

# METODOLOGIA PARA MEDIÇÃO DA FIXAÇÃO DE N<sub>2</sub> EM RAÍZES DE GRAMÍNEAS FORRAGEIRAS TROPICAIS<sup>1</sup>

SEBASTIÃO M. SOUTO e JOHANNA DÖBEREINER<sup>2</sup>

**RESUMO** - Foram desenvolvidos, em laboratório, sete experimentos com o fim de desenvolver nova técnica de estudar a atividade nitrogenase (redução de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) de raízes destacadas de várias gramíneas tropicais. Foram comparados o efeito da duração da incubação, pO<sub>2</sub>, multiplicação de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, períodos de amostragem e tipos de amostras. O novo método consiste em medir a redução C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> em raízes destacadas, com 10 cm de parte aérea e incubadas em frascos de três litros cheios de água, substituindo-se, depois, a água por N<sub>2</sub>, 3% de O<sub>2</sub> e 12% de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>. Nesses frascos, podem ser medidas taxas de redução de acetileno com 6 a 8 horas de incubação. Esta nova técnica, desenvolvida para estudar a atividade nitrogenase, subestimou, em 4 das 5 gramíneas, aquela encontrada para o sistema solo-planta intactos; contudo, as duas técnicas se correlacionaram significativamente (r = 0,91\*\*).

**Termos para indexação:** nitrogenase, duração de incubação, bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>.

## METHODOLOGY FOR MEASURING N<sub>2</sub> FIXATION IN DETACHED ROOTS OF TROPICAL FORAGE GRASSES

**ABSTRACT** - Seven laboratory experiments were carried out to develop a new technique for the study of the nitrogenase activity (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) of detached roots of several tropical grasses. The effect of duration of incubation, pO<sub>2</sub>, multiplication of N<sub>2</sub>-fixing bacteria, type and periods of sampling were compared. The new method consists of harvesting pieces of roots attached to 10 cm shoots into 3 litres flask full of water, than replacing the water with N<sub>2</sub>, 3% O<sub>2</sub> and 12% C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, incubating at room temperature and determining C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction rates between 6 and 8 h. The new methodology developed to study nitrogenase activity in 4 of the 5 grasses underestimated that obtained in intact soil-plant systems, but the techniques were significantly correlated with each other (r = 0,91\*\*).

**Index terms:** nitrogenase, duration of incubation, N<sub>2</sub> fixing bacteria.

## INTRODUÇÃO

O sistema intacto solo-planta parece ser o mais seguro quando se deseja estimar a fixação de N<sub>2</sub> em gramíneas através do método de redução do C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, apesar de existirem algumas restrições em relação a este tipo de metodologia (Souto 1982).

Por outro lado, o sistema de raízes extraídas de gramíneas apresenta duas limitações básicas quando usado para medir a redução de acetileno: a presença do "lag", no início da fase de pré-incubação, e a multiplicação de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico nos tempos de incubação mais prolongados.

Segundo Döbereiner (1977b), entre as várias hipóteses para explicar o "lag" estão: 1) a inativação da nitrogenase pelo oxigênio; 2) o distúrbio do metabolismo de N na raiz com possível acumu-

lação de NO<sub>2</sub> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>; 3) a perda de CO<sub>2</sub> do sistema.

Argumentos em favor de influência da multiplicação de bactérias, em um período prolongado de pré-incubação, já foram discutidos por muitos autores (Day et al. 1977, Okon et al. 1977b, Berkum 1977, Barber et al. 1978). Entretanto, há outros contra esta hipótese, pois nem a liberação de ácidos orgânicos (Duthion 1976, Baldani et al. 1978), nem condições para tal (Abrantes et al. 1975a, Döbereiner 1977a) acontecem durante a pré-incubação prolongada, portanto, a multiplicação de *Azospirillum*, como observado por Okon et al. (1977b), não devia ser uma consequência da liberação do substrato.

Geralmente, a taxa de redução de acetileno no sistema tradicional de raízes extraídas (Abrantes et al. 1975b) tem subestimado aquela encontrada para o sistema intacto solo e gramínea (Döbereiner et al. 1972, Döbereiner & Day 1975, Abrantes et al. 1975a). Apesar disso, em gramíneas forrageiras e cereais de grãos pequenos, foram encontradas correlações estatisticamente significativas entre estes dois métodos (Döbereiner 1977a, Nery et al.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 8 de março de 1984.

Parte da tese apresentada, pelo primeiro autor, à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, obtenção do grau de Doutorado em Agronomia.

<sup>2</sup> Eng<sup>o</sup> - Agr<sup>o</sup>, Dr., EMBRAPA, Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo, km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

1977, Witty 1977, Boddey et al. 1978, Patriquin & Denike 1978).

Devido à importância dos fatos citados na metodologia de determinação de redução de acetileno com raiz extraída de gramíneas forrageiras, objetivou-se com a presente pesquisa estudar os efeitos dos tempos de incubação, concentrações de  $O_2$ , multiplicação de bactérias diazotróficas, períodos de amostragens e tipos de amostras, na avaliação da atividade da nitrogenase pelo método de redução de  $C_2H_2$ , através de um novo sistema de raízes extraídas de gramíneas forrageiras tropicais.

### MATERIAL E MÉTODOS

Foi desenvolvida uma série de sete experimentos com a finalidade de ajustar, a um novo sistema de raízes extraídas, a metodologia de determinação da redução de acetileno. Este novo sistema consiste de raízes com 10 cm da parte aérea da planta. Nestes experimentos usaram-se plantas colhidas no campo, no estádio vegetativo (verão de 1979), com bom desenvolvimento, provenientes de um solo Podzólico Vermelho-Amarelo em condições naturais.

#### Experimento 1 - Efeito de tempo de incubação, com acetileno e oxigênio

A finalidade deste experimento foi confirmar o comprimento da fase latente ("lag") e determinar o início de uma taxa linear usando-se sistema radicular inteiro em vez de raízes cortadas, usadas em estudos anteriores (Döbereiner et al. 1972, Abrantes et al. 1975a).

Foram usadas as seguintes gramíneas (tratamentos): jaraguá (*Hyparrhenia rufa* cv. Deodoro), pangola (*Digitaria decumbens* cv. Taiwan A-21), transvala (*Digitaria decumbens* cv. Tranvala UF-547), napier (*Pennisetum purpureum* cv. Napier) e cameron (*Pennisetum purpureum* cv. Cameron) com quatro repetições.

Neste novo sistema de raízes extraídas, plantas inteiras foram retiradas do campo e imediatamente tiveram seu sistema radicular mergulhado em um balde com água deionizada. Logo após, retirou-se uma amostra do sistema radicular com 10 cm de parte aérea. As amostras foram colocadas em frascos de 3 litros com água deionizada. Em seguida, no laboratório, a água mais o ar do frasco foram trocados por  $N_2$  contendo 0,25% de  $O_2$ , e os frascos fechados hermeticamente com "suba-seals". Injetaram-se 12% (v/v) de  $C_2H_2$  e 3% (v/v) de  $O_2$ , e fez-se a incubação numa sala com temperatura controlada em 32°C. De duas em duas horas, a partir do tempo de injeção do  $C_2H_2$ , até completar 24 horas de incubação, determinou-se a quantidade de  $C_2H_4$  produzida. O etileno produzido foi avaliado injetando-se 0,5 ml da mistura de gases num cromatógrafo de gás Perkin Elmer (F-11) com detetor de ionização de chama de hidrogênio, equipado com co-

luna Poropak N (100 -120 mesh), de 50 cm de comprimento por 0,32 cm de diâmetro. A coluna foi operada isotermicamente a 40°C, tendo nitrogênio como gás de arraste, com fluxo de 30 ml/min. Os tempos de retenção foram, aproximadamente, de 24 e 32 segundos para o  $C_2H_4$  e  $C_2H_2$ , respectivamente. O padrão de etileno a 110 vpm, balanceado com  $N_2$  (mistura especial de White Martins), foi usado para calibrar os instrumentos durante todo o período experimental. Com cada série de amostras foram analisadas testemunhas contendo 12% de  $C_2H_2$  em ar num vidro vazio, para avaliar a impureza de  $C_2H_4$  presente no acetileno usado.

#### Experimento 2 - Efeito de concentrações de oxigênio

A finalidade deste experimento foi determinar as concentrações ótimas de  $O_2$  na expressão da atividade da nitrogenase no novo sistema de raízes extraídas. Os tratamentos foram cinco níveis de  $O_2$  (1, 2, 3, 4 e 5%) e foram usadas três repetições.

Usaram-se as mesmas espécies do experimento anterior e outras representativas das pastagens brasileiras, como: gordura (*Melinis minutiflora*), colônia (*Panicum maximum*) e *Brachiaria ruziziensis* cv. C.P.I. 30.623.

A coleta, o preparo das amostras e as determinações da atividade da nitrogenase foram feitos como no experimento anterior. Mudaram apenas as concentrações de  $O_2$ , conforme os tratamentos acima. O etileno produzido foi determinado com seis e oito horas de incubação, pois foram os tempos que deram taxas lineares no primeiro experimento.

#### Experimento 3 - Efeitos dos tempos de incubação diferentes com oxigênio e/ou acetileno

O objetivo deste experimento foi o de verificar se a fase latente pode ser reduzida pela pré-incubação sem  $O_2$  ou  $C_2H_2$  nos frascos. Os tratamentos com três repetições fora os seguintes:

- A)  $O_2$  no início de incubação +  $C_2H_2$  cinco horas após;
- B)  $O_2$  +  $C_2H_2$  no início;
- C)  $O_2$  +  $C_2H_2$  cinco horas após;
- D)  $C_2H_2$  no início +  $O_2$  cinco horas após.

Neste experimento usou-se a cultivar Napier (*Pennisetum purpureum*). A coleta, o preparo da amostra e a determinação da atividade da nitrogenase foram feitos como no primeiro experimento, mudando apenas a hora de injetar o  $O_2$  (3%, v/v) e  $C_2H_2$  (12%, v/v), conforme os tratamentos. O etileno foi determinado com seis e oito horas de incubação.

#### Experimento 4 - Multiplicação de bactérias fixadoras de $N_2$

A finalidade deste experimento foi estudar o possível efeito da multiplicação de bactérias na atividade da nitrogenase, com quinze horas (sistema tradicional) e oito horas (novo sistema) de incubação. Para isso, fez-se simultaneamente, a determinação da atividade da nitrogenase e do número de bactérias fixadoras de  $N_2$ , na mesma amostra de raiz extraída, nos tempos de quatro, oito e

quinte horas, em cinco gramíneas forrageiras, as mesmas usadas no primeiro experimento, e três repetições.

A coleta, o preparo da amostra e a determinação da atividade da nitrogenase foram feitos como no primeiro experimento; o etileno produzido foi determinado nos tempos de incubação de quatro, oito e quinze horas, calculando-se a taxa por hora nos intervalos 0-4, 4-8 e 8-15 horas.

Imediatamente após completar cada tempo de incubação, foi medido o etileno produzido e os frascos foram abertos, sendo as raízes separadas da parte aérea. As raízes foram lavadas com água esterilizada, delas se tomando 10 g. Estas foram cortadas em pedaços pequenos e macezadas em solução de sacarose previamente esterilizada, completando-se o volume para 100 ml com a mesma solução de sacarose. Aliquotas de 1 ml dessa solução foram diluídas consecutivamente em tubos contendo 9 ml da solução 4% de sacarose, até a concentração de  $10^{-8}$ . De cada tubo de diluição, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para três frascos (10 ml) contendo 5 ml de meio NFb semi-sólido modificado (Baldani & Döbereiner 1981). Este meio teve a seguinte composição para 1.000 ml: 5 g de ac. málico; 0,5 g  $K_2HPO_4$ ; 0,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,1 g NaCl; 0,02 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 2 ml sol. de micronutrientes; 2 ml sol. 0,5% de azul de bromotimol em sol. 0,2 N de KOH; 4 ml FeEDTA (1,64%); 1 ml sol. de vitaminas; 4 g KOH; 1,75 g ágar. A solução de micronutrientes continha em 200 ml: 0,2 g  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0,235 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$ ; 0,28 g  $H_3BO_3$ ; 0,008 g  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ; 0,024 g  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ . A solução de vitaminas continha em 100 ml: 10 mg biotina; 20 mg piridoxina. No final, cada frasco (10 ml) com meio NFb continha duas fontes de C, ou seja, 5 g/l de malato e 0,8 g/l de sacarose, esta última oriunda da solução de sacarose usada nas diluições.

Os frascos foram colocados para incubar, durante oito dias, em uma sala com temperatura controlada a 32°C. Durante este período, os frascos em que havia crescimento de bactérias fixadoras de  $N_2$ , foram fechados com "suba-seals", e foram injetados 12% de  $C_2H_2$ . Após incubação durante uma hora em ambiente com temperatura controlada a 32°C, o etileno produzido foi avaliado como no primeiro experimento.

Uma película esbranquiçada e densa na superfície do frasco dava indicação da presença dominante de *Azospirillum brasiliense* e *A. lipoferum*.

Entretanto, apareceram também outras bactérias que formaram uma película menos densa, localizada no meio do frasco, que também produziu  $C_2H_4$ . Esta bactéria foi recentemente identificada como nova espécie de *Azospirillum* (Magalhães et al. Prelo). Contudo, em ambos os casos, as diluições só foram consideradas positivas quando os valores de  $C_2H_4$  produzidos foram cinco vezes maiores do que os encontrados para o controle (frasco só com 12% de  $C_2H_2$ ). As contagens do número de bactérias foram feitas pelo método N.M.P. e para isso usou-se a tabela de MacCrady.

#### Experimento 5 - Períodos de amostragem

Desenvolveu-se este experimento com a finalidade de determinar o período adequado do dia para amostragem, durante duas épocas do ano. Para isso, verificaram-se as taxas de atividade da nitrogenase em coletas durante dois períodos do dia, manhã (7:00 h) e tarde (13:00 h), em duas épocas do ano, verão e inverno, com cinco gramíneas forrageiras. Neste experimento usaram-se as mesmas espécies do primeiro experimento. Foram usadas três repetições.

A coleta, o preparo da amostra e a medição da atividade da nitrogenase processaram-se como no primeiro experimento, exceto no tocante à determinação da produção de etileno que foi feita com seis e oito horas de incubação.

#### Experimento 6 - Tipos de amostras

Este experimento teve como objetivo estudar a contribuição de diferentes partes da planta na atividade da nitrogenase do novo sistema com raízes extraídas.

Foram colhidas as amostras dos seguintes tratamentos em duas fases: primeira fase (feita com todas as gramíneas)

Gramíneas	Raiz	Raiz + rizoma	Colmo	Colmo + folha
Jaraguá	+	-	-	+
Pangola	+	-	-	+
Transvala	+	-	-	+
Napier	-	+	+	-
Cameron	-	+	+	-

Segunda fase (feita só com 'Napier')

Raiz	Raiz + rizoma	Colmo + rizoma	Colmo + folha
+	+	+	+

A segunda fase foi necessária devido ao confundimento nos resultados obtidos na primeira fase, com o tratamento raiz + rizoma, no caso do napier que apresenta rizomas mais proeminentes.

Os sinais (-) e (+) significaram a ausência e presença dos tratamentos, respectivamente. Foram usadas três e cinco repetições na primeira e segunda fase, respectivamente.

A coleta e a determinação de atividade da nitrogenase foram feitas como no primeiro experimento; o preparo da amostra foi efetuado de acordo com o esquema acima especificado. A produção de etileno foi determinada nos tempos de incubação, seis e oito horas.

#### Experimento 7 - Sistema intacto x novo sistema de raízes extraídas

A finalidade deste experimento foi comparar a atividade da nitrogenase através do sistema intacto com aquela determinada com o uso do novo sistema de raízes extraídas. Para isso mediu-se inicialmente, pelo sistema intacto,

o  $C_2H_4$  produzido e, imediatamente após, fez-se a medição da produção de  $C_2H_4$  pelo novo sistema com raízes extraídas. Foram usadas sete repetições e as espécies descritas no primeiro experimento.

#### Sistema intacto

As cinco gramíneas usadas neste experimento estavam com um mês de rebrota. Foram retiradas intactas do campo, por meio de cilindros de aço (diâmetro e altura, 17 cm), e imediatamente colocadas em sacos de plástico (15 litros) fechados hermeticamente. Em seguida, através de "sub-seals" localizado na superfície, foi injetado  $C_2H_2$  (12%, v/v) mais  $C_3H_8$  (5 ml/saco). A incubação foi feita em sala com temperatura controlada a 32°C. Após seis e oito horas de incubação, foram retiradas amostras (0,5 ml) da mistura de gases do interior do saco, as quais foram injetadas num cromatógrafo de gás com detector de ionização de chama, como no primeiro experimento. A produção de  $C_2H_4$  foi corrigida para o volume certo, assim como suas perdas, através do pico de  $C_3H_8$ , um gás de baixa solubilidade na água e de fácil detecção por cromatografia de gás.

O etileno produzido foi calculado pela equação preconizada por Boddey et al. (1978).

#### Novo sistema de raízes extraídas

Imediatamente após a determinação da atividade da nitrogenase no sistema intacto, o saco de plástico foi aberto e a planta retirada, mergulhando-se o sistema radicular em um balde com água deionizada, sendo o restante do procedimento como no primeiro experimento, exceto quanto aos tempos de incubação para determinação de  $C_2H_4$ , que foram de seis e oito horas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Experimento 1 - Influência do tempo de incubação na atividade da nitrogenase

Os resultados deste experimento são apresentados na Fig. 1. O "lag" antes do início da atividade de nitrogenase situou-se entre quatro e seis horas, seguido por taxas aproximadamente lineares até 10 horas de incubação. Portanto, os valores obtidos com os tempos maiores não devem ter sido reais.

As causas do "lag" têm sido muito discutidas (Eskew & Ting 1971, Patriquin 1978, Berkum 1980, Berkum & Bohlool 1980), Döbereiner (1977b) propôs a inativação da nitrogenase pelo  $O_2$ , o distúrbio do metabolismo de N na raiz com possível acumulação de  $NO_2$  ou  $NH_4^+$  e a perda de  $CO_2$  como possíveis explicações. Neste experimento, em que o "lag" foi reduzido quando com-

parado com o de 8 - 18 horas, que era o normalmente obtido (Rinaudo et al. 1971, Döbereiner et al. 1972, Abrantes et al. 1975b, Baldani et al. 1978, Pereira et al. 1981), é possível que a presença da parte aérea no novo sistema de raízes extraídas esteja envolvida, na remoção de N da raiz ou como fonte de C para a raiz, apesar de as amostras para este experimento terem sido coletadas num solo com baixo nível de N.

Mais recentemente, Berkum & Sloger (1979) e De-Polli et al. (1982) encontraram taxas lineares de atividade da nitrogenase em raízes extraídas e não lavadas, após incubação por duas horas sob ar, sugerindo que o "lag" não foi devido à inativação da nitrogenase pelo  $O_2$ . Isto, no entanto, parece estar em completo desacordo com os conhecimentos básicos adquiridos em relação à sensibilidade do sistema enzimático da nitrogenase ao  $O_2$  (Postgate 1974) e do já conhecido efeito do  $O_2$  em culturas de bactérias fixadoras de  $N_2$  (Döbereiner 1977, 1977b, 1980, Okon et al. 1977a) e na fixação de  $N_2$  em sistemas com raízes (Döbereiner et al. 1972, Abrantes et al. 1975b, Day & Döbereiner 1976). É possível que o  $C_2H_4$  produzido no trabalho de Berkum & Sloger (1979) fosse de origem endógena, visto que estes autores trabalharam com raízes extraídas não lavadas. A produção endógena de  $C_2H_4$  por microrganismos do solo já foi demonstrada por Smith (1976). Porém os controles usados por Berkum & Sloger (1979) foram contra esta hipótese já que a produção 'de novo' de etileno, bem como sua oxidação, foi negligenciável.

Os trabalhos iniciais (Abrantes et al. 1975b) que serviram para definir a metodologia para medir a atividade da nitrogenase de raízes extraídas propuseram uma pré-incubação em  $pO_2$  0,02 atm durante uma noite, por razões de conveniência. Esta pré-incubação muito longa em  $pO_2$  baixo foi criticada (Barber et al. 1978, Okon et al. 1977b), sendo sugerido que, nestas situações, os valores altos encontrados de atividade da nitrogenase podiam ter sido oriundos da multiplicação de bactérias. Por outro lado, Döbereiner (1977b) mostrou que a multiplicação de bactérias fixadoras de  $N_2$ , que se faria às custas de ácidos orgânicos produzidos sob anaerobiose, não aconteceu com o uso da metodologia estabelecido por

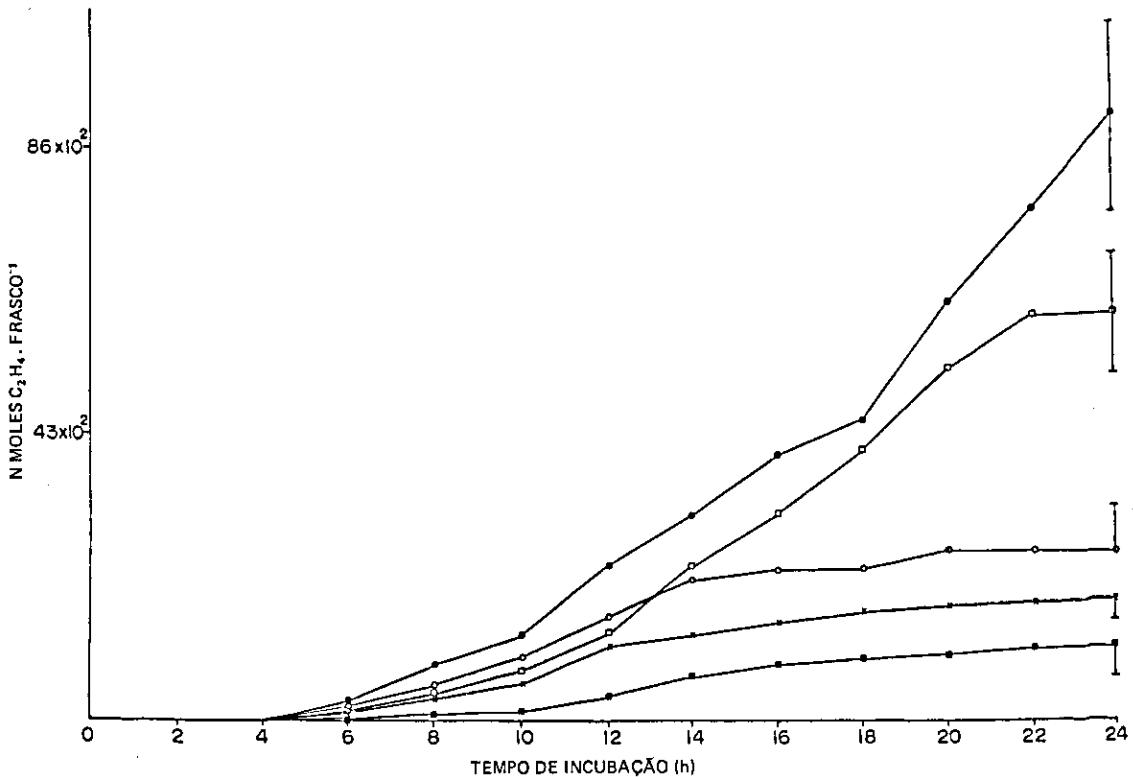


FIG. 1. Efeito do tempo de incubação na atividade da nitrogenase avaliada pelo novo sistema com raízes extraídas de gramíneas forrageiras tropicais: jaraguá (X — X); pangola (O — O); transvala (● — ●); napier (□ — □); e cameron (■ — ■). As barras verticais colocadas no último tempo de incubação representam os desvios padrões das médias. Cada ponto representa média de quatro repetições.

Abrantes et al. (1975b), pois a relação volume de raízes extraídas para volume total do recipiente não deu margens para criar ambiente anaeróbio. Além disso, o que tem sido observado em  $pO_2$  baixo foi um decréscimo de concentrações de ácidos orgânicos, durante períodos mais longos de incubação (Duthion 1976).

Pelas dúvidas geradas em torno do maior tempo de incubação em  $pO_2$  baixo, alguns autores (David & Fay 1977, Berkum & Sloger 1979, Berkum 1980) sugeriram que as atividades da nitrogenase, medidas no início da incubação, deviam representar mais a realidade. Assim, no presente experimento, foi estabelecida a incubação durante um mesmo tempo (seis e oito horas), necessário para obter taxas lineares de atividade da nitrogenase, a qual foi então adotada no novo sistema, de raízes extraídas. Do ponto de vista

prático, este método tem ainda a vantagem de permitir fazer as determinações no mesmo dia da coleta.

#### Experimento 2 - Efeito da concentração de $O_2$ na atividade da nitrogenase

Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 1. De maneira geral, a concentração a 3% (v/v) de  $O_2$  na fase gasosa proporcionou as maiores taxas de atividade da nitrogenase, em cinco dos oito genótipos de plantas estudadas. Os capins pangola, transvala e cameron mostraram que suas taxas máximas de atividade da nitrogenase foram menos dependentes das concentrações baixas de  $O_2$ , pois, nestas gramíneas, poucas diferenças foram notadas entre 1 e 3% de  $O_2$  na fase gasosa. Por outro lado, o napier, a outra cultivar de *Pennisetum purpureum*, mostrou taxas máximas de atividade da nitrogenase só com 3% de  $O_2$ .

TABELA 1. Efeito da concentração de O<sub>2</sub> na atividade da nitrogenase associada a oito gramíneas forrageiras tropicais.

Concentrações de O <sub>2</sub> (%)*	n moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .frasco <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> **				
	1	2	3	4	5
Gramíneas					
Jaraguá	4,3 ± 2,0	44,3 ± 10,0	61,5 ± 30,3	45,6 ± 26,0	58,1 ± 31,6
Pangola	80,8 ± 56,2	70,9 ± 19,3	75,3 ± 38,2	40,9 ± 28,5	30,9 ± 9,6
Transvala	74,8 ± 15,8	87,7 ± 44,5	88,6 ± 8,2	63,6 ± 31,6	38,3 ± 28,2
Napier	116,5 ± 25,9	113,5 ± 7,9	191,8 ± 18,1	56,3 ± 28,8	68,4 ± 26,6
Cameron	113,5 ± 10,9	170,7 ± 39,5	153,1 ± 14,0	86,9 ± 14,2	94,6 ± 35,1
Gordura	12,0 ± 14,5	18,9 ± 3,9	58,5 ± 30,1	44,3 ± 8,9	7,7 ± 5,8
Braquiária	8,2 ± 0,8	15,1 ± 2,2	51,2 ± 24,4	47,7 ± 21,9	29,2 ± 16,3
Colonião	19,8 ± 3,9	56,3 ± 36,7	89,9 ± 57,9	61,9 ± 31,9	50,3 ± 16,9

\* Na fase gasosa

\*\* Taxas de produção de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> calculadas entre seis e oito horas de incubação. Cada valor é média de três repetições. O valor colocado à direita de cada média representa o desvio-padrão

Concentrações acima de 3% de O<sub>2</sub> inibiram a atividade da nitrogenase de todas as cultivares.

Em outros experimentos, as avaliações da atividade da nitrogenase em raízes extraídas têm sido feitas com 1 ou 2% de O<sub>2</sub>, seguindo o esquema estabelecido por Abrantes et al. (1975b) para os capins pangola e transvala, ambos *Digitaria decumbens* e *Paspalum notatum* cv. Batatais. O presente experimento confirmou os resultados de Abrantes et al. (1975a) relativos à concentração ótima de O<sub>2</sub> para o pangola e transvala, pois foram também as duas das três gramíneas no atual experimento cuja atividade da nitrogenase mostrou tolerância às concentrações de O<sub>2</sub> baixas (1 a 3%). No entanto, muitos dos resultados de atividade da nitrogenase com outros sistemas radiculares, nos quais foi usado 1% de O<sub>2</sub>, podem ter subestimado as atividades reais. Assim, algumas gramíneas importantes para as pastagens tropicais, como o jaraguá e o gordura, têm apresentado taxas de atividade da nitrogenase muito baixas (Neves et al. 1976), com o uso de 1% de O<sub>2</sub>. No presente experimento, estas gramíneas mostraram que as taxas máximas de atividade da nitrogenase só foram obtidas com 3% de O<sub>2</sub>.

Os resultados deste experimento indicam que, para a rotina de avaliação da atividade da nitrogenase com as gramíneas estudadas, deve-se usar oxigênio na concentração de 3% (v/v).

#### Experimento 3 - Influência do tempo de incubação do oxigênio e acetileno na atividade da nitrogenase

Os resultados deste experimento são apresentados na Fig. 2.

A injeção de ambos, 3% de O<sub>2</sub> (v/v) e 12% de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> (v/v), no início da incubação, proporcionou uma atividade na primeira determinação, cinco horas após, e uma taxa maior de atividade da nitrogenase. Estes resultados confirmam o "lag" de 4 - 6 horas e reforçaram os resultados do experimento anterior.

A comparação dos tratamentos com O<sub>2</sub> injetado no início da incubação com aqueles em que o O<sub>2</sub> foi injetado cinco horas após, juntamente com o C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>, evidenciou a vantagem do primeiro tratamento, pois o segundo prolongou o "lag" de quatro horas que coincidiu com o tempo necessário para a síntese da nitrogenase (Okon et al. 1977b). O tratamento com acetileno injetado no início da incubação e com o O<sub>2</sub>, cinco horas após, proporcionou a menor taxa de atividade da nitrogenase. Os resultados deste experimento demonstram, mais uma vez, os efeitos do O<sub>2</sub> na amplitude do "lag", já discutidos no primeiro experimento.

As taxas praticamente idênticas de atividade da nitrogenase obtidas com o tratamento de O<sub>2</sub> no início, mas com C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> variável, mostraram que, do ponto de vista prático, o uso de C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> e O<sub>2</sub> no início da incubação é satisfatório e pode ser

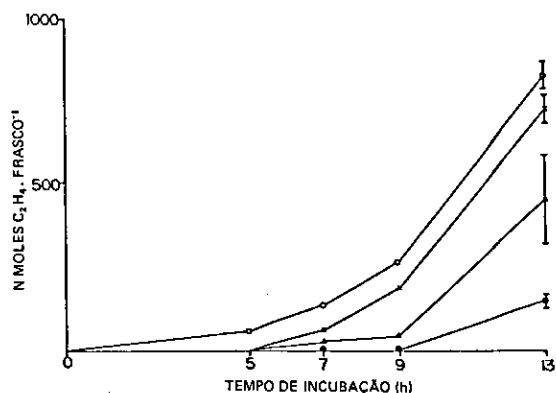


FIG. 2. Efeito do tempo de incubação com  $O_2$  e  $C_2H_2$  na atividade de nitrogenase no novo sistema com raízes extraídas de napier (*Pennisetum purpureum*). Os tempos de incubação variavam de acordo com os seguintes tratamentos:  $O_2$  (no início) +  $C_2H_2$  (cinco horas após) - (X — X);  $O_2$  +  $C_2H_2$  (no início) - (O — O);  $O_2$  +  $C_2H_2$  (cinco horas após) - (● — ●); e  $C_2H_2$  (no início) +  $O_2$  (cinco horas após) ( $\Delta$  —  $\Delta$ ). Cada ponto representa a média de três repetições. As barras verticais no último tempo de incubação representam os desvios padrões das médias.

tomado como rotina no novo sistema com raízes extraídas, pois constitui uma só operação.

#### Experimento 4 - Efeito de multiplicação de bactérias na atividade da nitrogenase

Os resultados deste experimento são vistos na Tabela 2, que mostra a variação do número de bactérias fixadoras de  $N_2$ , dentro e fora de raiz, e das taxas de atividade da nitrogenase, com os tempos de pré-incubação de oito e quinze horas, comparados com o de quatro horas, que não diferenciou do número encontrado para 0 (zero) hora, que foi tomado como valor igual a 1.

Os resultados mostraram que a variação do número de bactérias fixadoras de  $N_2$  na raiz não correspondeu àquela observada para a atividade da nitrogenase, independentemente dos tempos de incubação e das gramíneas estudadas. Assim, os aumentos obtidos nas taxas de atividade da nitrogenase para o napier, cameron e transvala, com a dilatação do tempo de incubação, estiveram aquém dos obtidos no número de bactérias fixadoras de  $N_2$ , contados a partir de raízes maceradas. O con-

trário foi observado em relação ao jaraguá e ao pangola.

São muitos os argumentos convincentes de que a multiplicação de bactérias fixadoras de  $N_2$  nas raízes não é responsável pela expressão de maior taxa de atividade da nitrogenase em raízes extraídas com o tempo de incubação longo em  $pO_2$  baixo (Döbereiner 1977b). As taxas lineares da atividade de nitrogenase obtidas durante a incubação não se assemelham às curvas de crescimento de bactérias (Döbereiner et al. 1972, Abrantes et al. 1975b, Berkum 1980). Observou-se que raízes extraídas de plantas de milho durante o crescimento vegetativo não mostraram atividade de nitrogenase, mesmo após dois dias de pré-incubação sob  $pO_2$  baixo, porém o número de *Azospirillum* em raízes não esterilizadas foi tão alto quanto o verificado durante o estadio reprodutivo, época em que as atividades da nitrogenase foram as mais altas, no decurso de todo o ciclo da planta (Baldani et al. 1978, Scott et al. 1978). Talvez esteja envolvida na expressão da atividade da nitrogenase, entre outros fatores, a localização das bactérias na raiz, pois Baldani et al. (1982) encontraram que o número de *Azospirillum* dentro da raiz de trigo correlacionou com o N total, enquanto o mesmo fato não foi encontrado para o número de *Azospirillum* total na raiz. Com base nestes resultados e em outros (Döbereiner 1977b), pode-se concluir que os mais altos números de bactérias fixadoras de  $N_2$ , externas e internas nas raízes, não refletem necessariamente as mais altas taxas de fixação de  $N_2$ .

#### Experimento 5 - Influência do período de amostragem na atividade da nitrogenase

Os resultados da Tabela 3 mostram que o jaraguá, pangola e transvala apresentaram maior atividade da nitrogenase no verão que no inverno, e que, independentemente da época do ano (inverno ou verão), as taxas de atividade da nitrogenase pouco diferiram entre as amostragens feitas durante o dia (manhã e tarde), exceto no caso do transvala e do cameron no verão, e do cameron no inverno, que apresentaram atividade da nitrogenase maiores nas amostragens feitas na parte da manhã.

Os dois capins napier e cameron (*Pennisetum*

TABELA 2. Efeito do tempo de incubação na variação do número de bactérias fixadoras de  $N_2$  e na atividade da  $N_2$ -ase em raízes extraídas de gramíneas forrageiras tropicais.

Gramíneas	Tempo de incubação* (h)	Nº bactérias.g raiz <sup>-1</sup> **	n moles $C_2H_4$ .g <sup>-1</sup> ***
Jaraguá	4	$6,25 \times 10^5$ ( 1,0X)	5,1 ( 1,0X)
	8	$2,80 \times 10^5$ ( 0,5X)	39,5 ( 7,7X)
	15	$2,80 \times 10^5$ ( 0,5X)	39,5 ( 7,7X)
Pangola	4	$0,35 \times 10^4$ ( 1,0X)	1,4 ( 1,0X)
	8	$0,58 \times 10^4$ ( 1,7X)	3,4 ( 2,4X)
	15	$0,88 \times 10^4$ ( 2,5X)	36,7 (26,2X)
Transvala	4	$2,50 \times 10^4$ ( 1,0X)	3,0 ( 1,0X)
	8	$2,25 \times 10^5$ ( 9,0X)	12,4 ( 4,1X)
	15	$3,50 \times 10^5$ (14,0X)	60,7 (20,2X)
Napier	4	$2,40 \times 10^4$ ( 1,0X)	7,1 ( 1,0X)
	8	$4,75 \times 10^5$ (19,8X)	14,0 ( 1,9X)
	15	$1,01 \times 10^6$ (42,1X)	46,2 ( 6,5X)
Cameron	4	$1,95 \times 10^4$ ( 1,0X)	6,2 ( 1,0X)
	8	$5,50 \times 10^5$ (28,2X)	7,6 ( 1,2X)
	15	$1,45 \times 10^6$ (74,4X)	12,4 ( 2,0X)

\* As raízes das plantas para cada tempo de incubação foram as mesmas usadas na determinação da produção de  $C_2H_4$  e, posteriormente, na contagem do número de bactérias.

\*\* Contagens das bactérias foram feitas pelo método MPN, em vidros contendo meio NFB semi-sólido com malato (5 g/l) mais sacarose (0,8 g/l) e sem N. As diluições só foram consideradas positivas quando os valores de  $C_2H_4$  produzido foram mais que cinco vezes aqueles encontrados para o controle. Cada valor apresentado é média de três repetições. O número colocado entre parênteses à direita de cada média representa o aumento em relação ao tempo quatro horas.

\*\*\* Atividade da nitrogenase no novo sistema com raízes extraídas como Fig. 1. As taxas de produção de  $C_2H_4$  nos tempos de incubação quatro, oito e quinze horas correspondem às calculadas para os intervalos de 0 - 4, 4 - 8 e 8 - 15 horas, respectivamente. Valores apresentados são médias de três repetições. O número entre parênteses à direita de cada média representa o aumento da taxa de produção de  $C_2H_4$  em relação ao tempo de incubação quatro horas, tomado como 1.

TABELA 3. Efeito do período do dia, em duas épocas do ano, na atividade da  $N_2$ -ase no novo sistema com raízes extraídas.

Gramíneas	n moles $C_2H_4$ .frasco <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> *			
	Verão (10 jan/81)		Inverno (15 ago/80)	
	Manhã (7:00 h)	Tarde (13:00 h)	Manhã (7:00 h)	Tarde (13:00 h)
Jaraguá	157,9 ± 6,2	160,1 ± 8,3	31,0 ± 10,6	22,4 ± 3,5
Pangola	77,2 ± 5,4	60,7 ± 7,1	13,3 ± 2,6	18,1 ± 3,8
Transvala	95,7 ± 9,7	47,3 ± 6,3	12,9 ± 1,8	18,9 ± 7,4
Napier	58,6 ± 8,2	35,7 ± 5,6	62,8 ± 39,7	58,1 ± 22,7
Cameron	107,2 ± 10,3	48,8 ± 5,1	108,0 ± 36,2	43,0 ± 6,9

\* Taxas de produção de  $C_2H_4$  entre seis e oito horas de incubação. Os dados apresentados são médias de três repetições. O valor colocado à direita de cada média representa o seu desvio-padrão.



*purpureum*) apresentaram a mesma atividade no verão ou inverno.

Apesar de não ter sido o objetivo deste experimento comparar o comportamento dos genótipos das plantas nas diferentes épocas do ano, pois constituiu uma das finalidades de outro experimento (Souto & Döbereiner Prelo), os resultados com cameron, capim selecionado como uma das melhores forrageiras para nossa região (Souto 1978), foram de real importância prática, pois mostraram uma fixação de  $N_2$ , no período crítico de produtividade da pastagem, similar à obtida no período das águas, período em que, normalmente, as raízes de outras cultivares de *Pennisetum purpureum* têm mostrado maior fixação de  $N_2$  (Döbereiner & Day 1975, Neves et al. 1976).

Os resultados comparativos das taxas de atividade da nitrogenase entre as amostragens feitas pela manhã e à tarde, no caso de cameron e transvala no verão, e cameron no inverno, sugerem a possibilidade de subestimar os resultados da atividade da nitrogenase com raízes extraídas, se cuidados não forem tomados antes para determinar o melhor período de amostragem durante o dia. Contudo, a consistência e as maiores taxas de atividade da nitrogenase obtidas nas amostragens feitas, na parte da manhã, em raízes extraídas das cinco gramíneas forrageiras, sugeriram também que as amostragens fossem feitas durante a parte da manhã.

#### Experimento 6 - Efeito do tipo de amostras na atividade de nitrogenase

Os resultados deste experimento são mostrados nas Tabelas 4 e 5. Os da Tabela 4 evidenciam a importância das raízes como sítios de fixação de

fixação de  $N_2$  quando comparados com outras partes de planta, como já foi demonstrado com  $^{15}N_2$  com pangola, tranvala e *Paspalum* cv. Batatais (De-Polli et al. 1977). Além disso, Boyle & Patriquin (s.n.t.) verificaram que, nas raízes de *Spartina alterniflora*, existe um grande pool de C, o qual tampona flutuações no suprimento de fotossintatos, similar ao observado em algumas leguminosas (Eckart & Raguse 1980).

Foi necessário separar os resultados do cam-pim-napier, que apresenta sistema radicular com rizomas mais proeminentes (Tabela 5). Foi marcante, novamente, a contribuição da raiz na taxa de atividade da nitrogenase em napier, e se poderia esperar que o papel do colmo neste novo sistema de raízes extraídas, seja de remoção de N ou fonte de C, como foi discutido no experimento inicial, pois a contribuição do colmo como sítio de fixação de  $N_2$  foi nulo. Por outro lado, Nascimento et al. (1980) mostraram valores mais altos de carboidratos solúveis em etanol na base do colmo do que nas raízes.

#### Experimento 7 - Correlação entre atividade da nitrogenase determinada no sistema intacto e no novo sistema de raízes extraídas

Os resultados deste experimento são apresentados na Tabela 6 e Fig. 3.

As correlações altamente significativas (Fig. 3) entre os dois sistemas de avaliação confirmam a validade de metodologia.

A interação significativa gramínea x sistema (Tabela 6) mostra que as taxas de atividade da nitrogenase no novo sistema de raízes extraídas subestimaram em torno de 80% aquelas encontradas com o sistema intacto, para todas as gramíneas,

TABELA 4. Efeito de diferentes partes da planta na atividade da  $N_2$ -ase.

Gramíneas	Raízes	n moles $C_2H_4$ .frasco <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> *		Colmo + folhas
		Raízes + rizomas	Colmo	
Jaraguá	36,1 ± 13,9	-	-	6,5 ± 2,2
Pangola	18,1 ± 11,6	-	-	0
Transvala	21,9 ± 2,8	-	-	0
Napier	-	81,7 ± 13,8	0	-
Cameron	-	111,8 ± 29,2	0	-

\* Taxas de produção de  $C_2H_4$  calculados entre seis e oito horas de incubação. Os dados apresentados são média de três repetições. O valor colocado à direita de cada média representa o seu desvio-padrão.

exceto para o jaraguá no qual foram praticamente as mesmas. Com o sistema *Paspalum-Azotobacter* encontrou-se uma subestimativa de 40% (Döbereiner et al. 1972, Döbereiner & Day 1975). Abrante et al. (1975b) acharam em raízes pré-incubadas de *Digitaria* uma subestimativa média de 80% com

valores de atividade da nitrogenase de, no máximo, 50% do sistema intacto. Assim, a baixa atividade de nitrogenase encontrada com raízes extraídas parece representar apenas a atividade residual, mas que pode dar uma razoável indicação do número e tamanho dos sítios ativos bem como de quantidade de C disponível como substrato, já que os dados foram correlacionados com as atividades de sistemas intactos.

TABELA 5. Efeito das diferentes partes da planta do napier na atividade da  $N_2$ -ase.

Partes da planta	n moles $C_2H_4$ .frasco <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup> *
Raiz + rizoma	39,5 ± 14,4
Como + rizoma	9,5 ± 1,6
Rizoma	3,9 ± 0,4
Raiz	42,1 ± 15,0

\* Taxas de produção de  $C_2H_4$  calculadas entre seis e oito horas de incubação. Os dados apresentados são médias de cinco repetições. O valor colocado à direita de cada média representa o seu desvio-padrão.

Resultados em que houve uma superestimativa da taxa de atividade da nitrogenase do sistema intacto através de raízes extraídas só foram encontrados para o sorgo e milho (Tjepkema & Berkum 1977), o que fica sem explicação convincente até o momento (Döbereiner 1977b). No caso do jaraguá, no presente experimento, em que não se observaram diferenças entre as atividades da nitrogenase feitas pelos dois sistemas, raízes extraídas e sistema intacto, é possível que as bactérias fixadoras de  $N_2$  estejam localizadas mais internamen-

TABELA 6. Atividade da nitrogenase de gramíneas forrageiras em sistema intacto e novo sistema de raízes extraídas\*.

Gramíneas	n moles $C_2H_4$ .cilindro <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup>	n moles $C_2H_4$ .frasco <sup>-1</sup> . h <sup>-1</sup>	a/b
	a. Sistema intacto	b. Raízes extraídas	
Jaraguá	176	168	1.05
Pangola	291	59	4.93
Transvala	421	113	3.73
Napier	307	38	8.08
Cameron	249	64	3.89
Fontes de variação	F**		
Gramíneas (G)	0,55 <sup>ns</sup>		
Sistema (S)	15,64**		
G x S	2,93*		
CV (%)	32,8		

\* Atividade de  $N_2$ -ase no sistema intacto: As cinco gramíneas forrageiras na rebrota com um mês de idade foram retiradas intactas com solo, em cilindros de aço ( $\theta = 17$  cm,  $h = 17$  cm), e imediatamente colocadas em sacos de plástico tipo saran, fechados hermeticamente; através de "sub-seals" localizados na superfície, foi injetado  $C_2H_2$  (12% v/v) mais  $C_3H_8$  (5 ml/saco); em seguida, colocadas para incubar em sala com temperatura controlada de 32°C. Após seis e oito horas de incubação, foram retiradas amostras (0,5 cc) de mistura de gases no interior e injetadas em cromatógrafo de gás com detector de ionização de chama donde se obteve a produção de  $C_2H_4$  produzido e corrigido para perdas, através do pico de  $C_3H_8$ .

Atividade do novo sistema com raízes extraídas: A planta com solo no cilindro foi retirado do saco de plástico, separado do solo e colocado num recipiente com água deionizada. O restante do procedimento foi como no exp. 1. Taxas de produção de  $C_2H_4$  calculadas entre seis e oito horas de incubação. Os valores apresentados são médias de sete repetições.

\*\* O desdobramento da interação G x S mostrou pelo teste F, ao nível  $p < 0,05$ , que somente o jaraguá teve a atividade de  $N_2$ -ase igual nos dois sistemas testados.

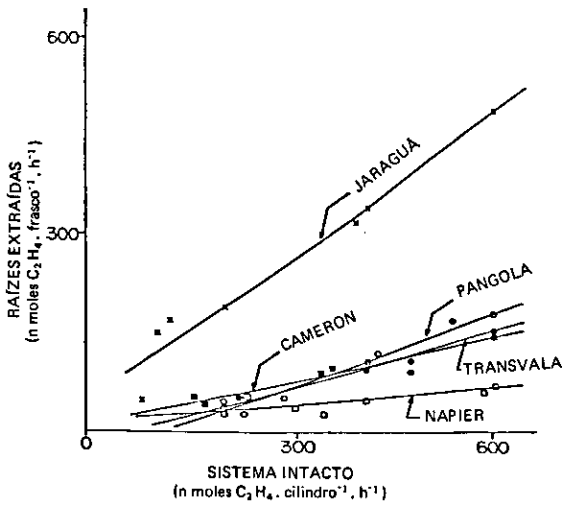


FIG. 3. Regressão e correlação da atividade da nitrogenase medida pelo novo sistema de raízes extraídas sobre aquela obtida com o sistema intacto, em cinco gramíneas forrageiras: jaraguá (X — X); pangola (O — O); transvala (● — ●); napier (□ — □); e cameron (■ — ■). As equações de regressão dos sistemas, raízes extraídas e intacto, e os coeficientes de correlações foram os seguintes: jaraguá ( $y = 37,01 + 0,75 x$ ;  $r = 0,93^{**}$ ); pangola ( $y = -49,91 + 0,38 x$ ;  $r = 0,85^{**}$ ); transvala ( $y = -25,14 + 0,30 x$ ;  $r = 0,87^{**}$ ); napier ( $y = 10,37 + 0,090 x$ ;  $r = 0,96^{**}$ ); e cameron ( $y = 0,97 + 0,26 x$ ;  $r = 0,97^{**}$ ). Pontos representam média de quatro repetições. As diferenças entre coeficientes de regressão "b" pelo teste t, ao nível de  $p < 0,05$ , mostraram que o jaraguá foi maior que as demais gramíneas, que não se diferenciaram entre si, mas tiveram seus  $b \neq 0$ .

te nas raízes deste capim que nas demais gramíneas. Assim, por ocasião do preparo das amostras das raízes, a inativação de nitrogenase em bactérias localizadas em sítios melhor protegidos pode ter sofrido menor efeito do  $O_2$  que em outras gramíneas com as bactérias localizadas mais perto da superfície.

A Fig. 3 mostra correlações altamente significativas entre os dois sistemas de avaliação, independentemente das cinco gramíneas estudadas, e com valores "b" diferentes para o jaraguá. Os valores "b" de todas as gramíneas foram diferentes de zero. Estes resultados são importantes apesar de atividade da nitrogenase avaliada pelo sistema de raízes extraídas subestimar, na maior parte

das vezes, aquela encontrada para o sistema intacto. Correlações estatisticamente significativas foram encontradas entre estes dois métodos também em outras espécies (Döbereiner 1977b, Nery et al. 1977, Witty 1977, Boddey et al. 1978, Patriquin & Denike 1978).

Conclui-se, com os resultados da Tabela 6 e Fig. 3, que no caso das cultivares estudadas de *Digitaria* e *Pennisetum*, a vantagem do novo sistema de raízes extraídas só se fez sentir através de redução do "lag", como demonstrado no experimento inicial, ao passo que, no caso do jaraguá, acrescenta-se a vantagem de estimar melhor os valores avaliados pelo sistema intacto. Baseado na série de experimentos preliminares, o novo método de raízes extraídas, que consiste de incubação de sistemas radiculares com 10 cm de parte aérea, em frascos de 3 litros, nos quais 3%  $O_2$  e 12%  $C_2H_2$  são injetados no início da incubação e taxas de redução de  $C_2H_2$  são medidas com seis e oito horas de incubação, pode ser recomendado para uso de rotina.

## CONCLUSÕES

1. Correlações positivas altamente significativas entre o sistema proposto, com raízes extraídas, e o tradicional sistema intacto solo-planta, de avaliação da fixação de  $N_2$  em gramíneas pela redução do acetileno, confirmam a validade da metodologia proposta.

2. O sistema proposto subestima em cerca de 80% os valores da atividade da nitrogenase nas gramíneas estudadas, em relação aos valores determinados pelo sistema tradicional, exceto quanto ao capim-jaraguá, no qual essa atividade apresenta valores equivalentes nos dois sistemas.

3. Pelo sistema proposto, de raízes extraídas, as amostras das raízes, incluindo  $\pm 10$  cm da parte aérea da planta, deverão ser incubadas com 3%  $O_2$  (v/v) mais 12% de  $C_2H_4$ , utilizando-se as taxas de redução de  $C_2H_2$  entre seis e oito horas de incubação.

## REFERÊNCIAS

- ABRANTES, G.T.V.; DAY, J.M.; CRUZ, V.C. & DÖBEREINER, J. Fatores limitantes da fixação de nitrogênio em campo de *Digitaria decumbens* cv. Transvala. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 15, Campinas, 1975a. Anais... p.171-6.

- ABRANTES, G.T.V.; DAY, J.M. & DÖBEREINER, J. Methods for the study of nitrogenase activity in yield grown grasses. *Bull. Int. Inf. Biol. Sol.*, 21: 1-7, 1975b.
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. Host plant specificity in the infection of maize, wheat and rice with *Azospirillum* spp. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON ASSOCIATIVE N<sub>2</sub>-FIXATION, Piracicaba, SP., 1981, p.131-6.
- BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. & DÖBEREINER, J. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF N<sub>2</sub> FIXATION WITH NON-LEGUMES, 2, Banff-Canada, 1982.
- BALDANI, J.I.; PEREIRA, P.A.A.; NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. The initiation of acetylene reduction in isolated roots of maize: effect of carbon, oxygen and mineral sources. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LIMITATIONS AND POTENTIALS OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS, Brasília, 1978. p.356-7.
- BARBER, L.E.; TJEKEMA, J. & EVANS, H.J. Acetylene reduction in the root environment of some grasses and other plants in Oregon. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ENVIRONMENTAL ROLE OF NITROGEN-FIXING BLUE-GREEN ALGAE AND ASYMBIOTIC BACTERIA, Uppsala, 1978. p.366-72.
- BERKUM, P. van. Evaluation of acetylene reduction by excised roots for the determination of nitrogen fixation in grasses. *Soil Biol. Biochem.*, 12:141-5, 1980.
- BERKUM, P. van. Programa de Fixação Biológica de Nitrogênio. Rio de Janeiro, CNPq/EMBRAPA/UFRRJ, 1977. Relatório.
- BERKUM, P. van & BOHLOOL, B.B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.*, 44(3):491-17, 1980.
- BODDEY, R.M.; QUILT, P. & AHMAD, L. Acetylene reduction in the rhizosphere of rice: methods of assay. *Plant Soil*, 50:567-74, 1978.
- BOYLE, C.D. & PATRIQUIN, D.G. Carbon metabolism of *Spartina alterniflora* in relation to that of associated N<sub>2</sub>-fixing bacteria. s.n.t.
- DAVID, K.A.V. & FAY, P. Effects of lon-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganisms. *Appl. Environm. Microbiol.*, 34:640-6, 1977.
- DAY, J.M.; BERKUM, P. van & WITTY, J.F. Associative symbioses: Their contribution to the nitrogen cycle and a critical analysis of the methodology used in their study. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LIMITATIONS AND POTENTIALS OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS, Brasília, 1977. p.38.
- DAY, J.M. & DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.*, 8:45-50, 1976.
- DE-POLLI, H.; BOYER, C.D. & NEYRA, C.A. Nitrogenase activity associated with roots and stems of corn (*Zea mays* L.) grown in New Jersey. *Plant Physiol.* (supplement), 69(4):35, 1982.
- DE-POLLI, H.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. & SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by <sup>15</sup>N<sub>2</sub> incorporation. *Soil Biol. Biochem.*, 9:119-23, 1977.
- DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. *R. bras. Ci. Solo*, 1(6):1-9, 1977a.
- DÖBEREINER, J. Forage grasses and grain crops. In: BERGERSEN, F.J., ed. *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*. Canberra, Australia, John Wiley & Sons, 1980. p.535-55.
- DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: ISOTOPES IN BIOLOGICAL DINITROGEN FIXATION, PROC. OF AN ADVISORY GROUP, Meeting-Vienna, 1977b, p.51-69.
- DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N<sub>2</sub> fixation, in grass-bacteria associations. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF N<sub>2</sub> FIXATION, 2, Salamanca, 1977. p.513-22.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. Dinitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. In: STEWART, W.D.P., ed. *Nitrogen Fixation by Free-Living Micro-organisms*. London, Cambridge University Press, 1975. p.39-56.
- DÖBEREINER, J.; DAY, J.M. & DART, P.J. Nitrogenase activity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association and oxygen sensitivity. *J. Gen. Microbiol.*, 71:103-16, 1972.
- DUTHION, C. Variation des teneurs en acides organiques de racines de plantes soumises à un excès d'eau. *Ann. Agron.*, 27:207-20, 1976.
- ECKART, J.F. & RAGUSE, C.A. Effects of diurnal variation in light and temperature on acetylene reduction activity (nitrogen fixation) of subterranean clover. *Agron. J.*, 72:519-23, 1980.
- ESKEW, D.L. & TING, I.P. Comparison of intact plant and excised root assays for acetylene reduction in grass rhizospheres. *Plant Sci. Lett.*, 8:327-31, 1971.
- MAGALHÃES, F.M.M.; BALDANI, J.I.; SOUTO, S.M.; KUYKENDALL, J.R. & DÖBEREINER, J. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *An. Acad. Brasil. Sci. Prelo.*
- NASCIMENTO, M.P.S.C.B.; NASCIMENTO, H.T.S. & GOMIDE, J.A. Alguns aspectos morfofisiológicos de três gramíneas de clima tropical. *R. Soc. Bras. Zoot.*, 9(1):142-58, 1980.
- NERY, M.; ABRANTES, G.T.V.; SANTOS, D. & DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em trigo. *R. bras., Ci. Solo*, 1:15-20, 1977.
- NEVES, M.C.P.; DAY, J.M.; CARNEIRO, A.M. & DÖBEREINER, J. Atividade da nitrogenase na rizosfera de gramíneas tropicais forrageiras. *R. Microbiol.*, 7(3):59-63, 1976.

- OKON, Y.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting in pure culture and in association with plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:85-8, 1977a.
- OKON, Y.; HOUGHINS, J.P.; ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. The growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. *J. Gen. Microbiol.*, 98: 87-93, 1977b.
- PATRIQUIN, D.G. Factors affecting nitrogenase activity (acetylenoreducing activity) associated with excised roots of the emergent halophyte *Spartina alterniflora* Loisel. *Aquatic Botany*, 4:193-10, 1978.
- PATRIQUIN, D.G. & DENIKE, D. "In situ" acetylene reduction assays of nitrogenase activity associated with the emergent halophyte *Spartina alterniflora* Loisel.: Methodological problems. *Aquatic Botany*, 4:211-26, 1978.
- PEREIRA, P.A.A.; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. & NEYRA, C.A. Nitrate reduction and nitrogenase activity in excised corn roots. *Can. J. Bot.*, 59(12): 2445-9, 1981.
- POSTGATE, J.R. Prerequisites for biological nitrogen fixation in free-living heterotrophic bacteria. In: QUISPÉL, A., ed. *The Biology of Nitrogen Fixation*. North Holland, Amsterdam, A. Quispel, 1974, p. 664-86.
- RINAUDO, G.; BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. Algal and bacterial non symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. *Plant Soil*. (Special Volume) 1971. p.471-9.
- SCOTT, C.A.; MAGALHÃES, F.M.M.; DIVAN, V.L.S. & SCOTT, D.B. Numbers of *Azospirillum* spp. associated with roots of field grown maize. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LIMITATIONS AND POTENTIALS OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN THE TROPICS, Brasília, DF, 1978, p.371-2.
- SMITH, A.M. Ethylene in soil biology. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 14:53-73, 1976.
- SOUTO, S.M. Competição de forrageiras. II. Período seco. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 14, Belém, 1978. *Anais* . . .
- SOUTO, S.M. Variação estacional da fixação de N<sub>2</sub> e denitrificação em gramíneas forrageiras tropicais. Itaguaí, UFRRJ, 1982, 268p. Tese de Doutorado.
- SOUTO, S.M. & DÖBEREINER, J. Variação estacional da fixação de N<sub>2</sub> e assimilação de nitrato em gramíneas forrageiras tropicais. *Pesq. agropec. bras.*, Prelo.
- TJEPKEMA, J.D. & BERKUM, P. van. Acetylene reduction by soil cores of maize and sorghum in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:626-38, 1977.
- WITTY, J.F. A critical analysis of the application of the acetylene reduction method in assessing nitrogen fixation by tropical crops. s.l., s.ed., 1977 (Mod. Research Scheme Report, 3041).