

# Fixação de nitrogênio (redução de acetileno) em cupins (Insecta: Isoptera) da Amazônia Central

Rosemary Sylvester-Bradley (\*)

Adelmar Gomes Bandeira (\*\*)

Luiz Antonio de Oliveira (\*)

## Resumo

Vinte e uma espécies de cupins foram coletadas de seus cupinzeiros em áreas de pastagem, floresta secundária e floresta primária, numa fazenda na Amazônia Central no Brasil. A atividade de nitrogenase associada com os cupins foi testada imediatamente pelo método de redução de acetileno. Todas as atividades maiores (acima de 100 nmoles  $C_2H_4$  produzidos/g de peso seco/hora) ocorreram em cupins do gênero *Nasutitermes* coletados na pastagem. *Nasutitermes* é conhecido como o gênero mais comum na área. As taxas de redução de acetileno detectadas em cupins da floresta primária e secundária foram mais baixas que na pastagem; porém, cupins do gênero *Nasutitermes* não foram testados na floresta secundária. A diferença da taxa de redução de acetileno entre os operários e soldados foi pequena. As taxas foram lineares dentro de períodos de três horas de incubação, exceto em dois de nove casos. A fixação de nitrogênio associada com cupins pode ser um fator ecológico importante na Amazônia Central.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de uma floresta tropical úmida requer um considerável "input" de nitrogênio, parte do qual pode ser atribuída à fixação biológica de nitrogênio (Nye & Greenland, 1960). Existem poucas informações de estudos sobre fixação de nitrogênio em florestas tropicais úmidas. Somente a partir do desenvolvimento da técnica de redução de acetileno para estimar fixação de nitrogênio (Hardy *et al.*, 1968) é que tem sido possível efetuar tais experimentos nos trópicos. Resultados positivos foram mencionados por Edmisten (1970), que detectou atividade em epífitas na superfície de folhas na Costa Rica. Norris (1969) encontrou "nodulação abundante" de raízes em solo arenoso na Reserva Ducke, próximo a Manaus, Brasil. No entanto, esta observação não pôde ser verificada em nossas pes-

quisas no mesmo local; resultados negativos foram consistentemente obtidos por Sylvester-Bradley, Podestá e Oliveira (dados não publicados) que testaram raízes, folhas e solo de florestas primárias e secundárias na Amazônia Central pelo método de redução de acetileno. Nódulos não foram encontrados nas raízes de leguminosas na floresta primária.

Cupins formam uma grande proporção da biomassa faunística da Amazônia Central (Fittkau & Klinge, 1973). Tem sido mostrado recentemente que ocorre fixação de nitrogênio no intestino posterior de alguns cupins da Califórnia (Benemann, 1973; Breznak *et al.*, 1973) e na Austrália (French *et al.*, 1976).

O presente trabalho relata os resultados de experimentos destinados a testar a habilidade de redução de acetileno em cupins, numa tentativa de encontrar as fontes de fixação de nitrogênio na região.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A fazenda, na qual os experimentos foram realizados (Fazenda Aruanã) está situada no Km 232 da Rodovia Manaus-Itacoatiara (AM-010). Foram estudadas três áreas dentro da fazenda: pastagem, floresta secundária (capoeira) e floresta primária. A pastagem e a capoeira estavam com seis anos, sendo que o desmatamento de ambas foi feito com moto-serra, e periodicamente a pastagem tem sido limpa com terço. A pastagem contém muitos troncos em decomposição e troncos de árvores, nos quais estava localizada a maioria dos ninhos de cupim dos experimentos. Nunca foi usado fertilizante na fazenda, porém esterco de gado pode ter causado concentrações locais de fertilidade.

(\*) — Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus.

(\*\*) — Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém.

Foram realizados três experimentos, em 28 de outubro, 02 e 29 de novembro de 1977. Cupins sozinhos, cupins com pedaços de seus ninhos ou somente material do ninho foram colocados em frascos de vidro de 7 ml de capacidade, com três repetições. No segundo e terceiro experimentos, as castas dos cupins foram separadas. Os frascos foram fechados firmemente com tampa de rosca contendo septo de borracha. Num experimento preliminar, o ar de alguns dos frascos foi removido com argônio antes da injeção de oxigênio e acetileno. Entretanto, viu-se que, sob estas condições, os cupins morriam, assim em todos os testes subsequentes o acetileno (10% v/v) foi injetado diretamente nos frascos contendo ar. O acetileno foi injetado dentro de uma hora após a coleta dos cupins de seus ninhos. Foram incluídos controles sem cupins e sem acetileno. As amostras de gás foram coletadas após mais ou menos uma hora e injetadas em "Vacutainers" (obtidos na Becton — Dickison Ind. Cirúrgicas S.A., Tomaz Carvalhal, 697, Paraíso — SP — Brasil).

Em alguns casos, as amostras de gás foram coletadas após vários intervalos de tempo. Os frascos contendo cupins e os Vacutainers foram então transportados para Manaus, onde foram medidos o etileno e o acetileno, usando um cromatógrafo de gás Hewlett-Packard com detector de chama de ionização, de coluna de 1 m de comprimento preenchida com Porapak R. O cromatógrafo foi calibrado usando uma série de diluições de um padrão de etileno ("Gás-Can", obtido de Phase Separations Ltd., Deeside Industrial Estate, Queensferry, Clywd, Gales).

Nanomoles de etileno produzido foram calculados da diferença entre a quantidade de etileno nos frascos dos testes e nos controles. Os resultados foram expressos por cupim e por grama de peso seco de cupins.

Os cupins foram classificados em morfo-espécies e depois enviados ao Dr. Renato L. Araújo, do Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, Brasil, que os identificou até gênero. As morfo-espécies de cada gênero foram representadas por letras.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividades de redução de acetileno em cupins coletados na pastagem são mostradas na Tabela 1. Não foi detectada a produção de etileno nos controles sem acetileno, nem no material de ninhos sem a presença de cupins. Pode ser visto que as atividades mais altas (acima de 100 nmoles  $C_2H_4$  produzidos por grama de peso seco por hora) ocorreram em cupins do gênero *Nasutitermes*. Este gênero é o mais comum na área (Bandeira, 1978). Ele pertence à família Termitidae, que é considerada como sendo a família de cupins mais evoluída. Na maioria das espécies desta família não se conhece simbiose específica com protozoários intestinais, e é presumível que bactérias e fungos sejam mais provavelmente os responsáveis pela decomposição da celulose (Honigberg, 1970). Os gêneros de cupins mencionados na literatura como reduzindo mais acetileno pertencem a famílias consideradas como sendo menos evoluídas que Termitidae, nas quais a digestão de madeira é processada por protozoários simbiotes no intestino posterior. Uma espécie de *Nasutitermes* (*N. exitiosus*) foi mencionada por French *et al.* (1976) como reduzindo 40 nmoles de  $C_2H_2/g$  de peso fresco/hora, mas somente após ter sido alimentado com papel de filtro por 24 horas; os cupins alimentados com madeira não reduziram acetileno.

Benemann (1973) e Breznak *et al.* (1973) encontraram atividades mais altas em operários que em soldados de cupins. Entretanto, nossos resultados não mostram nenhuma diferença consistente entre estas duas castas. Em *Nasutitermes* sp C, por exemplo, foram testadas quatro séries de amostras tanto de operários como de soldados e a probabilidade de as duas castas serem diferentes foi abaixo de 0,95 ( $t = 0,76$ ;  $gl = 16$ ).

Breznak *et al.* (1973) relataram um decréscimo de atividade com o tempo. No entanto, nossos resultados (Fig. 1) mostram uma taxa linear exceto em dois de nove casos, onde a diferença envolveu um acréscimo na taxa, não um decréscimo. É possível que, em alguns casos, haja uma mudança de taxa com o tempo que foi ocultado pela variabilidade entre repli-

cações. Somente experimentos posteriores podem verificar estas diferenças entre nossos resultados e os de outros autores.

A Tabela 2 mostra as atividades de redução de acetileno de cupins coletados na capoeira e na floresta primária. Pode ser visto que nenhuma atividade particularmente alta foi observada. Apenas em dois casos as espécies coletadas na floresta também o foram na pastagem (*Armitermes* sp C). Em ambos os casos, a média da atividade foi mais baixa na floresta que na pastagem. Bandeira (1978) coletou 13 espécies de *Nasutitermes* na capoeira; em nossos experimentos, este gênero não foi testado na capoeira, mas foi o que apresentou maior atividade na pastagem. É possível, então, que as atividades detectadas na

capoeira tenham sido subestimadas. Maiores taxas de fixação de nitrogênio podem ser esperadas na pastagem e na capoeira do que na floresta primária, pois há um número maior de cupins nesses dois ambientes (Bandeira, 1978), e esta população crescente precisaria de uma quantidade maior de nitrogênio para sustentá-la.

Um aspecto importante da fixação de nitrogênio associada com cupins seria seu efeito na velocidade de decomposição da madeira que pode ser aumentada com adições de nitrogênio (Aho *et al.*, 1974). Uma atividade de fixação de nitrogênio mais elevada nos cupins poderia possibilitar uma degradação mais rápida, favorecendo a reciclagem de nutrientes no ecossistema.

TABELA 1 — Atividades de redução de acetileno em cupins de Pastagem na Fazenda Aruanã. Os valores são médias ( $\bar{x}$ ) de 3 repetições (exceto onde indicado (\* n = 1; \*\* n = 2)  $\pm$  erro padrão (ep) de nmoles de etileno produzido por g peso seco por hora (nm/g/h). Em parênteses, estão nmoles de etileno produzido/cupim/h (nm/c/h). As amostras de gás para análises foram coletadas entre 0,75 e 2,13 h de incubação com acetileno.

GÊNEROS DE CUPINS	SOMENTE OPERÁRIOS			OPERÁRIOS E SOLDADOS			SOMENTE SOLDADOS		
	nm/g/h		nm/c/h	nm/g/h		nm/c/h	nm/g/h		nm/c/h
	$\bar{x}$	$\pm$	ep	$\bar{x}$	$\pm$	ep	$\bar{x}$	$\pm$	ep
<i>Amitermes</i> sp. A	10,63	$\pm$	1,85 (0,017)	—	—	—	13,45	—	(0,020) *
	24,88	$\pm$	5,20 (0,036)	—	—	—	39,71	$\pm$	1,90 (0,081) **
<i>Grigiotermes</i> sp.	0,00	$\pm$	0,00 (0,000)	—	—	—	—	—	—
	3,98	$\pm$	2,05 (0,005)	0,00	$\pm$	0,00 (0,000)	0,00	$\pm$	0,00 (0,000)
<i>Armitermes</i> sp.	—	—	—	42,75	$\pm$	6,82 (0,053)	—	—	—
<i>Cornitermes</i> sp. A	—	—	—	31,57	$\pm$	1,93 (0,046)	—	—	—
<i>Heterotermes</i> sp.	28,07	$\pm$	2,20 (0,009)	—	—	—	0,00	$\pm$	0,00 (0,000)
<i>Labiotermes</i> sp.	4,71	$\pm$	1,02 (0,009) **	—	—	—	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. A	—	—	—	544,96	$\pm$	60,16 (0,559)	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. A	32,91	$\pm$	—	32,91	$\pm$	19,03 (0,031)	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. C	44,77	$\pm$	11,20 (0,028)	—	—	—	35,51	$\pm$	17,79 (0,022)
	156,00	$\pm$	— (0,056) *	—	—	—	30,20	$\pm$	— (0,011) *
	320,05	$\pm$	180,06 (0,278)	—	—	—	221,34	$\pm$	59,75 (0,129)
	122,16	$\pm$	28,01 (0,125)	—	—	—	26,00	$\pm$	— (0,017) *
<i>Nasutitermes</i> sp. D	—	—	—	253,33	$\pm$	70,58 (0,182)	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. F	89,12	$\pm$	18,30 (0,102)	—	—	—	207,42	$\pm$	29,09 (0,157)
	46,60	$\pm$	13,72 (0,062)	—	—	—	72,47	$\pm$	15,22 (0,059) **
<i>Nasutitermes</i> sp. G	6,04	$\pm$	1,91 (0,026)	—	—	—	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. H	395,15	$\pm$	49,11 (0,237)	—	—	—	—	—	(0,306) *
<i>Neocapritermes</i> sp. A	—	—	—	0,00	$\pm$	0,00 (0,000)	—	—	—

TABELA 2 — Atividades de redução de acetileno em cupins coletados em capoeira e floresta primária na Fazenda Aruanã. Os valores são médias ( $\bar{x}$ ) de 3 replicações (exceto onde indicado (\* n = 1; \*\* n = 2));  $\pm$  o erro padrão (ep) de nanomoles de etileno produzido por g de peso seco/h (nm/g/h). Em parênteses estão nanomoles de etileno produzido por cupim/h (nm/c/h). As amostras de gás para análises foram coletadas entre 0,40 e 2,22 horas de incubação com acetileno.

GÊNEROS DE CUPINS	C A P O E I R A					
	O P E R Á R I O S			S O L D A D O S		
	nm/g/h		nm/c/h	nm/g/h		nm/c/h
	$\bar{x}$	ep	$\bar{x}$	$\bar{x}$	ep	$\bar{x}$
<i>Amitermes</i> sp. B	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)
<i>Cornitermes</i> sp. B	7,22	—	(0,012) *	5,24 $\pm$	1,96	(0,013) **
<i>Neocapritermes</i> sp. B	18,22 $\pm$	9,09	(0,020)	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)
<i>Spinitermes</i> sp.	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)
<i>Syntermes</i> sp.	18,00 $\pm$	7,01	(0,063)	1,46 $\pm$	1,47	(0,012)

GÊNEROS DE CUPINS	F L O R E S T A P R I M Á R I A					
	O P E R Á R I O S			S O L D A D O S		
	nm/g/h		nm/c/h	nm/g/h		nm/c/h
	$\bar{x}$	ep	$\bar{x}$	$\bar{x}$	ep	$\bar{x}$
<i>Armitermes</i> sp.	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)
<i>Constrictotermes</i> sp.	3,83 $\pm$	3,84	(0,002)	—	—	—
<i>Nasutitermes</i> sp. C	16,00 $\pm$	8,07	(0,019)	11,58 $\pm$	5,99	(0,005)
<i>Termes</i> sp.	20,36 $\pm$	12,34	(0,007)	0,00 $\pm$	0,00	(0,000)

Outra importância seria na nutrição dos cupins. A taxa mais elevada de redução de acetileno detectada foi 544,95 nmoles/g de peso seco/hora (0,559 nmoles/cupim/hora) em *Nasutitermes* sp A (Tabela 1). Assumindo uma relação de peso seco para peso úmido de 1:10, esta quantidade seria equivalente a 54,5 nmoles/g de peso úmido/hora (366,24 ug N/g de peso úmido/mês, usando uma taxa de conversão de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> : N<sub>2</sub> igual a 3:1). Benemann (1973), baseado numa quantidade de 17,5 mg de nitrogênio por grama de peso de *Kaloterme*s (Hungate, 1941), calculou que demoraria 30 meses para dobrar o conteúdo de nitrogênio dos cupins, mesmo à maior taxa observada (566 ug N/g peso úmido/mês). Porém, usando dados do conteúdo de nitrogênio da madeira do mesmo trabalho (Hungate, 1941), e da taxa do seu consumo (Lee & Wood, 1971) demora-

riam 110 meses para os cupins conseguirem a mesma quantidade de nitrogênio desta madeira, mesmo que todo o nitrogênio da madeira fosse aproveitado. Deve haver, então, uma outra fonte de nitrogênio para os cupins. De fato Moore (1969) considerou o papel do canibalismo na ciclagem de nitrogênio nos cupinzeiros. À medida que os cupins vão morrendo, são devorados no próprio cupinzeiro, diminuindo assim, a necessidade de nitrogênio, que poderia ser completada pelas taxas de fixação detectadas. Isto viria explicar a baixa fixação de nitrogênio quando comparada com as necessidades reais do cupim.

Além disso, Breznak (1975) detectou atividades de redução de acetileno em ninfas jovens como sendo 317 vezes maior do que em ninfas mais velhas. Isto sugere que nos cupinzeiros em formação, devido ao seu crescimento

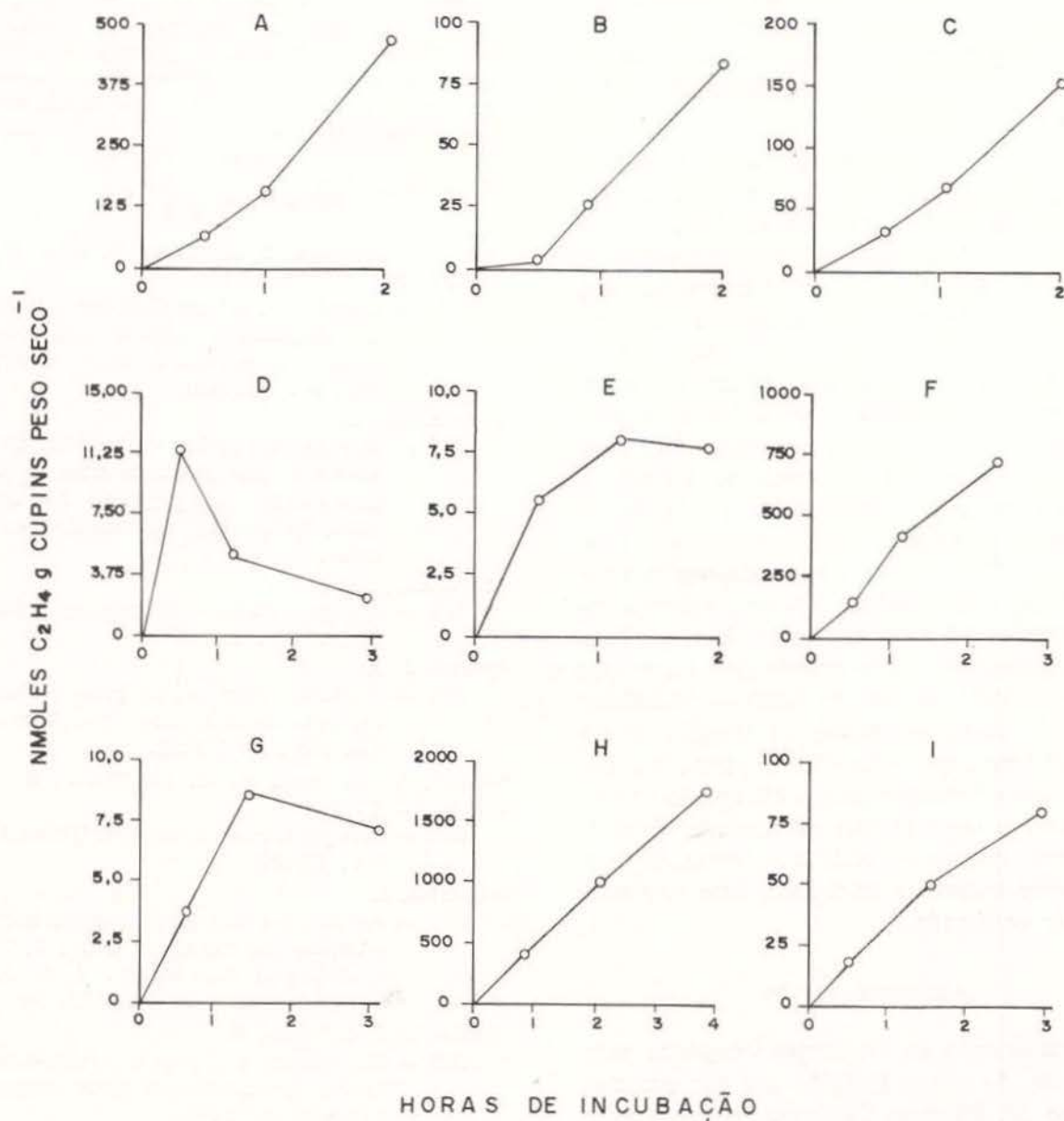


Fig. 1 — Nanomoles de etileno produzido/g cupim (somente operários) em três intervalos de tempo. Os valores (médias de 3 replicações, exceto G com 2 replicações) foram corrigidos para vazamento, usando-se altura dos picos de acetileno como padrão interno. Os valores de F são das análises de variância das 3 taxas em cada gráfico de teste bicaudal. \* = significante a 90%.

A: *Nasutitermes* sp. C (F = 6,90\*); B: *Amitermes* sp. A (F = 6,51\*); C: *Nasutitermes* sp. F (F = 0,35); D: *Anoplotermes* sp. A (F = 4,97); E: *Nasutitermes* sp. G (F = 4,87); F: *Nasutitermes* sp. C (F = 0,17); G: *Labiotermes* sp. A (F = 4,86); H: *Nasutitermes* sp. H (F = 0,30); I: *Heterotermes* sp. A (F = 0,78).

e à pequena proporção de cupins velhos, deve haver uma atividade de fixação de nitrogênio muito maior para suprir as necessidades do cupinzeiro. Sugere também uma subestimação das taxas de redução de acetileno verificadas no nosso trabalho, e as dos outros autores, onde não foram testadas as atividades destas formas jovens.

A fixação de nitrogênio associada com cupins pode também ser importante como uma fonte de nitrogênio para o ecossistema. Nye & Greenland (1960) estimaram que são necessários 100 kg de nitrogênio por hectare por ano a serem fixados por meio de fixação de nitrogênio para a regeneração da floresta. Para calcular a taxa de fixação de nitrogênio associada com os cupins que pode fornecer esta quantidade de nitrogênio, é necessário saber o número de cupins por hectare. Usando a mesma taxa de conversão de  $N_2 : C_2H_2$  (1:3), para fixar 100 kg N/ha/ano, e assumindo uma média de 0,5 nmoles  $C_2H_2$  reduzido/cupim/hora (= 4,67 ng N/cupim/hora) deveria haver aproximadamente  $2,5 \times 10^9$  cupins por hectare. Isto é uma quantidade muito grande de cupins: Lee & Wood (1971) estimaram 1.000 — 10.000/m<sup>2</sup> na África. Torna-se necessário concluir então ser improvável que a fixação de nitrogênio em cupins possa fornecer todo o nitrogênio necessário para a regeneração da floresta. Porém, uma certa proporção pode ser fornecida; somente com trabalhos adicionais, esta sugestão pode ser verificada.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Sr. Sérgio Vergueiro pela permissão do nosso trabalho em sua propriedade, ao Sr. Nilamon Camargo Penteadado pela hospitalidade na fazenda e ao Sr. Valmique Silva de Souza pela assistência no laboratório e no campo.

#### SUMMARY

Twenty one species of termites were collected from their nests in areas of pasture, secondary forest and primary forest at a cattle ranch in Central Amazônia, Brazil. They were tested immediately for nitrogenase (acetylene reducing) activity. The highest activities (more than 100 nmoles  $C_2H_4$  produced/g dry weight/hour) all occurred in termites of the genus *Nasutitermes* collected in the pasture. *Nasutitermes* is known to

be the commonest genus in the area. The rates of acetylene reduction detected in termites from primary and secondary forest were lower than in the pasture; *Nasutitermes* was not tested in the secondary forest however. The difference in rate of acetylene reduction between workers and soldiers was small. Rates were linear within three hour incubation periods except in two out of nine cases. Nitrogen fixation associated with termites may be an important ecological factor in Central Amazônia.

#### BIBLIOGRAFIA CITADA

- AHO, P. E.; SEIDLER, R. J.; EVANS, H. J. & RAJU, P. N.  
1974 — Distribution, enumeration, and identification of nitrogenfixing bacteria associated with decay in living white fir trees. *Phytopathology*, 64: 1413-1420.
- BANDEIRA, A. G.  
1978 — *Ecologia de Térmitas da Amazônia Central: efeitos do desmatamento sobre as populações e fixação de nitrogênio*. Tese de Mestrado, INPA/Fundação Universidade do Amazonas.
- BENEMANN, J. R.  
1973 — Nitrogen fixation in termites. *Science*, Wash., 181: 164-165.
- BREZNAK, J. A.  
1975 — Symbiotic relationships between termites and their intestinal microbiota. *Symp. Soc Exp. Biol.*, 29: 559-580.
- BREZNAK, J. A.; BRILL, W. J.; MERTINS, J. W. & COPPEL, H. C.  
1973 — Nitrogen fixation in termites. *Nature, Lond.*, 244: 577-580.
- EDMINSTEN, J.  
1970 — Preliminary studies of the nitrogen budget of a tropical rain forest. In: Odum, H. T. ed. — *A Tropical Rain Forest*, U. S. Atomic Energy Commission Book 3: H211-215.
- FITTKAU, E. J. & KLINGE, H.  
1973 — On biomass and trophic structure of the Central Amazonian rain forest ecosystem. *Biotropica*, 5(1): 2-14.
- FRENCH, J. R. J.; TURNER, G. L. & BRADBURY, J. F.  
1976 — Nitrogen fixation by bacteria from the hind-gut of termites. *J. gen. Microbiol.*, 95: 202-206.
- HARDY, R. W.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K. & BURNS, R. C.  
1968 — The acetylene-ethylene assay for  $N_2$  fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207.
- HONIGBERG, B. M.  
1970 — Protozoa associated with termites and their role in digestion. In: Krishna, K. & Weesner, F. M. — *Biology of Termites*. New York, Academic Press., vol. 2: 1-36.

HUNGATE, R. E.

1941 — Experiments on the nitrogen economy of termites. *Ann. Entomol. Soc. Amer.*, 34 : 467-489.

LEE K. E. & WOOD, T. G.

1971 — **Termites and Soils** New York, Academic Press. 251 p.

MOORE, B. P.

1969 — Biochemical studies in termites. In: **Biology of Termites** (K. Krishna & F. M. Weesner, eds. Vol. 1: 407-432. Acad. Press N. Y. & London.

NORRIS, D. O.

1969 — Observations on the nodulation of rainforest leguminous species in Amazonia and Guyana. *Trop. Agriculture, Trin.*, 46 : 145-151.

NYE, P. H. & GREENLAND, D. J.

1960 — The soil under shifting cultivation. *Commonwealth Agricultural Bureau Soil Tech. Communication*, 51.

(Aceito para publicação em 01/07/78)