaba, v. 2, n. 4, p. 1-25, 1981.
53. POWELL, C. LI. Mycorrhizas in hill-country soils. II. Effect of several mycorrhizal fungi on clover growth in sterilised soils. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 20, p. 59-62, 1977.
54. POWELL, C. LI. Mycorrhizas in hill country soils. III. Effect of inoculation on clover growth in unsterile soils. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 20, p. 343-348, 1977.

55. POWELL, C. LI. Inoculation of white clover and rye grass seed with mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, v. 83, p. 81-85, 1979.
56. POWELL, C. LI.; GROTERS, M.; METCALFE, D. Mycorrhizal inoculation of a barley crops in the field. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 23, p. 107-109, 1980.
57. RBENCHIK, L. I. *Azotobacter and its use in agriculture*. Washington: National Science Foundation, 1963.
58. SANDERS, F. E.; TINKER, P. B. Mechanism of absorption of phosphate from soil by endogone mycorrhizas. *Nature*, v. 233, p. 278-279, 1971.
59. SMITH, R. L.; SCHANK, S. C.; QUESENBERRY, K. H.; MILAM, J. M.; HUBBELL, D. H. *Research in nitrogen fixation by grasses after inoculation with Spirillum*. Florida: University of Florida, 1977.
60. SUBBARAO, N. S. Response of crops to *Azospirillum* inoculation in India. In: VOSE, P.B.; RUSCHEL, A. P. *Associative N<sub>2</sub> fixation*. Florida: CRC Press, 1981.
61. SWABY, R. J. Biosuperbiological super-phosphate. In: MACLACHLAU, K. D. *Sulphur in Australasian agriculture*. Sydney: Sydney University Press, 1975.
62. TARRAND, J. J.; KRIEG, N. R.; DÖBEREINER, J. A taxonomic study fo the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *The Canadian Journal of Microbiology*, v. 24, p. 967-980, 1978.
63. TIEN, J. M.; GASKINS, M. H.; HUBBELL, D. H.; UMALI-GARCIA, M. Why does inoculation with *Azospirillum brasilense* (*Spirillum lipoferum*) increase yield fo grasses. *Proceedings of the Steenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation*, Madison, 1978.
64. TINKER, P. B. H. Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizas on higher-plants. *Symbiosis*, v. 29, p. 325-349, 1975.
65. TUTIN, T. G. Classification of the legumes. In: HALLSWOTH, E. G. *Nutrition of the legumes*. Nova York: Academic Press, 1958.