



**Utilização de Microeletrodos Específicos para Oxigênio
visando a Detecção de Sítios de FBN em Plantas e
Culturas de Bactérias Diazotróficas.**



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Agrobiologia

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

República Federativa do Brasil

Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

Ministro

Marcus Vinicius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Diretor Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores

Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Chefias da Agrobiologia

Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves

Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto

Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto

DOCUMENTO Nº 111

ISSN 0104-6187

Dezembro 1999

**Utilização de Microeletrodos Especificos para Oxigênio
visando a Detecção de Sítios de FBN em Plantas e
Culturas de Bactérias Diazotróficas.**

David Vilas Boas de Campos
Lúcia Gracinda da Silva
Severino Matias de Alencar
Bruno José Rodrigues Alves
Segundo Urquiaga
John Witty
Robert Michael Boddey

Seropédica – RJ

1999

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à :

Embrapa **Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Expediente:

Revisor e/ou ad hoc: Maria Cristina Prata Neves

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

CAMPOS, D.V.B. de; SILVA, G. da; ALENCAR, S.M. de; ALVES, B.J.R.;
URQUIAGA, S.; WITTY, J.; BODDEY, R.M. **Utilização de
microeletrodos de oxigênio visando a detecção de sítios de FBN em
plantas e culturas de bactérias diazotróficas.** Seropédica: Embrapa
Agrobiologia, dez. 1999 22p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 111).

ISSN 0104-6187

1. Bactéria. 2. Diazotrófico. 3. Fixação biológica de nitrogênio. I. Silva, G. da,
colab. II. Alencar, S.M. de, colab. III. Alves, B.J.R., colab. IV. Urquiaga, S., colab.
V. Witty, J., colab. VI. Boddey, R.M., colab. VII. Embrapa. Centro Nacional de
Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). VIII. Título. IX. Série.

CDD 579.3

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	4
2. INTRODUÇÃO	4
3. MATERIAL E MÉTODOS	6
3.1 MICROELETRODO	6
3.2 ESPÉCIES VEGETAIS	7
3.2.1 MICROPROPAGAÇÃO	7
3.3 BACTÉRIAS UTILIZADAS	8
3.4 DIFUSÃO DE OXIGÊNIO	9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	10
4.1 TAXA DE DIFUSÃO DO OXIGÊNIO NA AUSÊNCIA DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS.....	10
4.2 VERIFICAÇÃO DO PADRÃO DE DIFUSÃO DE OXIGÊNIO EM NÓDULOS DE SOJA E FEIJÃO.....	12
4.3 CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO EM RAÍZES DE CANA-DE-AÇÚCAR	13
4.4 CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO EM RAÍZES DE ARROZ.....	14
4.5 CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO EM PELÍCULAS BACTERIANAS FORMADAS EM MEIOS DE CULTURA SEMI-SÓLIDOS.....	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	20
6. CONCLUSÕES	20
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

Utilização de Microeletrodos Específicos para Oxigênio visando a Detecção de Sítios de FBN em Plantas e Culturas de Bactérias Diazotróficas.

David Vilas Boas de Campos
Lúcia Gracinda da Silva
Severino Matias de Alencar
Bruno José Rodrigues Alves
Segundo Urquiaga
John Witty
Robert M. Boddey

1. Resumo

Foram utilizados microeletrodos específicos para oxigênio visando a detecção de regiões com baixas concentrações de oxigênio, que poderiam ser possíveis sítios de fixação biológica de nitrogênio em nódulos de feijão, raízes de cana-de-açúcar e arroz e bactérias diazotróficas crescidas em meio de culturas semi-sólidos. Em nódulos de soja e feijão, o controle da pressão de O_2 mostrou-se eficiente para o funcionamento da nitrogenase. Em raízes de cana-de-açúcar e arroz micropropagadas, a concentração de oxigênio reduziu-se, embora ainda fossem encontradas baixas concentrações de oxigênio. Em frascos contendo culturas de bactérias diazotróficas crescidas em meios semi-sólidos sem nitrogênio, as bactérias diazotróficas estudadas mostraram-se capazes de escoar o excesso de O_2 livre, condição fundamental para a ativação e funcionamento da nitrogenase. O uso de microeletrodos específicos para O_2 mostrou-se muito útil no estudo, e vislumbra ser útil também em estudos de fisiologia vegetal.

2. Introdução

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada, juntamente com a fotossíntese, um dos principais processos responsáveis pela vida na terra. A grande oferta de N_2 atmosférico (79%), nos sistemas naturais, só se torna disponível aos seres vivos através de gasto energético. A quebra da ligação tripla da molécula de nitrogênio e formação de amônia é realizada em uma reação química comandada pela enzima nitrogenase, utilizando energia obtida de carboidratos e armazenada

sob a forma de ATP (Neves, 1992). Após a quebra desta ligação o nitrogênio pode ser incorporado pelos tecidos vivos.

O O₂ tem papéis ambíguos na FBN. Sua presença é essencial para as células vivas, mas a nitrogenase desnatura-se rápida e irreversivelmente, em sua presença (Haaker, 1988), representando assim um grande problema de ordem fisiológica. Alguns microrganismos aeróbicos desenvolveram, então, mecanismos que controlam a concentração de O₂ nos sítios de fixação (Neves, 1992).

Em leguminosas, ocorrem associações simbióticas com bactérias diazotróficas que levam à formação de órgãos vegetais diferenciados, os nódulos, onde as referidas bactérias encontram um microhabitat ideal para fixação de nitrogênio. A endoderme é a primeira barreira que impede a difusão do excesso de O₂ para o interior do nódulo (Haaker, 1988). No interior dos nódulos há um pigmento vermelho chamado leg-hemoglobina cuja função é transportar o oxigênio. Sua alta afinidade com o O₂ faz com que seja capaz de liberar este gás para o bacteróide em teores nunca prejudiciais à nitrogenase (Neves, 1992). Somente a presença de leg-hemoglobina é insuficiente para proteção da nitrogenase. Segundo Witty (1987), os nódulos formados pela simbiose *Rhizobium*/leguminosa fornecem um único e favorável ambiente para a expressão e operação dos genes da nitrogenase presentes na bactéria. Este autor demonstrou haver uma barreira à difusão de oxigênio dentro dos nódulos, que pode ser alterada pôr variações no ambiente.

Recentemente, bactérias diazotróficas foram encontradas associadas a gramíneas e contribuições da FBN a estas plantas foram detectadas. Nestas associações, as gramíneas fornecem substratos de carbono e demais nutrientes às bactérias. Supõe-se que existam nestas plantas microhabitats onde a concentração de O₂ seja favorável à FBN. Dentre as gramíneas, e em se tratando de energia e sua otimização, deve-se destacar a importância da descoberta de bactérias diazotróficas em cana-de-açúcar. A cultura desta planta, além de fornecer sacarose, que é fonte energética para o metabolismo dos seres vivos, pela fermentação da sacarose obtém-se etanol, combustível importante na indústria brasileira e de grande peso no balanço energético nacional. Entretanto, apesar de inúmeras evidências, ainda não se conseguiu localizar nesta planta um sítio de fixação. Com este intuito, muitos estudos têm sido realizados, tanto a nível microbiológico (Silva et al., 1995; Olivares et al., 1993; Döbereiner et al., 1995), como de análise de nitrogênio (Urquiaga et al.,

1992; Boddey, 1993). A cultura do arroz inundado também mostrou-se capaz de receber contribuições significativas da FBN (Oliveira, 1994).

Bactérias cultivadas em meio de cultura semi-sólidos possuem taxa respiratória suficiente para escoar o oxigênio do sítio da enzima nitrogenase, sendo consideradas microaerófilas. Este mecanismo é conhecido como proteção respiratória (Dobereiner, 1995).

Face à concentração de oxigênio ser considerada limitante à atividade da nitrogenase e de se conhecer a concentração dentro dos nódulos de leguminosas, resolveu-se utilizar microeletrodos de oxigênio na tentativa de localizar, em raízes de cana-de-açúcar e arroz, além de meios de cultura, locais que pudessem apresentar concentrações de oxigênio similares as dos nódulos.

Objetivo

Detectar concentrações de oxigênio nas diversas partes das raízes de cana-de-açúcar, arroz e culturas de bactérias, que pudessem servir de indício à existência de sítios de fixação de nitrogênio.

3. Material e Métodos

3.1 Microeletrodo

A construção do microeletrodo foi realizada segundo Witty (1991) e Witty et al. (1987). Este consiste em um fio de platina (125 μ m de diâmetro, 99,9% de pureza) cuja ponta foi afiada pela embebição em KCN onde foi aplicada determinada voltagem. Este fio é recoberto por um vidro especial, tipo pirex. A ponta do eletrodo foi recoberta com silicone a fim de impedir a entrada de íons inespecíficos. De acordo com a voltagem aplicada (10^{-9} a 10^{-7} A que equivale à 10 a 1000 mV) e alternando-se a polaridade da voltagem do positivo para o negativo, permite-se a entrada, pelo silicone, e conseqüente reação com o eletrodo, das moléculas de hidrogênio, oxigênio e gás carbônico. No microeletrodo específico para oxigênio, quando este está em contato somente com o ar atmosférico, aplicando-se uma

voltagem de -0.5V, o registrador marca a concentração de O₂ no ar. Esta concentração é considerada máxima e é igual a 250mmol/mm³ correspondendo a aproximadamente 20.9% do total de gases. Aplicando-se a mesma voltagem e, introduzindo o eletrodo em uma solução de ditonito de sódio concentrada, têm-se o zero de marcação (eq. 1), onde não há O₂ livre. Pode-se assim, determinar a concentração de oxigênio no sistema a se estudar.



3.2 Espécies Vegetais

Com a finalidade de calibrar o microeletrodo de O₂ e de termos valores de concentração de oxigênio compatíveis à atividade da nitrogenase, verificou-se a concentração de oxigênio nos nódulos das raízes de leguminosas, utilizando nódulos de soja e feijão. A soja (*Glycine max*) utilizada apresentava, aproximadamente, 50 dias de crescimento, foi plantada em vermiculita e areia, na qual inoculou-se a estirpe BR33 de *Bradyrhizobium japonicum*, mantida em casa de vegetação. As plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) foram coletadas na fazenda experimental da **Embrapa Agrobiologia**, onde não realizou-se inoculação, não sendo conhecida assim a estirpe de *Rhizobium* sp. responsável pela formação dos nódulos. Todos os nódulos estavam fixando nitrogênio, com exceção de um nódulo de feijão, cuja anatomia interna não se apresentava avermelhada.

3.2.1 Micropropagação

Toda metodologia até hoje utilizada na obtenção de plantas micropropagadas tem mostrado que as culturas obtidas conservam as suas características genéticas originais, com alto grau de fitossanidade e conseqüente restabelecimento de vigor e aumento na produção. As mudas de cana utilizadas pertencem à variedade NA 5679 e foram produzidas segundo a metodologia utilizada pelo Centro de Tecnologia da Copersucar (Copersurcar, 1989). Após as plantas atingirem determinada fase de seu desenvolvimento, inoculou-se a bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* (estirpe PAL-5) e após o prazo necessário à constatação do sucesso da inoculação as mesmas foram transferidas para substrato estéril (vermiculita e areia 2:1) e mantidas em casa de vegetação. Quando realizaram-se as medições, as plantas se

apresentavam com 2 meses de idade. Como este vegetal não apresenta nódulos e possui uma estrutura bastante rígida (difícil de ser penetrada pelo microeletrodo), optou-se pela utilização de raízes mais novas.

Utilizaram-se, também, plantas de arroz (*Oryza sativa*) crescidas em agar, em que uma das plantas foi inoculada com *Rhizobium*. As plantas de arroz utilizadas faziam parte de um experimento de inoculação de bactérias diazotróficas em arroz e dentre estas havia uma tentativa de inoculação com *Rhizobium* sp.. Face os dados, referente a concentração de O₂ nos nódulos, serem referentes a atividade desta bactéria, decidiu-se incluí-la nos nossos testes afim de verificar se ocorreria uma alteração na concentração de oxigênio requerida por esta bactéria quando no interior de raízes de arroz.

3.3 Bactérias utilizadas

A fim de verificar as concentrações de oxigênio requeridas pelas bactérias diazotróficas, efetuaram-se os seguintes experimentos:

Experimento I

As bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* (Z67), *Acetobacter diazotrophicus* (PAL3), *Azospirillum amazonense* (Cbamc) e *Burkholderia vietnamensis* foram crescidas por 24h em meio rico (DYGS) (Döbereiner, et al., 1995) e posteriormente inoculou-se em meios semi-sólidos semi-específicos (JNFB, LGI-P, LGI / NFB e JMV respectivamente) (Döbereiner, et al., 1995). Nestes meios cresceram por mais 24h a 37°C. Após este período realizou-se leitura da concentração de oxigênio, penetrando o microeletrodo no interior da colônia.

Experimento II

As bactérias diazotróficas *Herbaspirillum seropedicae* (Z67) e *Acetobacter diazotrophicus* (PAL3), foram crescidas em meio semi-sólido semi-específico (JNFB e LGI-P, respectivamente), com diferentes concentrações de fontes de carbono (LGI-P= 50, 100 e 200g/l de açúcar cristal; JNFB= 30, 60 e 100g/l sacarose) e agar (LGI-P e JNFB= 1, 2 e 4g/l). No meio JNFB, mesmo com a adição de sacarose manteve-se a concentração normal de ácido málico (5g/l). A concentração normal de

agar, aproximadamente 2g/l, foi mantida constante nos ensaios onde se alterou a concentração de açúcar cristal e sacarose.

Realizaram-se leituras de pressão de oxigênio e redução de acetileno nas películas formadas nos referidos meios após 5 dias de inoculação quando as referidas películas apresentavam-se bem características.

Observação: Segundo Döbereiner et al. (1995), somente quando as células atingem número suficientemente elevado para escoar o excesso de O_2 é que a nitrogenase é ativada. Portanto, devido ao tempo extremamente reduzido, optou-se pela inoculação, nos experimentos acima citados, de 500 μ l de bactérias crescidas em meio rico Dygs (aproximadamente 10^8 células) nos meios semi-sólidos a fim de forçar um ótimo de escoamento de O_2 e poder realizar leituras com 24h de crescimento.

As alterações nas concentrações de agar, açúcar cristal e sacarose visaram alterar a osmolaridade dos meios semi-sólidos e influir na taxa de difusão do oxigênio nos referidos meios.

3.4 Difusão de Oxigênio

Com o intuito de verificar a taxa de difusão do oxigênio no ar, na ausência de membranas biológicas, construiu-se um recipiente ligado ao ambiente externo somente por uma membrana de papel de filtro. Este recipiente apresentava dois orifícios. Um deles serviu para a introdução do microeletrodo e o outro para a injeção de gás nitrogênio (Fig. 01). Após a injeção do referido gás e conseqüente saturação do ambiente interno a difusão de O_2 pôde ser mensurada com aferições a cada 12 segundos.

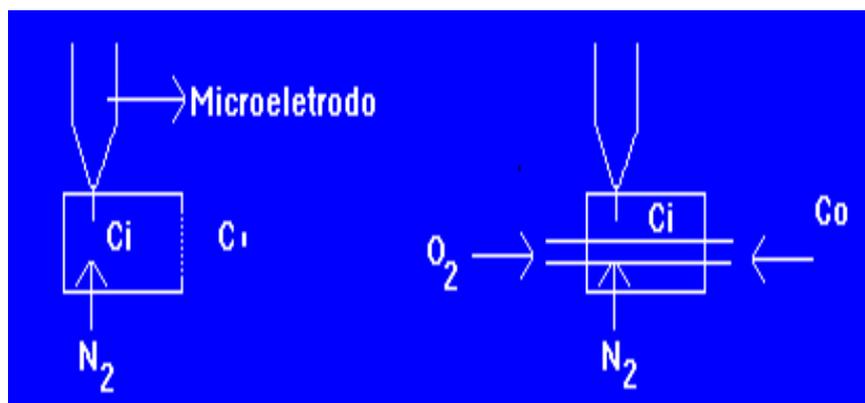


Fig. 1- Esquema do teste para a determinação da difusão de oxigênio em uma atmosfera saturada de nitrogênio.

4. Resultados e Discussão

4.1 Taxa de Difusão do Oxigênio na Ausência de Membranas Biológicas

Como pôde ser verificado na Fig. 02 (a), o oxigênio após 144s equilibrou a concentração do interior do recipiente com a da atmosfera, obedecendo a uma curva logarítmica. A fim de se determinar o coeficiente de difusão efetuou-se a linearização dos dados, e obteve-se uma reta e sua equação correspondente (Fig. 02(b)). Este dado serviu como um parâmetro inicial para a constatação de que o oxigênio se difunde diferentemente nos diversos fluidos, principalmente na presença de membranas biológicas. Observou-se que em outros fluidos (Fig. 03), diferentes do ar, este gás apresentou comportamentos diversos. Note-se que em solução contendo 2g/l de agar, sua difusão é representada por um gradiente, diferentemente dos demais fluidos.

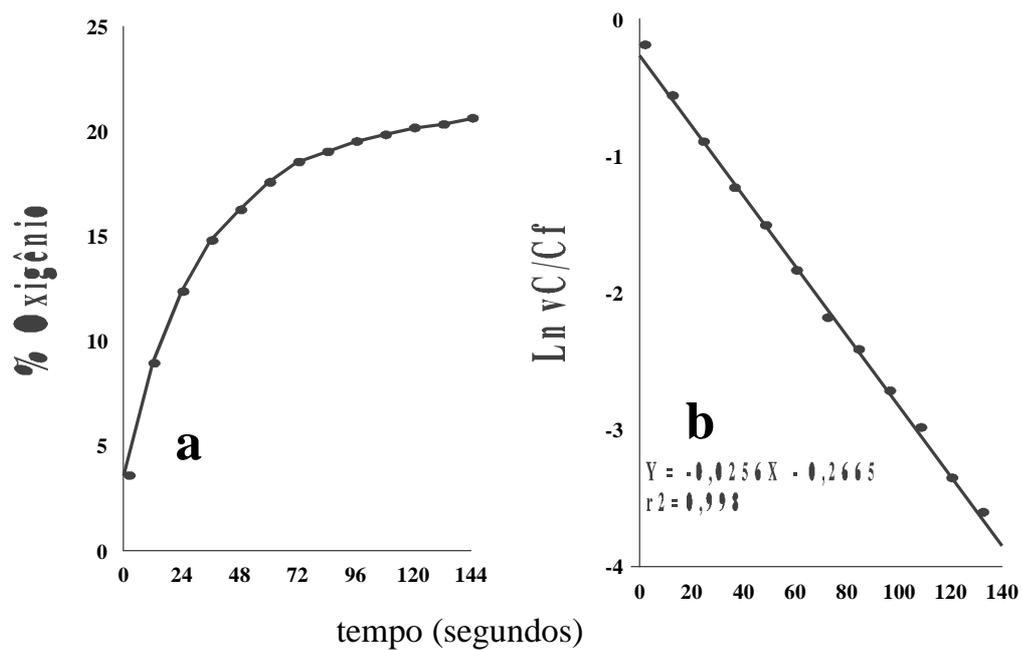


Fig.2- Determinação da resistência de membranas não biológicas à difusão de O_2 , utilizando microeletrodos.

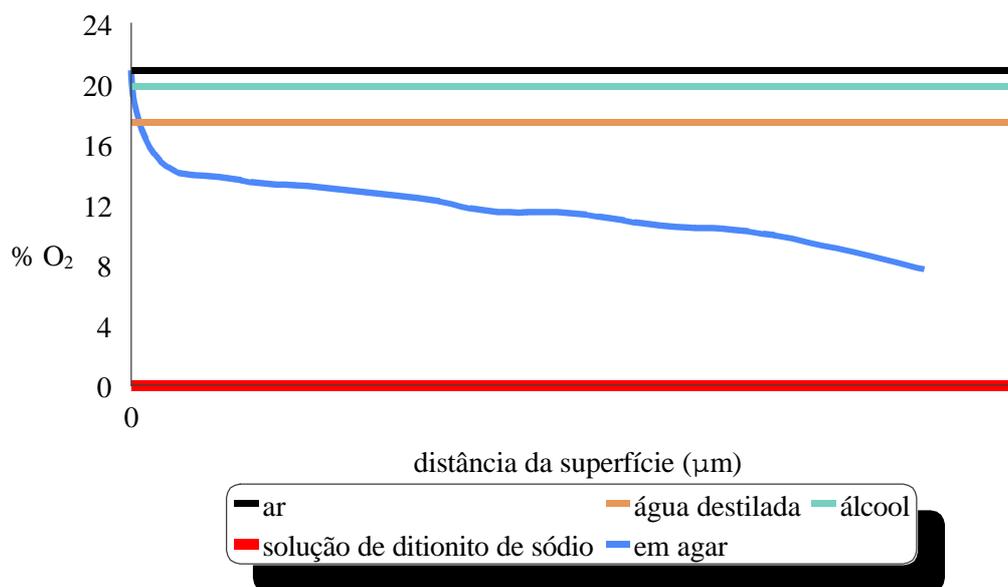
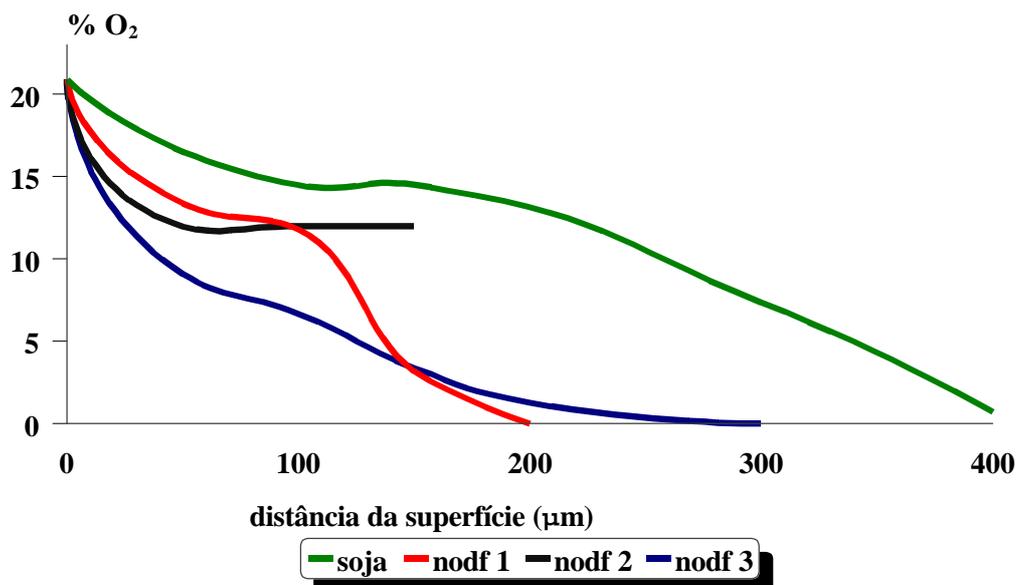


Fig.3- Concentração de oxigênio em diversas soluções, a diferentes distâncias da superfície.

4.2 Verificação do padrão de difusão de oxigênio em nódulos de soja e feijão

A metodologia aqui utilizada é bem descrita para a medição da concentração e difusão de O_2 em nódulos de leguminosas. Como este trabalho é pioneiro na utilização desta metodologia em gramíneas, decidiu-se usar como padrão as medições em nódulos de leguminosas. Os resultados, mostrados na Fig. 04, indicaram semelhanças no comportamento deste gás em soja e feijão. Em soja, o gradiente se apresentou mais extenso, com detecção de valores no interior do nódulo em até 400 μ m de profundidade, região esta correspondente aquela onde verificou-se a existência de bacteróides. Este gradiente é diferente do observado para nódulos de soja por Witty (1987), porém a razão da diferença reside no diâmetro dos nódulos das duas variedades de soja estudadas. Este fato pode ser comprovado pela inexistência de gradiente em nódulos de soja com bacteróides mortos (Witty, 1987). Quanto aos nódulos de feijão, estes apresentaram um menor gradiente, provavelmente porque eram de menor tamanho, se comparados com nódulos de soja, que eram mais compartimentalizados, e o valor mínimo foi atingido em menores profundidades de penetração do microeletrodo. Estes valores são semelhantes aos encontrados por Witty (1987). Destaca-se o fato de um nódulo de feijão (nódulo 2), provavelmente considerado como ineficiente (a alta % O_2 manteve-se praticamente constante após 100 μ m) por não atingir o valor mínimo, apresentou padrão homólogo ao encontrado por este autor para *Phaseolus* infectados com estirpe de *Rhizobium* ineficiente (Fig. 04).



nodf - nódulo de feijão

Fig.4- Concentração de oxigênio a diferentes profundidades de um nódulo de soja e três nódulos de feijão, determinados por microeletrodos específicos de O₂.

4.3 Concentração de Oxigênio em raízes de Cana-de-Açúcar

Face à impossibilidade, devido à fragilidade do microeletrodo, de se aferir as diversas partes da cana, como era o objetivo inicial do projeto, decidiu-se efetuar medições somente nas raízes. Escolheram-se, para este fim, somente raízes novas e bem tenras que oferecerem menor resistência à penetração do microeletrodo, procurando evitar sua danificação. O primeiro fato a ser destacado é que em nenhuma das medições foram encontrados valores iguais a zero (Fig. 05), fato comum de ocorrer em nódulos de leguminosas (Fig. 04). Deve-se ressaltar porém, que é imprescindível a existência de uma quantidade mínima de oxigênio nos tecidos radiculares, fundamental para a manutenção do metabolismo radicular, diferentemente do que ocorre em nódulos, onde o oxigênio pode estar combinado à Leg-hemoglobina. Interessante notar que as diversas partes da raiz de cana apresentaram valores diferentes quanto à concentração de oxigênio, principalmente na região da coifa. Somente nesta região e no terço superior encontraram-se valores próximos a 5% O₂ (Fig. 05). Constatou-se, também, que somente no terço superior das raízes a concentração decaiu em gradiente contínuo. No terço médio e na coifa ocorreu um decréscimo até certa profundidade e a partir deste ponto ocorreu um aumento na concentração de O₂. Uma possibilidade é que o microeletrodo estava

atingindo o outro lado da raiz. O interessante, deste fato, foi a constatação da existência de diferenças entre as diversas partes da raiz. Isto pode indicar que, apesar da população de bactérias diazotróficas estar presente em toda a raiz e/ou outras partes das plantas de cana (Döbereiner et al., 1995), a efetiva atividade da enzima nitrogenase possa ocorrer somente em determinados locais onde a fisiologia da planta assim a permita. Neste caso, ao invés de termos um sítio anatomicamente definido, como em leguminosas, teríamos um sítio móvel de fixação, vinculado à fisiologia das diferentes variedades de cana-de-açúcar. Obviamente, para poder ter certeza desta hipótese, deve-se repetir este experimento utilizando microeletrodos mais resistentes para os tecidos da cana. Neste ensaio ocorreram muitos problemas com relação à danificação dos microeletrodos, sendo-nos impossível o prosseguimento dos testes.

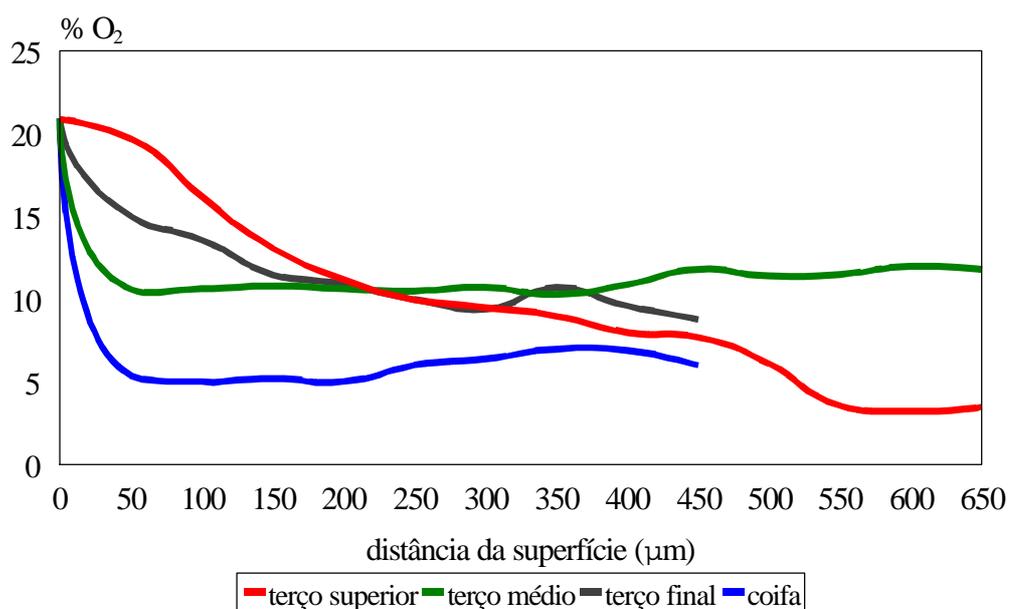


Fig.5- Concentração de oxigênio, a diferentes profundidades e seções, penetradas pelo Microeletrodo de O₂, em diversas partes da raiz de cana-de-açúcar.

4.4 Concentração de Oxigênio em raízes de Arroz

As medições foram realizadas em plântulas com aproximadamente um mês de idade, crescidas em substrato agar-água 1%. Para tanto retirou-se todo o substrato com as raízes do tubo de ensaio, visando perturbar o sistema o mínimo possível, e realizaram-se medições introduzindo o microeletrodo no substrato. Os

resultados, vistos na Fig. 06, mostraram que os menores valores foram os encontrados em raiz inoculada com *Rhizobium* sp., novamente indicando que o ambiente pode realmente ser alterado pelo metabolismo da bactéria. As medições com a presença do agar foram de extrema dificuldade, pois não há como fixar a raiz, não sabendo-se, portanto, o momento exato em que o microeletrodo penetrava na raiz. Assim, decidiu-se, a título de comparação, realizar medições em raízes nuas. Nestas verificou-se haver um padrão diferente no que se refere à concentração em raízes grossas e finas. Isto pode indicar, igualmente ao observado em cana que um mesmo órgão vegetal pode apresentar variações fisiológicas consideráveis.

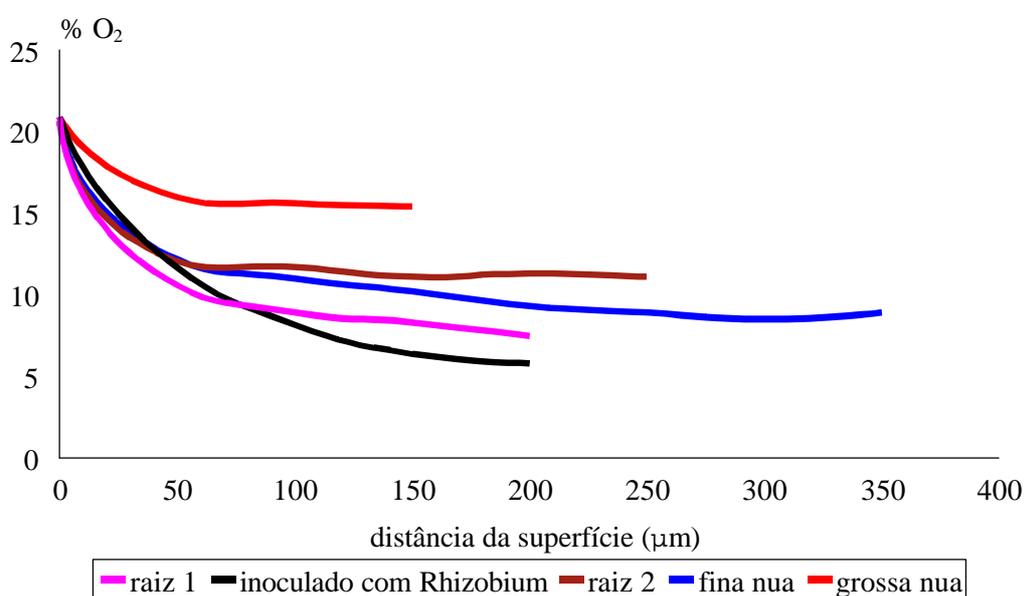


Fig.6- Concentração de oxigênio, a diferentes profundidades da superfície de raízes de arroz, cultivado em agar, penetradas pelo microeletrodo.

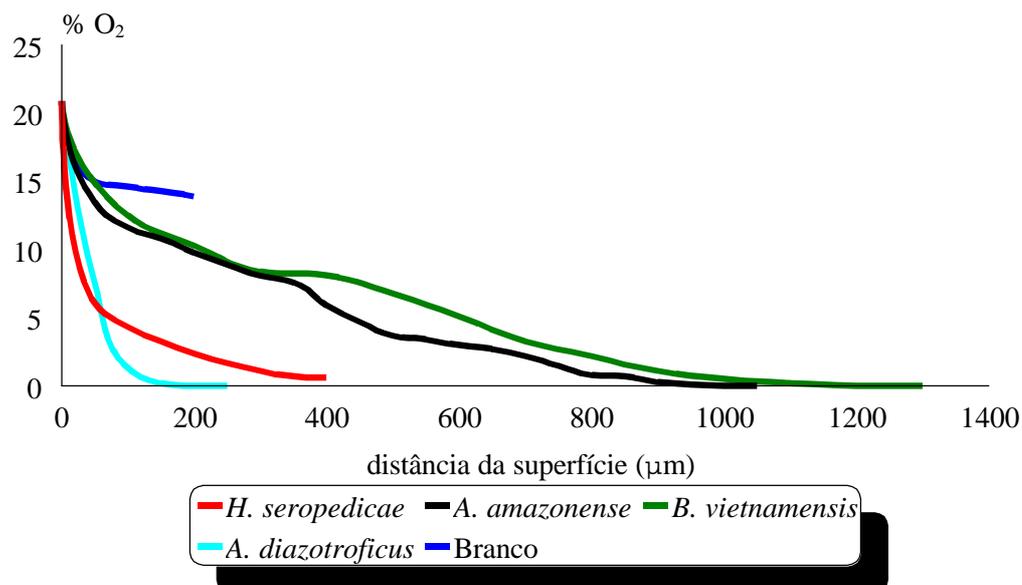
4.5 Concentração de oxigênio em películas bacterianas formadas em meios de cultura semi-sólidos

Devido as medições nas raízes terem causado danos aos eletrodos e, face estes se encontrarem em número reduzido para análise, resolveu-se implantar experimentos utilizando bactérias diazotróficas encontradas em cana-de açúcar e arroz. Estes experimentos consistiram em se inocular as referidas bactérias em meios de cultura específicos para cada bactéria, alterando-se as concentrações de agar e açúcar em cada um deles. Observando a Fig. 07 e 08, notou-se que

dependendo do tempo de desenvolvimento da película, esta apresentou diferentes concentrações de oxigênio.

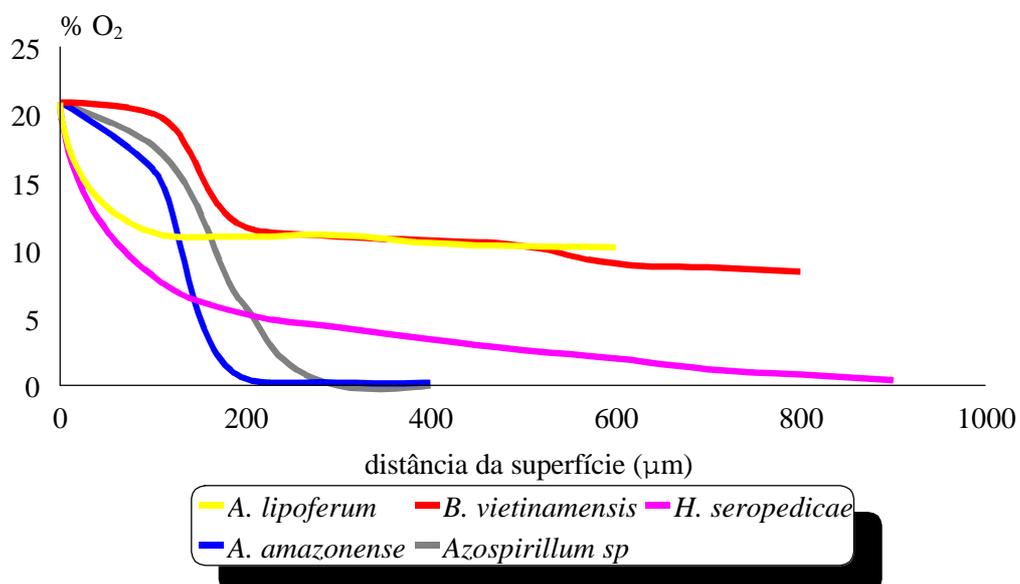
Quanto ao comportamento de *Acetobacter diazotrophicus* nas diferentes concentrações de agar e açúcar (Fig. 09), notou-se que qualquer alteração no meio foi refletida numa diminuição da concentração de O₂. Porém, este fato não está diretamente relacionado à atividade da nitrogenase. Como visto na Fig. 10, todas as alterações nas concentrações de agar e adições de açúcar cristal no meio (30, 60 e 100g açúcar por litro) apresentaram queda da atividade da nitrogenase, sendo esta mais acentuada quando diminuiu-se a concentração de agar, apesar da concentração de oxigênio não se apresentar superior às demais.

Na Fig. 11, observa-se que, apesar de todas as alterações nos teores de agar e sacarose apresentarem valores de concentração de oxigênio inferiores às do meio “normal”, igual ao observado para *A. diazotrophicus*, as curvas comportaram-se diferentemente, indicando um comportamento metabólico diferenciado no que se refere à tolerância de oxigênio. Porém, com relação à atividade da nitrogenase, observou-se que *Herbaspirillum seropedicae* pareceu possuir um mecanismo de proteção à nitrogenase menos eficiente do que o de *A. diazotrophicus*. Interessante ressaltar que igualmente ao ocorrido para esta última bactéria, *H. seropedicae* apresentou atividade nula em agar/2 e positiva, apesar de pequena, para agarx2. Com relação à presença de sacarose, constatou-se que com uma concentração de 30g/l obteve-se um resultado superior a do meio sem alterações. Isto pode indicar que, na simbiose com a cana-de-açúcar, a existência de certa concentração de sacarose pode vir a servir de incremento a FBN realizada por esta bactéria.



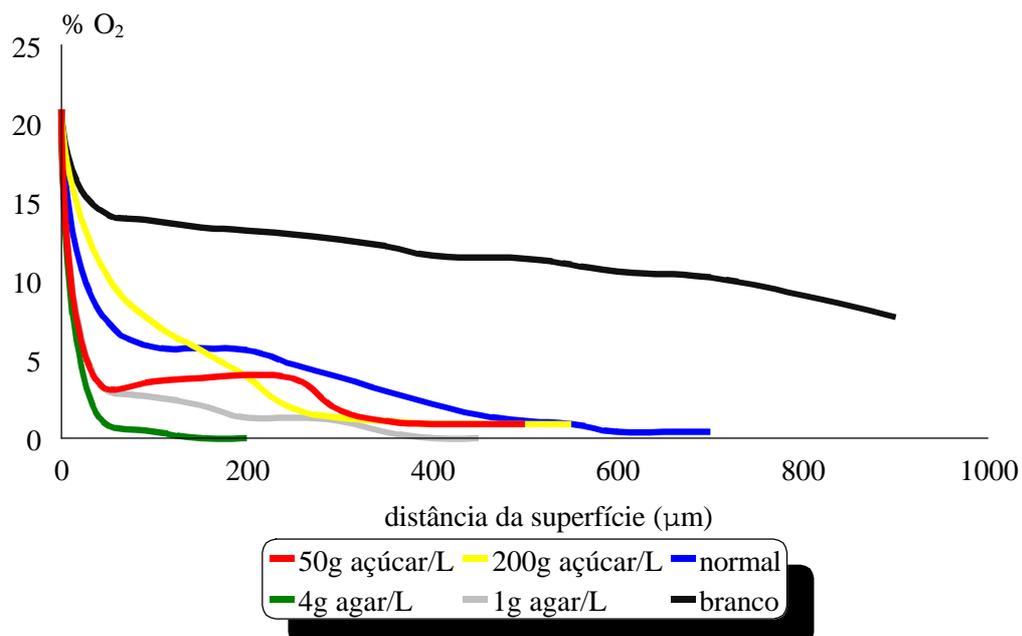
* após 24 horas

Fig.7- Concentração de oxigênio na película formada por bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura.



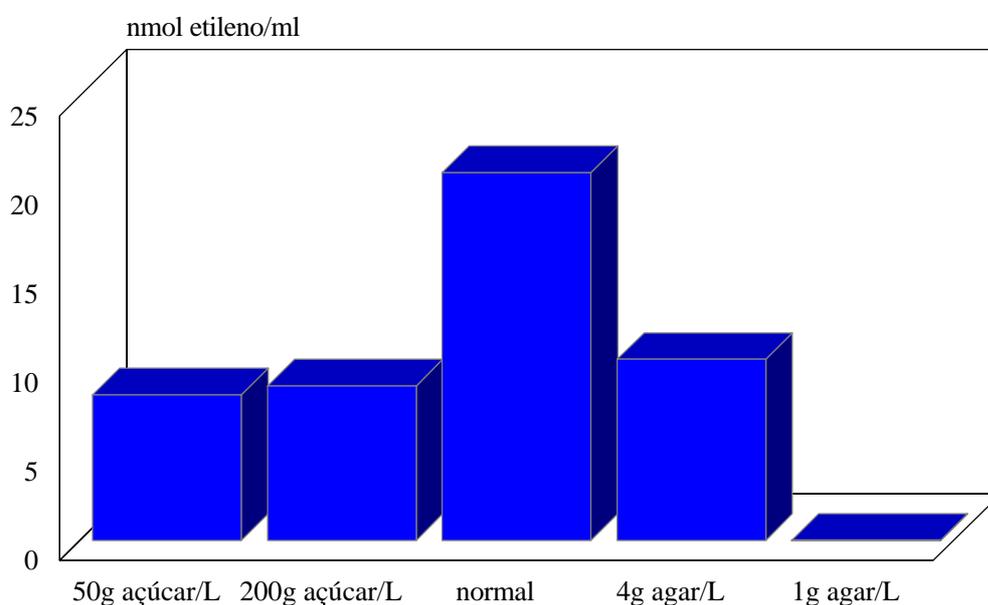
* 7 dias de crescimento

Fig.8- Concentração de oxigênio na película formada por bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura.



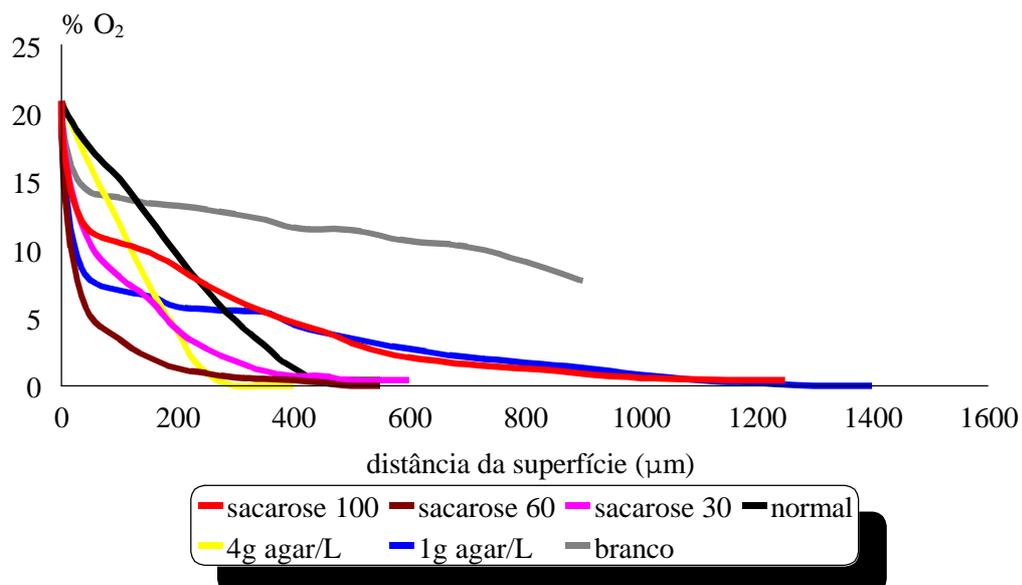
*5 dias de crescimento; normal= 100g açúcar/L e 2g agar/L

Fig.9- Concentração de oxigênio em cultura de *Acetobacter diazotrophicus* sob diferentes concentrações de agar e açúcar.



*5 dias de crescimento; normal= 100g açúcar/L e 2g agar/L

Fig.10- Atividade de redução de acetileno em culturas de *Acetobacter diazotrophicus*, em diferentes concentrações de açúcar cristal e agar.



*5 dias de crescimento, normal= 5g ác. málico/L e 2g agar/L

Fig.11- Concentração de oxigênio em cultura de *Herbaspirillum seropedicae* em diferentes concentrações de sacarose e agar.

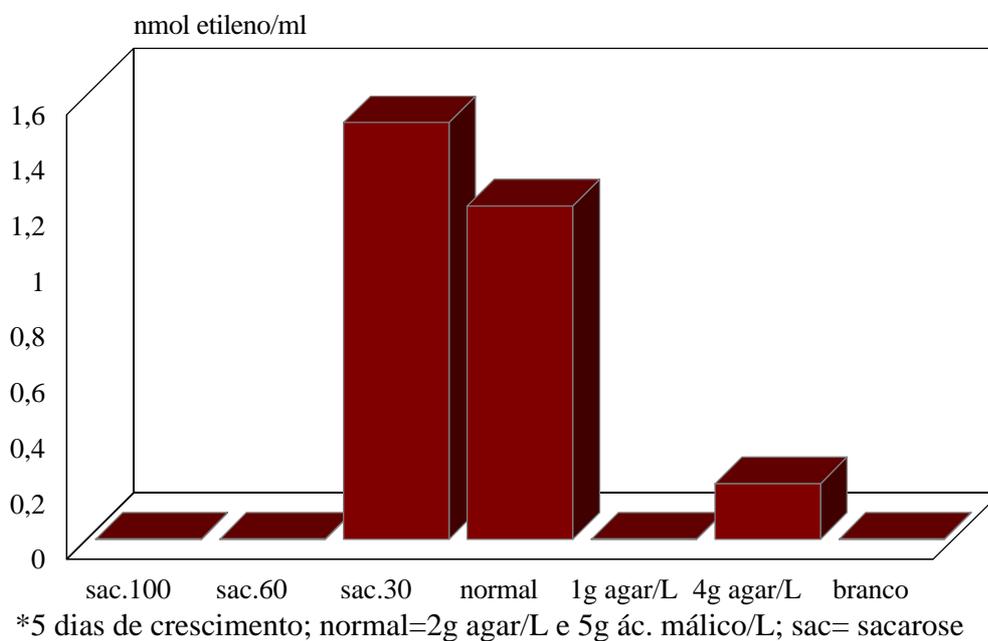


Fig.12- Atividade de redução de acetileno em *Herbaspirillum seropedicae*, em diferentes concentrações de sacarose e agar.

5. Considerações Finais

- **Vantagens e Desvantagens da utilização de Microeletrodos em estudos que visam a detecção de sítios de FBN**

1. A construção de um microeletrodo de oxigênio é feita manualmente. Portanto, cada microeletrodo possui sensibilidade diferente dos demais, necessitando de calibração individual.
2. O microeletrodo, por sua alta sensibilidade, inclusive a variações ambientais ou campos elétricos, deve ser utilizado cuidadosamente, buscando a melhor posição (mais estável) para a aferição.
3. O microeletrodo, pela alta fragilidade, principalmente sua ponta, pode ser usado com segurança em materiais macios.
4. Nas raízes de arroz, a medição do gradiente de O_2 pode ter sido “atrapalhada” devido a anatomia das raízes desse vegetal, que apresenta sistema de aerênquima, que fornece oxigênio para os tecidos, principalmente quando as raízes estão em condições de inundação.
5. Novos estudos devem ser realizados para a confirmação e comprovação dos resultados encontrados até o momento, além de melhor controle e padronização do experimento. Técnicas auxiliares, como cromatografia gasosa e microscopia, além de outras, podem contribuir para uma melhor análise dos resultados.

6. Conclusões

- A taxa de respiração das bactérias é variável, portanto, dentro da planta as populações podem estar ocupando micro-habitats diferentes.
- No interior dos nódulos estudados, a concentração de O_2 declina próximo a zero, condição ideal para a atividade da nitrogenase. Provavelmente, o oxigênio disponível está combinado com a leg-hemoglobina, protegendo a enzima contra a toxidez de oxigênio.
- Possivelmente, os sítios de FBN em raízes de gramíneas não devem ser fixos como em leguminosas, e sim variáveis, de acordo com o crescimento e desenvolvimento do vegetal. As raízes mais novas, sendo regiões metabolicamente

mais ativas, assim como regiões de crescimento e/ou meristemáticas, devem propiciar ambientes mais favoráveis a atividade da nitrogenase.

- Algumas bactérias, cultivadas em meio de cultura semi-sólidos, conseguem controlar diferencialmente a concentração de oxigênio do meio, tornando-o adequado à atividade da nitrogenase.

7. Referências Bibliográficas

- DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não leguminosas**. Brasília: Embrapa-SPI, Itaguaí-RJ: Embrapa-CNPAB, 1995. 60p.
- HAAKER, H. Biochemistry and physiology of nitrogen fixation. **Bioessays**, Cambridge, v.9, n.4, p112-117, 1988. .
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. eds. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.141-155 .
- OLIVARES, F.L.; BALDANI, V.L.; REIS, V.M.; BUENO Jr., F.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J. Ecologia das bactérias diazotróficas endofíticas do gênero *Herbaspirillum*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FITOPATOLOGIA, 26, 1993. Aracaju. **Resumo...** Fitopatologia Brasileira, Brasília, v.18,1993. Suplemento. Resumo.
- OLIVEIRA, O.C. de. **Quantificação da fixação biológica de nitrogênio em arroz inundado**. Itaguaí: UFRRJ, 1994. 135p. Tese de Mestrado.
- SILVA, L.G. da; REIS, V.M.; REIS Jr., F.B. dos; BODDEY, R.M. Ontogenic variation of diazotrophic bacteria in sugar cane (*Saccharum* spp.)tissues. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS- THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION. **Abstracts...** 1995, p.234-235.
- URQUIAGA, S.; CRUZ, K.H.S.; BODDEY, R.M. Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen balance estimates. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.56, p.105-114, 1992.

WITTY, J.F.; SKOT, L.; REVSBERM, N.P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.38, n.192, p.1129-1140, 1987.

WITTY, J.F.; MINCHIN F.R. Measurement of nitrogen fixation by the acetylene reduction assay; myths and mysteries. In: BECK, D.P.; MATERON, L.A. eds. **Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture**. IRARDA, 1988. p.331-344.