

A Avaliação da Fixação Biológica de N₂
Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas
Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno:
História, Teoria e Prática





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

*ISSN 1517-8498
Dezembro/2007*

Documentos 245

**A Avaliação da Fixação Biológica de N₂
Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas
Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno:
História, Teoria e Prática**

**Lúcia Helena Boddey
Robert Michael Boddey
Bruno José Rodrigues Alves
Segundo Urquiaga**

***Seropédica – RJ
2007***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Kátia Regina dos Santos Teixeira

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2007): 50 exemplares

B666l Boddey, Lúcia Helena

A avaliação da fixação biológica de N₂ associada a leguminosas e não-leguminosas utilizando a técnica da redução do acetileno: história, teoria e prática / Robert Michael Boddey, Bruno José Rodrigues Alves, Segundo Urquiaga. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007. 43 p. (Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498 ; 245)

1. Fixação biológica de nitrogênio (FBN). 2. ARA. I. Boddey, R. M., colab. II. Alves, B. J. R., colab. III. Urquiaga, S., colab. IV. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). V. Título. VI. Série.

CDD 572.545

Autores

Lúcia Helena Boddey

Bióloga, PhD, Professora Visitante, Setor de Citologia Vegetal, Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT), CBB, Av. Alberto Lamego, 2000 - Campos dos Goytacazes – RJ, CEP 28013-600

Bruno José Rodrigues Alves

Eng. Agrônomo, PhD, Pesquisador da Embrapa Agrobiologia
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ
e-mail: bruno@cnpab.embrapa.br

Robert Michael Boddey.

Químico Agrícola, PhD. pesquisador da Embrapa Agrobiologia
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ
e-mail bob@cnpab.embrapa.br

Segundo Urquiaga

Eng. Agrônomo, PhD. pesquisador da Embrapa Agrobiologia
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505
23851-970 – Seropédica/RJ
e-mail urquiaga@cnpab.embrapa.br

Apresentação

A preocupação crescente da sociedade com a preservação e a conservação ambiental tem resultado na busca pelo setor produtivo de tecnologias para a implantação de sistemas de produção agrícola com enfoques ecológicos, rentáveis e socialmente justos. O enfoque agroecológico do empreendimento agrícola se orienta para o uso responsável dos recursos naturais (solo, água, fauna, flora, energia e minerais).

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia orienta sua programação de P&D para o avanço de conhecimento e desenvolvimento de soluções tecnológicas para uma agricultura sustentável.

O documento 245/2007 apresenta a história, aspectos teóricos e práticos de uma técnica de grande importância nos estudos da fixação biológica de nitrogênio. Com um longo período de uso de mais de 40 anos a técnica de redução do acetileno já foi muito criticada e em alguns momentos achou-se que ela não seguiria sendo uma ferramenta de apoio aos estudos em fixação biológica de nitrogênio. O presente trabalho mostra que ocorreu o contrário e que ainda hoje a técnica auxilia em muito aos estudos que buscam avaliar a eficiência da simbiose entre bactérias diazotróficas e plantas. Portanto, para todos aqueles envolvidos com o tema a leitura deste documento serve para agregar informações úteis para ampliar os conhecimentos sobre a avaliação da fixação biológica de nitrogênio em diversos experimentos científicos.

José Ivo Baldani

Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

1. Introdução	7
2. Vantagens da técnica de redução de acetileno	8
3. Aplicações da técnica de redução de acetileno.....	9
3.1. Considerações gerais.....	9
3.1.1. Pressão parcial do acetileno.....	9
3.1.2. Evolução do Hidrogênio.....	10
3.2. Culturas de bactérias	11
3.3. Leguminosas nodulantes	12
3.4. Não-leguminosas nodulantes.....	17
3.5. Gramíneas.....	17
3.5.1. Raízes destacadas	17
3.5.2. Sistemas <i>in situ</i> e amostras de solo intacto (“soil cores”)	19
3.5.3. Produção endógena de acetileno	22
4. Conclusões	24
1. Saturação da nitrogenase com acetileno.....	24
2. Declínio da atividade da nitrogenase pelo acetileno.....	24
3. Perturbação	24
4. Tempo de incubação.....	24
5. Difusão de etileno e outros gases	25
6. Condições ambientais	25
7. Cianobactérias.....	25
8. Bactérias oxidando alcanos	25
9. Produção endógena de acetileno.....	25
10. Evolução de hidrogênio.....	26
5. Apêndice	26
Cálculo da Atividade de Redução de Acetileno	26
5.1. Interpretação quantitativa dos cromatogramas.....	26
5.2. Cálculo da atividade de redução de acetileno	27
5.3. Correção para vazamento de gases após a incubação.....	28
5.4. Cálculo da taxa de redução de acetileno na presença de um padrão interno (propano) .	28
5.5. Correção para vazamento de gases durante a incubação	30
6. Referências Bibliográficas	31

A Avaliação da Fixação Biológica de N₂ Associada a Leguminosas e Não-Leguminosas Utilizando a Técnica da Redução do Acetileno: História, Teoria e Prática

*Lúcia Helena Boddey
Robert Michael Boddey
Bruno José Rodrigues Alves
Segundo Urquiaga*

1. Introdução

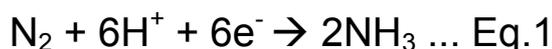
O dinitrogênio (N₂) era considerado por Lavoisier e outros químicos subsequentes dos séculos 18 e 19 como um gás basicamente inerte. Ainda na língua alemã o nitrogênio é chamado “stickstoff” que significa material fixo (em inglês, fixed stuff). Os únicos processos que existem na natureza que converte este gás para formas que podem ser assimiladas por plantas são as descargas elétricas na atmosfera e o processo catalisado pela enzima nitrogenase presente em algumas células procarióticas (bactérias e actinomicetos). A enzima nitrogenase é um portento na evolução biológica, capaz de reduzir N₂ a amônia, processo conseguido pelo homem somente com altas temperaturas e pressões. O processo industrial da redução de N₂ a amônia, desenvolvido no começo do século 20 na Alemanha, por Fritz Haber, requer temperaturas de aproximadamente 800 °C e pressões de 500 atmosferas, além da presença de um catalisador contendo o elemento molibdênio. Em comparação, a enzima nitrogenase funciona nos microorganismos em temperaturas encontradas em ecossistemas terrestres e aquáticos e numa pressão atmosférica de cerca de 1 atmosfera.

MOZEN & BURRIS (1954) descobriram que o sistema enzimático de nitrogenase era capaz de reduzir não somente N₂ mas também óxido nitroso (N₂O) a N₂. Na década seguinte, foi demonstrado que a nitrogenase também poderia reduzir prótons (H⁺) a H₂, azida de sódio (NaN₃) a N₂ e NH₃, e acetileno a etileno (DILWORTH, 1966; SCHÖLLHORN & BURRIS, 1966). Subseqüentemente, outros substratos da nitrogenase foram descobertos, incluindo cianeto e ciclopropeno (ver revisão de BURRIS, 1988)

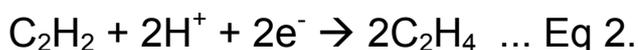
No estudo sobre substratos para a nitrogenase, DILWORTH (1966) e SCHÖLLHORN & BURRIS (1966) descobriram que o acetileno inibia a

redução de N₂ pela nitrogenase, e que o acetileno (C₂H₂) era reduzido a etileno (C₂H₄). Esses autores sugeriram e demonstraram que esse efeito antagônico poderia dar origem a uma nova técnica para medição da atividade da nitrogenase, uma vez que o produto etileno poderia ser detectado com alta sensibilidade com um cromatógrafo de gás equipado com um detetor de ionização de chama. Uma outra vantagem do substrato acetileno, em contraste ao cianeto ou azida de sódio, é que não inibe outras reações metabólicas nas células dos microrganismos.

A reação normalmente catalisada pela nitrogenase *in vivo* é:



Se a nitrogenase é exposta ao acetileno na ausência de N₂, a reação que ocorre é:



HARDY & KNIGHT (1966) descobriram que o consumo de ATP por esse sistema enzimático é independente do substrato que está sendo reduzido (N₂ ou C₂H₂). HARDY et al. (1968) e BURNS (1969) também demonstraram que a energia de ativação para o sistema da nitrogenase era independente do substrato. Isso significa que a atividade da nitrogenase não se modifica quando o N₂ é substituído pelo C₂H₂, os produtos é que são outros. Foi também determinado que o etileno é o único produto da redução do acetileno pela nitrogenase, e que o etileno não inibe a fixação do N₂ e nem é reduzido pela nitrogenase (HARDY et al., 1968). A exposição de sistemas contendo nitrogenase (sejam elas plantas, organismos ou extratos de células livres) ao acetileno, seguido de medição da taxa de produção de etileno, se tornou então um método comumente utilizado para avaliar a fixação de N₂. A história do desenvolvimento inicial dessa técnica foi contada por BURRIS (1975; 1988). Um grande número de aplicações dessa técnica foi descrito por HARDY et al. (1973), e recentemente seu potencial foi evidenciado por VESSEY (1994).

2. Vantagens da técnica de redução de acetileno

A maior vantagem da técnica de redução de acetileno na medição da atividade da nitrogenase é sua grande sensibilidade (taxas da ordem de nmoles de C₂H₄ por hora são facilmente detectáveis) e velocidade quando comparada com outras técnicas existentes. Para detalhes das outras técnicas, ver as revisões CHALK (1985), RENNIE (1986),

VOSE & VICTORIA (1986), SHEARER & KOHL (1986), BODDEY (1987), DANSO (1988), PEOPLES et al. (1989), BODDEY et al. (1994, 1995, 2000), CHALK & LADHA (1999).

A grande sensibilidade da técnica de redução de acetileno é alcançada pela medição do C_2H_4 produzido, através de cromatografia gasosa, como é descrito no apêndice deste documento. Teoricamente, de acordo com HARDY et al. (1968), a técnica é tão sensível que permite detectar a atividade da nitrogenase por duas ou três células de *Azotobacter*.

Além do cromatógrafo de gás, que é um instrumento comum atualmente, os equipamentos e materiais necessários para essa técnica são, em geral, simples e não muito dispendiosos. A análise é muito rápida. Por exemplo, a atividade de redução de acetileno (ARA) de uma leguminosa fixadora ativa pode ser facilmente determinada em menos de cinco minutos. A análise das amostras é mais rápida ainda (entre 60 e 120 segundos), o que permite muitas determinações por dia.

3. Aplicações da técnica de redução de acetileno

3.1. Considerações gerais

3.1.1. Pressão parcial do acetileno

É necessário expor o sistema de fixação de N_2 a uma concentração de acetileno suficiente para saturar a enzima e obter a máxima ARA. Uma pressão parcial de acetileno (pC_2H_2) de 0,025 a 0,100 atm (25 até 100 mL L^{-1} à pressão normal da atmosfera) é usualmente suficiente para obter-se a máxima taxa de produção de C_2H_4 (HARDY et al., 1968). Todavia, isso não é o que sempre acontece. Por exemplo, alguns isolados de *Beijerinckia* foram descritos por SPIFF & ODU (1973) possuindo valores de K_m tão elevados como 0,74 atm de acetileno. Isso foi atribuído aos problemas de difusão de acetileno na goma viscosa produzida por esse organismo.

Se N_2 está presente na atmosfera de incubação, a pC_2H_2 necessária para saturar a enzima é um pouco mais alta do que se Argônio ou Hélio substituíssem N_2 . Isso se deve à competição do N_2 com C_2H_2 pelos sítios enzimáticos. Na prática, uma atmosfera contendo 100 a 150 mL. L^{-1} de acetileno é usualmente suficiente para obter máxima

ARA (HARDY et al., 1973; DAY & DÖBEREINER, 1976; BODDEY et al., 1978).

3.1.2. Evolução do Hidrogênio

Levando-se em consideração o número de elétrons necessários para a redução de N_2 e C_2H_2 (ver equações 1 e 2), deduz-se que um sistema capaz de reduzir uma molécula de N_2 para duas moléculas de amônia por unidade de tempo deve, nas mesmas condições, reduzir três moléculas de acetileno para três de etileno. Valores próximos a essa proporção teórica – Atividade de Redução de Acetileno (ARA): Atividade de Fixação de Nitrogênio (AFN) -têm sido publicados, porém comumente próximos de 4:1 (HARDY et al., 1973; BURRIS, 1974). Esse desvio se deve principalmente à inibição da evolução do hidrogênio pelo acetileno.

Está bem estabelecido que o hidrogênio é produzido pela nitrogenase incubada em N_2 (ou ar), na ausência de acetileno, tanto em preparados livres de células (BULEN et al., 1965; BERGERSEN, 1966), como em células intactas e nódulos de leguminosas (HOCH et al., 1960; BERGERSEN, 1963; DIXON, 1968; DART & DAY, 1971). Essa evolução de hidrogênio é catalisada pela nitrogenase e é simultânea à redução de nitrogênio pela mesma enzima. Isso significa que parte da atividade da nitrogenase não resulta na formação de amônia. Entretanto, o acetileno inibe a evolução do hidrogênio quase que completamente quando $pC_2H_2 = 0,20$ atm (SCHUBERT & EVANS, 1976). Assim, quando a atividade da nitrogenase ocorre em atmosfera ambiente, parte do suprimento de ATP da nitrogenase é desviada da redução de nitrogênio para a produção de hidrogênio, enquanto que em uma atmosfera contendo acetileno, todo o ATP é envolvido na produção de etileno. Isso explica porque ARA: FBN é geralmente maior que 3:1.

A proporção de atividade da nitrogenase envolvida na produção hidrogênio varia com o organismo, estágio e condições de crescimento. Parte ou todo o hidrogênio pode ser reciclado (WALKER & YATES, 1978), recuperando um pouco da energia perdida. Assim, o desvio da redução de 3:1 da relação ARA: FBN varia com os organismos e condições de crescimento. Entretanto, normalmente existem erros maiores no uso desta técnica, e o uso de uma relação de quatro moles de acetileno reduzidos a um mol de nitrogênio fixado é uma aproximação razoável.

3.2. Culturas de bactérias

A análise da ARA de culturas fixadoras de N_2 apresenta alguns problemas. Se as culturas estão em tubos, estes podem ser fechados usando-se uma rolha de borracha perfurável (ex. Suba-Seal®) e o acetileno introduzido. Se a cultura está em uma placa, toda a placa pode ser incubada em uma redoma, dessecador ou mesmo num saco plástico.

A presença de N fixado em um sistema impede a síntese da nitrogenase em células intactas de diazotrofos (POSTGATE, 1971; DAESCH & MORTENSON, 1972). O oposto ocorre quando células de organismos fixadores de nitrogênio são crescidas em baixas concentrações de amônia; a síntese de nitrogenase aumenta e, portanto, a atividade também. Deste modo, a atividade da nitrogenase de *Azotobacter chroococum* e *Anabaena cylindrica* é mais alta em células pré-incubadas em argônio do que em nitrogênio (DALTON & POSTGATE, 1969; NEILSEN et al., 1971; SMITH & EVANS, 1970). Como consequência, quando as células de diazotrofos são incubadas em acetileno, a produção de amônia resultante da redução de nitrogênio é inibida, e ocorre um aumento na atividade da nitrogenase. DAVID & FAY (1977) observaram um aumento de 10 vezes na ARA de *Azotobacter vinelandii*, de uma análise inicial de 30 minutos, para uma análise semelhante efetuada depois de três horas de exposição a 0,10 atm de C_2H_2 . Este aumento na atividade da nitrogenase, estimulado pelo acetileno, é chamado de repressão da nitrogenase, e pode ser evitado se o tempo de incubação for curto. DAVID & FAY (1977) recomendam que a incubação não deva exceder duas horas.

Até agora não há nenhuma literatura sobre um microrganismo capaz de reduzir o acetileno a etileno, que não seja capaz de reduzir N_2 a NH_3 (amônia). O inverso, porém, não é verdadeiro. O teste de redução de acetileno não foi capaz de mostrar atividade da nitrogenase em certas espécies de *Methylosinus* (DE BONT & MULDER, 1974), se bem que tenha sido verificado que este organismo era capaz de fixar $^{15}N_2$. Em trabalhos subseqüentes, estes autores (DE BONT & MULDER, 1976) descobriram que isso ocorria devido à inibição da oxidação do metano pelo acetileno, o que impediria o suprimento de energia e reduziria a atividade da nitrogenase. Deste fato, decorre que a análise da redução de acetileno vai grosseiramente subestimar, ou mesmo falhar, na determinação da fixação de nitrogênio por

microrganismos que utilizam a oxidação do metano e/ou outros alcanos para seu suprimento de energia.

É possível, também, que o C_2H_2 tenha efeito em outras bactérias fixadoras de nitrogênio. Muito pouco, no entanto, foi estudado a esse respeito. BROUZES & KNOWLES (1971) encontraram evidências de que o C_2H_2 inibe o crescimento de *Clostridium* no solo e, por consequência, a atividade da nitrogenase.

3.3. Leguminosas nodulantes

Até os anos 80 do século passado, a maioria dos autores recomendava a análise da atividade da redução de acetileno pela colocação de plantas intactas ou sistemas de raízes extraídas de leguminosas em recipientes fechados, na presença de 100 a 200 ml C_2H_2 L⁻¹ (HARDY et al., 1968; BERGERSEN, 1970; MAGUE & BURRIS, 1972; DART et al., 1972; HARDY et al., 1973). Os tempos de incubação recomendados nesta técnica tradicional são 30 minutos ou uma hora, baseados na observação da taxa linear aparente de redução do acetileno neste período.

Entretanto, Minchin et al. (1983a) usaram um sistema de análise em fluxo contínuo (constante), onde a concentração do etileno nas saídas dos recipientes representa a taxa de redução do acetileno. Neste sistema, a concentração do etileno responde muito rapidamente às mudanças na taxa de redução do acetileno, e estes autores observaram que o sistema radicular de muitas leguminosas apresenta três fases: 1. um rápido aumento na taxa de produção de etileno, durante o tempo necessário para que a concentração do acetileno, no frasco de análise, cresça de zero até o seu valor de equilíbrio; 2. um curto espaço de tempo durante o qual a taxa de redução do acetileno se mantém constante; e 3. quando ocorre um declínio da taxa de redução até um novo estado de equilíbrio (Figura 1). Este declínio é acompanhado por uma queda paralela na taxa de respiração (produção de CO_2), que também é observada se o mesmo sistema radicular destas plantas for exposto a argônio ou hélio. Foi concluído, portanto, que a queda na atividade na nitrogenase seria consequência da falta de N_2 na atmosfera, ou da inibição da redução de N_2 pelo acetileno. Eles sugeriram que a paralisação da produção de amônio pelo sistema da nitrogenase causaria um aumento gradativo na resistência das membranas à difusão do oxigênio para os bacteróides (WITTY et al., 1984), inibindo a atividade da nitrogenase.

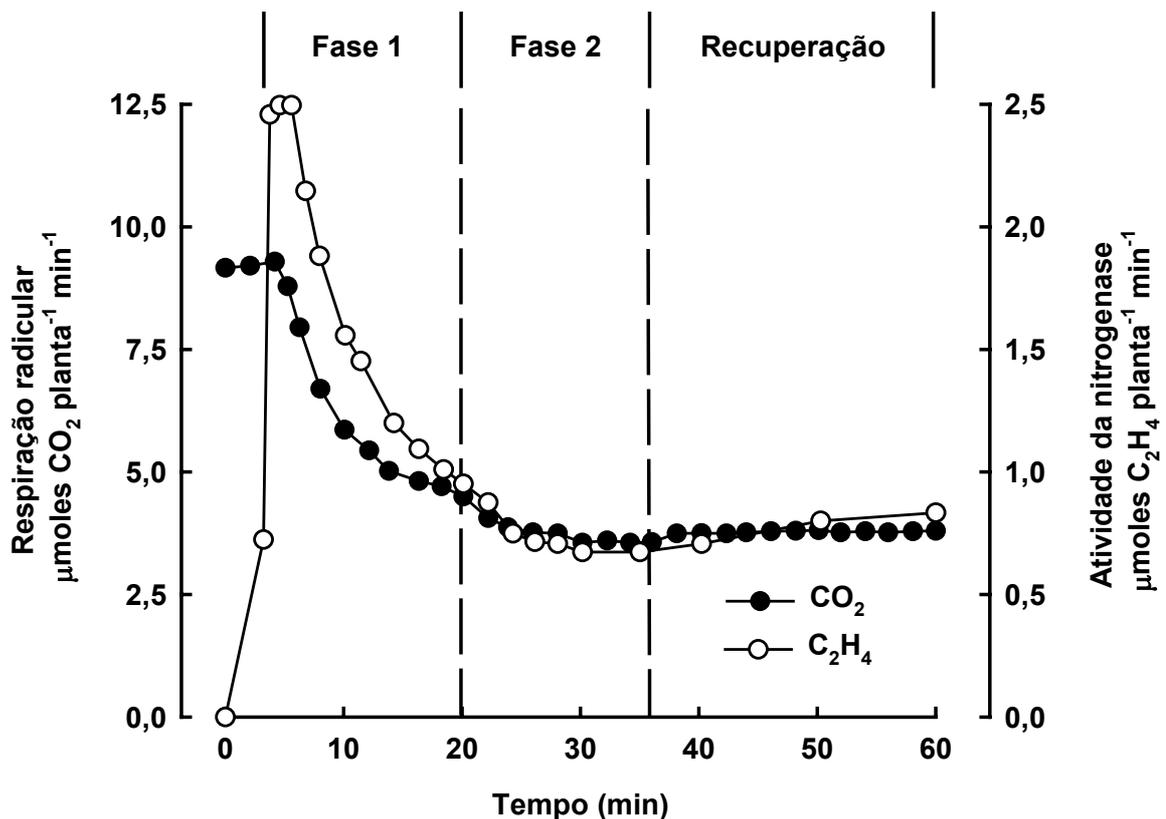


Figura 1. Taxa de atividade de nitrogenase e respiração de raízes intactas de trevo branco expostas a um fluxo contínuo de ar contendo 10 % de acetileno.

Considerando o uso prático da técnica de redução de acetileno, é evidente que a taxa de produção de etileno alcançada depois que a concentração de acetileno no recipiente for estabilizada (mas antes que a taxa de respiração comece a cair – Figura 1), reflete a atividade da nitrogenase do sistema antes de sua exposição ao acetileno.

Se existe um declínio na atividade da nitrogenase induzido pelo acetileno, esta taxa máxima de produção de etileno usualmente só leva uns poucos minutos e somente pode ser estimada efetivamente usando-se um sistema de fluxo contínuo. MINCHIN et al. (1983a) demonstraram que muitos sistemas não exibem este declínio na atividade induzida pelo acetileno, e que este comportamento variou com estirpes de rhizobium em um único hospedeiro, e com vários hospedeiros inoculados com a mesma estirpe. Isto, entretanto, não foi correlacionado com a taxonomia ou com a origem geográfica das espécies. Também têm sido observadas variações durante o curso de crescimento da planta e em diferentes condições de crescimento. Por isso, Minchin e seus colegas recomendaram que para comparações de estirpes, espécies, cultivares, estágios e condições de crescimento,

é sempre necessário o uso de um sistema de análise através de fluxo contínuo.

Quando a produção de etileno é medida por acumulação em um sistema fechado, é difícil detectar o rápido aumento da atividade seguida do declínio gradual. Isso é claramente ilustrado quando os valores teóricos para um declínio de 50% em um período de análise de 60 minutos são cotados como valores cumulativos (MINCHIN et al., 1983b). O resultado é uma correlação linear (Figura 2). A leve inclinação da curva cumulativa é efetivamente mascarada por um erro de 10%, devido à variabilidade das amostras e/ou de um erro experimental.

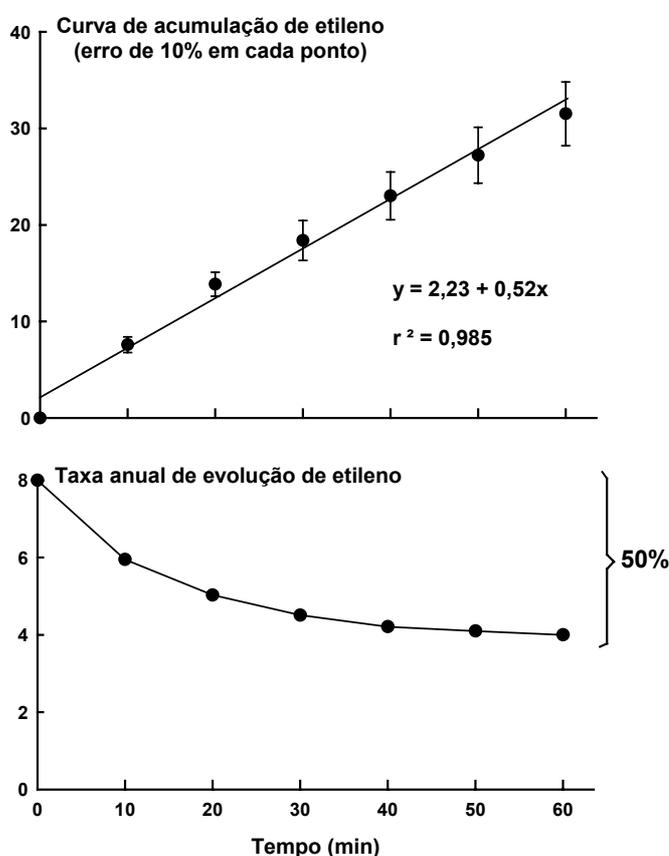


Figura 2. Comparação do acúmulo progressivo de etileno sob uma atmosfera de 10 % de acetileno, em que a taxa de redução de acetileno diminui por 50 % durante os primeiros 30 minutos de incubação (A), com a verdadeira taxa de evolução de etileno (B).

No uso da técnica de redução de acetileno com fluxo contínuo, ou mesmo com a técnica tradicional, as plantas são decapitadas e as raízes removidas do solo (ou de areia, vermiculita, etc.). A suposição feita é que esses distúrbios causados à planta e aos nódulos não têm efeito significativo na atividade da nitrogenase. Os estudos iniciais

feitos sobre este assunto mostraram concordância entre os resultados obtidos usando plantas intactas e raízes destacadas, mas estes experimentos não foram feitos usando-se fluxo contínuo (BERGERSEN, 1970; MAGUE & BURRIS, 1972; HARDY et al., 1973). Entretanto, em alguns estudos posteriores ainda utilizando a técnica tradicional de acúmulo de acetileno, foi verificado que plantas intactas e não perturbadas mostraram atividades consideravelmente mais altas que raízes destacadas das mesmas plantas (TRINICK et al., 1976; WYCH & RAINS, 1978; HABTE, 1983). Outros estudos de MINCHIN et al. (1986) utilizando fluxo contínuo mostraram claramente que tanto decapitação quanto remoção das plantas do meio provocam uma queda grande na atividade da nitrogenase.

Em resumo, o uso da técnica de redução de acetileno para a quantificação da atividade da nitrogenase associada à leguminosas noduladas, somente pode ser aplicada se as plantas não são removidas do solo e nem decapitadas, e a técnica de fluxo contínuo é utilizada. Como é extremamente difícil atender a todas essas exigências, ainda em condições de casa-de-vegetação, e sendo impossível no campo, a utilização da técnica torna-se quase inútil para a verdadeira quantificação da fixação biológica de N_2 com leguminosas. Também não pode ser esquecido que técnica avalia a atividade da nitrogenase somente durante uns poucos minutos do ensaio, sendo necessários estudos da flutuação diurna e durante a ontogenia das plantas para se alcançar uma estimativa de todo nitrogênio fixado durante o ciclo da cultura.

Por outro lado, é bom mencionar que existem muitos trabalhos que descrevem boas correlações entre o acúmulo de N total ou de peso seco com a ARA (estimada pela técnica tradicional usada por MAGUE & BURRIS, 1972; HARDY et al., 1973), e é claro que esta técnica ainda possui uma grande utilidade semi-quantitativa para detecção de grandes diferenças entre tratamentos (VAUGHN & JONES, 1976; SPRENT & BRADFORD, 1977; HAM, 1977; HUNGRIA & NEVES, 1986). A conclusão de Minchin e seus colegas (MINCHIN et al., 1986; WITTY & MINCHIN, 1988) foi que a utilização da técnica de redução de acetileno é inútil para a quantificação da atividade de nitrogenase em plantas, ou sistemas radiculares nodulados expostos ao acetileno em recipientes fechados. Ainda, pode-se dizer que é de utilização extremamente limitada para fins de comparação de diferentes sistemas ou tratamentos. Entretanto, VESSEY (1994) defendeu o uso dessa técnica, na forma tradicional de acumulação de etileno, em

recipientes fechados para fins comparativos, se forem utilizados certos cuidados. Ele destacou a simplicidade e a sensibilidade da técnica em comparação com técnicas isotópicas, que necessitam medições da abundância ou enriquecimento do ^{15}N com espectrômetros de massa ou emissão, instrumentos mais caros e de mais difícil manuseio do que um cromatógrafo de gás. Da mesma forma que mencionado por MINCHIN et al. (1983a), VESSEY (1994) afirmou que, em muitas situações, muitas leguminosas noduladas não exibem um declínio na atividade de nitrogenase induzida pelo acetileno, e mostrou resultados que indicaram que é possível detectar este declínio em atividade induzida pela presença de acetileno (ou a ausência de N_2) avaliando o acúmulo de etileno em recipientes fechados, sendo as amostras retiradas a cada 10 minutos após a introdução do acetileno. Caso não ocorra uma queda da atividade nos primeiros 30 minutos do ensaio, teoricamente, a atividade neste período representa a verdadeira atividade de nitrogenase.

Em vista destes resultados e outros, VESSEY (1994) recomendou a utilização da técnica da redução de acetileno na forma tradicional para fins comparativos, mas com os seguintes cuidados:

1. Amostras da atmosfera do recipiente devem ser retiradas pelo menos a cada 10 minutos, e o ensaio não deve durar mais de 30 minutos.
2. As plantas devem ser perturbadas o mínimo possível. Para isso, dar a preferência aos seguintes sistemas, nesta ordem: a) sistemas intactos solo/planta, b) sistemas radiculares nodulados intactos ainda não retirados do solo, c) sistemas radiculares nodulados intactos retirados do solo.
3. O uso de nódulos destacados ou cortados não é recomendado.

VESSEY (1994) finalmente concluiu que “aceitar a invalidação total da técnica “fechada” de redução de acetileno incorre-se em um grande prejuízo para a pesquisa em fixação biológica de nitrogênio. Isso é especialmente verdade nos países em desenvolvimento onde as facilidades de utilizar outras tecnologias podem não existir, e onde a pesquisa rudimentar nesta área pode ter o maior impacto”. Os autores deste documento estão em acordo com esta conclusão.

3.4. Não-leguminosas nodulantes

Além da simbiose leguminosas-*Rhizobium*, existem dois outros tipos de simbiose que apresentam nódulos fixadores de nitrogênio: *Parasponia* com *Rhizobium* e as associações actinorrízicas de actinomicetos do gênero *Frankia* com várias espécies dos gêneros *Alnus*, *Myrica*, *Ceanothus*, etc.

Não existe, até o momento, nenhuma informação se estes sistemas exibem o declínio na atividade da nitrogenase induzido pelo acetileno descrito por MINCHIN et al. (1983a). Por esta razão, não se sabe se são válidas amostragens da atividade da nitrogenase em recipientes fechados, ou se é necessário o uso de fluxo contínuo.

3.5. Gramíneas

3.5.1. Raízes destacadas

Nos últimos 30 anos tem havido um crescente interesse no estudo da fixação de nitrogênio associado a gramíneas, cereais e outras plantas superiores não noduladas (NEYRA & DÖBEREINER, 1977; VAN BERKUM & BOHLOOL, 1980; BODDEY & DÖBEREINER, 1984, 1988; DART, 1986; BASHAN & LEVANONY, 1990; BALDANI et al., 1997; REIS et al., 2000). Se as raízes dessas plantas são retiradas do solo e exposta a C_2H_2 , elas usualmente mostram ARAs iniciais muito baixas (YOSHIDA & ANCAJAS, 1970; DÖBEREINER et al., 1972; DAY et al., 1975; VAN BERKUM & SLOGER, 1979). Entretanto, após a pré-incubação por algumas horas sob baixa pressão parcial de oxigênio (pO_2), é observada a produção de etileno a uma velocidade aproximadamente constante (DÖBEREINER et al., 1972; 1975; PEREIRA et al., 1981). Tem sido um assunto de considerável controvérsia saber se a atividade da nitrogenase assim determinada é proporcional à atividade das plantas (BARBER et al., 1976; OKON et al., 1977; DÖBEREINER, 1978; VAN BERKUM & BOHLOOL, 1980).

Alguns autores (DÖBEREINER et al., 1972; NERY et al., 1977; SOUTO & DÖBEREINER, 1985) verificaram uma boa correlação, ou pelo menos similaridade (BODDEY et al., 1978), entre a atividade em cilindros intactos (soil cores) e a atividade de raízes extraídas pré-incubadas. Entretanto, outros pesquisadores verificaram que a ARA em raízes pré-incubadas em baixa pO_2 é muito maior do que em cilindros intactos (KOCH, 1977; BARBER et al., 1976; ESKEW &

TING, 1977; TJEPKEMA & VAN BERKUM, 1977; VAN BERKUM & DAY, 1980). Ao assumir que a maior atividade nos cilindros indica que a atividade em raízes extraídas está subestimando a verdadeira atividade da nitrogenase na hora da amostragem, pressupõe-se que a análise usando cilindros reflete, mais precisamente, ARA *in situ*.

WANI et al. (1983) demonstraram que cilindros retirados do solo com plantas de sorgo e milho e sendo imediatamente analisados, mostraram ARAs significativamente menores do que quando as plantas são crescidas desde a semente dentro dos cilindros, e estes são cuidadosamente suspensos e imediatamente analisados. Estes últimos cilindros, não perturbados, tiveram atividades de 10 a 23 vezes maiores do que os cilindros que são enterrados na hora da análise (cilindros perturbados). Entretanto, existem alguns trabalhos nos quais a ARA foi medida em plantas intactas e não perturbadas, e raízes extraídas e pré-incubadas em baixa pO_2 mostraram atividades muito mais altas (KOCH, 1977; TJEPKEMA & VAN BERKUM, 1977). Estes dados indicaram que a ARA de raízes pré-incubadas pode superestimar a atividade da nitrogenase *in situ*, e esta técnica não pode ser recomendada. Os problemas associados com o uso da técnica de ARA em raízes extraídas e pré-incubadas à baixa pO_2 foram discutidos detalhadamente por BODDEY (1987).

Foi mostrado que a atividade da nitrogenase associada com raízes destacadas (e pré-incubadas à baixa pO_2) de *Paspalum notatum*, *Digitaria decumbens*, *Zostera marina* e arroz inundado era máxima à baixa, mas não zero, pressão parcial de oxigênio (DÖBEREINER et al., 1972; DAY, 1977; BODDEY et al., 1978; CAPONE & BUDIN, 1982). O mesmo resultado foi encontrado para arroz inundado (TROLLDENIER, 1977; VAN BERKUM & SLOGER, 1982), milho e sorgo (BOUTON et al., 1985; ZUBERER & ALEXANDER, 1986) usando a técnica de redução de acetileno em sistemas intactos e não perturbados.

O fato da atividade da nitrogenase associada a gramíneas ser sensível a alterações na pO_2 pode ser uma provável explicação do porquê dos distúrbios físicos dos cilindros intactos do solo poderem baixar drasticamente as medidas de ARA (WANI et al., 1983). Também tem sido usada para explicar a baixa ARA inicial de raízes destacadas (DÖBEREINER et al., 1972). Contudo, quando as raízes foram removidas do solo numa atmosfera de 100% N_2 (com "glove box"), as raízes destacadas continuaram apresentando uma ARA inicial muito baixa ou igual a zero (DÖBEREINER et al., 1972). A causa deste

período latente (lag) tem sido extremamente discutida, sem obtenção de conclusões claras (DÖBEREINER et al., 1972; DÖBEREINER, 1978; VAN BERKUM & BOHLOOL, 1980; PATRIQUIN, 1982). Enquanto este período latente não for bem compreendido, permanecerão as dúvidas sobre a significância dos dados obtidos de experimentos utilizando raízes destacadas.

VAN BERKUM & SLOGER (1979, 1981, 1983) observaram velocidades lineares imediatas de atividade de redução de acetileno quando raízes destacadas de milho, arroz selvagem (*Zizania aquática*), arroz inundado e gramas aquáticas (*Scirpus olneyi* e *Spartina alterniflora*) foram expostas a acetileno em presença do ar. Todas as atividades medidas foram baixas (quase todas inferiores a $10 \text{ nmoles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g peso seco raiz}^{-1} \text{ h}^{-1}$), mas os autores sugerem que estas atividades refletem a verdadeira atividade *in situ* de raízes de plantas anteriormente amostradas. Em vista do fato de que todas as associações gramínea/diazotrofo estudadas até agora mostraram sensibilidade à $p\text{O}_2$ atmosférico (0,20 atm), parece ilógico afirmar que um experimento com raízes destacadas em $p\text{O}_2$ atmosférico irá produzir atividades iguais àquelas do sistema intacto (esta observação é especialmente válida para plantas aquáticas e arroz inundado).

3.5.2. Sistemas *in situ* e amostras de solo intacto (“soil cores”)

É evidente, portanto, que os métodos mais precisos para se estimar as ARAs associadas à gramíneas e cereais são: 1.) O uso da análise em cilindros intactos (soil cores) com grande cuidado para evitar perturbar o solo nos cilindros, ou 2.) Através da análise completamente *in situ*.

Em muitos solos arenosos, é impossível a remoção dos cilindros sem grandes distúrbios (MIRANDA & BODDEY*, informações não publicadas), mas em solos argilosos e/ou silticos, a análise pode ser representativa se feita cuidadosamente.

Foram descritas, por BALANDREAU & DOMMARGUES (1971, 1976), técnicas de análise *in situ* para serem utilizadas em campo com culturas não alagadas e por LEE et al. (1977) e BODDEY & AHMAD (1981) para arroz inundado. A última apresenta problemas de difusão gasosa, particularmente de etileno da rizosfera para a atmosfera

* Pesquisador da Embrapa Agrobiologia, E-mail: bob@cnpab.embrapa.br

amostrada, causando subestimativa na verdadeira atividade da nitrogenase na rizosfera. É recomendado ao leitor que pretenda analisar atividade da nitrogenase em arroz de terras baixas ou outras plantas que crescem em solos inundados, consultar LEE et al. (1977) e BODDEY & AHMAD (1981).

Em ambas as análises, em cilindro de solo e *in situ*, devem ser tomadas precauções para evitar a inclusão da atividade de algas azul-esverdeadas (Cianobactérias). No caso de arroz inundado isso pode ser um sério problema, mas pode ser resolvido pela troca da água superficial (contendo algas) por água limpa (LEE et al., 1977) e a introdução da herbicida Stam® ou Sercopur® (ingrediente ativo Propanil - BODDEY et al., 1978) ou estreptomicina (HABTE & ALEXANDER, 1980), que inibe a atividade da alga, e para o qual as plantas de arroz são insensíveis.

Para a elaboração de uma análise de cilindro de solo (soil core), recomenda-se que a planta seja semeada dentro do cilindro ou que o cilindro seja enterrado no solo em torno da planta pelo menos uma semana antes da análise. Os cilindros devem ter dimensão suficiente para que os danos ao sistema radicular sejam mínimos. No caso de milho e sorgo são utilizados cilindros de 18 cm de diâmetro por 18 cm de altura. Cilindros maiores podem ser necessários para plantas maiores (*Pennisetum*, cana-de-açúcar, etc). Vinte e quatro horas antes da análise, a superfície do solo no interior do cilindro é coberta com dois a três cm de areia seca, para prevenir a atividade de cianobactérias. Para a análise, o cilindro deve ser retirado do solo de forma cuidadosa e imediatamente transferido para uma caixa plástica ou saco, equipado com um Suba-Seal®. Para fechar a caixa, ou saco, algumas vezes é necessário decapitar a planta. A decapitação da planta pode diminuir severamente a atividade da ARA (WANI et al., 1984) (deve ser evitada tanto quanto possível). O acetileno é injetado dentro do recipiente através do Suba-Seal, de modo que a atmosfera contenha 100 a 150 mL acetileno L⁻¹, e se o volume do recipiente não é conhecido, é preciso que um padrão interno (10 mL propano) seja injetado (ver apêndice).

O período de incubação não deve ser longo: WANI et al. (1983) recomenda a amostra inicial deve ser tirada após uma hora, quando os ganhos do sistema estão equilibrados e a amostra final deve ser feita cinco horas mais tarde. Este método pode facilmente ser usado para estimativa da ARA de plantas em vasos, se estas podem crescer em um vaso que tenha uma tampa para fechá-lo para a análise

(Figura 3). Assim, a planta não precisa ser perturbada durante todo o tempo da análise, o que é uma vantagem. Com plantas crescidas em vasos, entretanto, rigorosas precauções devem ser tomadas para o controle das algas, já que estas plantas freqüentemente crescem em condições de alta umidade do ar em casa-de-vegetação.

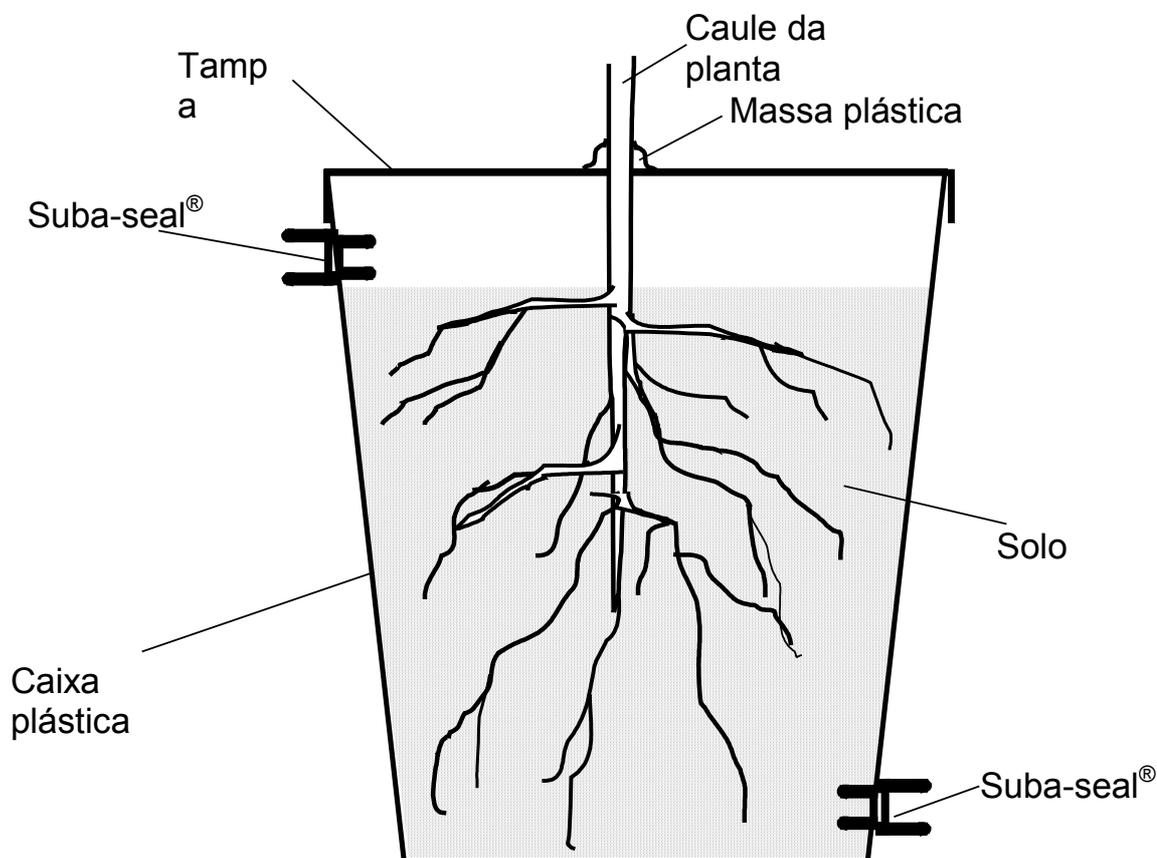


Figura 3. Desenho de um sistema para a incubação de raízes, com manutenção da parte aérea da plantas, para um teste de redução de acetileno.

Para análise *in situ* de plantas de sequeiro, é recomendada a semeadura nos cilindros, ou que estes sejam enterrados pelo menos uma semana antes da análise. Como antes, deve-se prevenir a atividade das algas cobrindo a superfície do solo no interior ao cilindro com areia. Para análise, neste caso, é necessário o uso de um saco plástico de diâmetro levemente maior que o do cilindro. O polipropileno é menos permeável aos gases do que polietileno, e sacos finos destes materiais são satisfatórios, de acordo com os autores deste artigo.

Existem dois métodos possíveis para se acondicionar os sistemas radiculares para ARA: se a planta tem um único caule, a parte inferior de um saco plástico deve ser amarrada em torno do cilindro, com barbante, e a parte superior similarmente em torno do caule; se a

planta tem muitos caules (por exemplo, gramíneas forrageiras), deve-se então acondicioná-la no saco ou então decapita-la. Procede-se em seguida a análise da planta não perturbada, como descrito para a análise de cilindro. O volume do saco é determinado utilizando-se um padrão interno de propano. A menos que o solo seja de estrutura muito grossa (areia), perdas de acetileno não são usualmente excessivas, e podem ser avaliadas através das perdas do padrão de propano (ver apêndice). Caso o solo esteja muito seco, a ARA será baixa de qualquer maneira (WEIER, 1980; WANI et al., 1983).

O acetileno na atmosfera de incubação deve difundir no solo e alcançar o sítio de atividade da nitrogenase. Como a pressão parcial deste gás é alta (0.10 – 0.15 atm), isso não leva muito tempo. Contudo, o etileno produzido pela nitrogenase deve difundir da rizosfera para a atmosfera fechada. Essa difusão de etileno e absorção pelo solo vem sendo estudada por vários pesquisadores (WITT & WEBER, 1975; VAN BERKUM & DAY, 1980) e vários problemas de difusão e absorção são particularmente sérios em sistemas aquáticos ou alagados (BROUZES et al., 1971; RICE & PAUL, 1971; MATSUGUCHI et al., 1978; FLETT et al., 1976).

3.5.3. Produção endógena de acetileno

O etileno pode ser produzido por plantas, fungos e bactérias (ABELES, 1973; DA SILVA et al., 1974) e isso freqüentemente ocorre nos solos (SMITH & RESTALL, 1971; CORNFORTH, 1975; YOSHIDA & SUZUKI, 1975) ao mesmo tempo em que o etileno é absorvido pelos solos (WITT & WEBER, 1975; FLETT et al., 1976). Desta forma, é necessário o uso de tratamentos controles em todo experimento. Um desses controles deve conter o sistema a ser analisado sem acetileno, para checagem da produção de etileno endógeno; outro controle deve ter etileno em concentrações satisfatórias (por exemplo, 10 $\mu\text{L. L}^{-1}$), para checar a absorção do etileno pelo solo.

Mesmo realizando-se estes controles, resultados errôneos podem ser obtidos, especialmente em condições úmidas. É evidente desde os trabalhos de ABELES et al. (1971) e SMITH et al. (1973), que o etileno é removido do solo por agentes microbianos. DE BONT (1976a) mostrou que algumas bactérias do gênero *Mycobacterium* são capazes de oxidar este gás. Essa oxidação seria inibida na presença de acetileno (DE BONT, 1976b). Em um solo onde tanto a produção microbiana como a oxidação de etileno está ocorrendo

simultaneamente, a introdução de acetileno irá inibir a oxidação de etileno e aumentar a velocidade de produção de etileno no solo, mesmo quando não existe redução de acetileno. Enquanto se imaginava que esta situação era muito rara, WITTY (1979), usando acetileno marcado com ^{14}C , foi capaz de mostrar que em análises de cilindros com gramíneas forrageiras de regiões temperadas (Inglaterra), somente 43% do etileno produzido era derivado da redução do acetileno introduzido. O restante foi assumido como resultante da produção de etileno endógeno, o qual normalmente não era aparente por ser oxidado na ausência de acetileno. Com intenção de determinar quando ocorre a produção de etileno na presença de acetileno no sistema solo/planta, vários autores (WITTY, 1979; VAN BERKUM & BOHLOOL, 1980; LETHBRIDGE et al., 1982; TANN & SKUJINS, 1985) sugeriram que deveria ser usado acetileno marcado com ^{14}C para controle dos experimentos. Enquanto por um lado esta técnica é direta e não apresenta resultados ambíguos, por outro ela é difícil de executar e requer aparatos sofisticados.

NOHRSTEDT (1983) sugeriu o uso de tratamento controle simples, e que serve para diferenciar a redução de acetileno na produção de etileno endógeno. Tanto este autor como LETHBRIDGE et al. (1982), acharam que acetileno à 100 ou 500 $\mu\text{L L}^{-1}$ foi suficiente para inibir inteiramente a oxidação de etileno no solo. A pressões parciais muito baixas de acetileno, existe uma desprezível redução de acetileno pela nitrogenase. Por esse fato, NOHRSTEDT (1983) recomendou que se um controle contendo 500 $\mu\text{L.L}^{-1}$ de C_2H_2 for usado, a ARA cai virtualmente a zero, mas qualquer etileno endógeno produzido vai ser detectado, já que esta concentração de acetileno é suficiente para inibir a oxidação de etileno.

Em adição, um teste controle foi sugerido: a incubação do sistema planta/solo em 150 ml.L^{-1} de C_2H_2 e 20 ml.L^{-1} de CO . O monóxido de carbono é um potente inibidor da nitrogenase, mas não inibe a produção de etileno endógeno. Finalmente, NOHRSTEDT (1983) sugeriu adicionar ao solo uma solução contendo sulfato de amônio, para inibir a atividade da nitrogenase. Para incubações de sistemas intactos de planta/solo, isso parece ser impraticável. A grande quantidade de água que seria necessária para distribuir esse sulfato de amônio iria alterar as condições do sistema e por abaixo a validade dos resultados. Por outro lado, esta técnica pode ser valiosa para sistemas alagados, já que monóxido de carbono e outros gases difundem muito devagar neste sistema NOHRSTEDT (1984).

4. Conclusões

Para o uso da técnica de redução de acetileno, quer seja para quantificação quer seja para comparação da fixação de nitrogênio em sistemas de plantas no solo, em culturas de microorganismos, ou em extratos de nitrogenase livre das células, devem ser considerados os seguintes pontos:

1. Saturação da nitrogenase com acetileno

Normalmente 100 ml.L⁻¹ de acetileno são, na maioria das vezes, suficientes para alcançar a máxima atividade de redução de acetileno. Entretanto, esta concentração não deve ser considerada como certa em todos os casos (SPIFF & ODU, 1973).

2. Declínio da atividade da nitrogenase pelo acetileno

Pode a presença do acetileno na atmosfera de incubação em um sistema fechado causar queda na atividade da nitrogenase?

Muitas leguminosas exibem esse fenômeno (MINCHIN et al., 1983a) e um fluxo contínuo deve ser usado para avaliar a atividade da nitrogenase. Em outras simbioses, ou outras associações de bactérias fixadoras de nitrogênio com plantas superiores, este aspecto não tem sido estudado. Entretanto, este declínio na atividade da redução de acetileno parece ser devido a um sofisticado sistema de controle gasoso no nódulo, que responde à ausência de produtos da redução de N₂. Não é conhecido, em sistemas de associações mais primitivas, tal processo de controle.

3. Perturbação

Tanto em leguminosas noduladas quanto em associações com não leguminosas, é agora bem conhecido que as perturbações causadas pela remoção de cilindros de solo do campo podem causar grandes reduções na atividade da nitrogenase (redução de acetileno) (WANI et al., 1983; MINCHIN et al., 1986).

4. Tempo de incubação

O tempo de incubação deve ser mantido o mínimo necessário para medir o etileno evolvido. Uma longa incubação (mais do que quatro ou

cinco horas) pode causar derrepressão da nitrogenase e, conseqüentemente, superestimar a atividade da nitrogenase.

5. Difusão de etileno e outros gases

O acetileno injetado no sistema precisa alcançar o sítio da fixação do N_2 . Mais crítica é a difusão do etileno evoluído na atmosfera de incubação do frasco (a ser analisado) à velocidade suficiente para evitar subestimação da atividade da nitrogenase. Isto é um problema sério em sistema intacto de cilindros de solo, especialmente se a atividade é baixa e o solo argiloso e/ou apresenta uma alta umidade.

6. Condições ambientais

As condições do ensaio devem ser similares às daquelas do sistema não perturbado?

São particularmente importantes temperaturas, pressões parciais de CO_2 e O_2 , conteúdo de umidade e, possivelmente em sistemas intactos, a intensidade luminosa.

7. Cianobactérias

A presença de algas verde-azuladas na superfície do solo pode exibir considerável atividade da nitrogenase. Estes organismos devem ser mantidos fora de ensaios de sistemas intactos.

8. Bactérias oxidando alcanos

A técnica da redução de acetileno pode ser subestimada ou falhar em detectar o acetileno reduzido, porque estes organismos dependem da oxidação de alcanos (geralmente metano) para seu metabolismo, processo que é inibido pela presença do acetileno.

9. Produção endógena de acetileno

Tratamentos controle não podem detectar a produção de etileno pelo solo ou pelas plantas, pois, na ausência de acetileno, o etileno produzido pode ser oxidado por microrganismos que oxidam alcanos. Tratamentos controle usando 100 ml.L^{-1} de acetileno + 20 ml.L^{-1} de monóxido de carbono são recomendados (NOHRDSTEDT, 1983).

10. Evolução de hidrogênio

Toda nitrogenase, na ausência de acetileno, reduz prótons e produz hidrogênio. Sob concentração de acetileno igual ou maior a 100 ml.L^{-1} esta produção é quase zero.

A quantidade de hidrogênio produzido varia com o organismo, condições ambientais e estágio de crescimento. A relação de moles de N_2 reduzido é geralmente 1:4. Entretanto, como existe um gasto de elétrons na produção de hidrogênio, esta relação não pode ser estabelecida com certeza.

5. Apêndice

Cálculo da Atividade de Redução de Acetileno

5.1. Interpretação quantitativa dos cromatogramas

Normalmente, as amostras que contêm etileno e acetileno (e às vezes propano) resultantes de uma incubação para avaliar redução de acetileno, são analisadas utilizando um cromatógrafo de gás equipado com um detetor de ionização de chama. Cada componente da mistura gasosa registrada por esse detetor é exibido na forma de um pico no registrador. A área envolvida por este pico é proporcional à quantidade do componente, mas cada componente tem um fator diferente de proporcionalidade (i.e. necessitará seu próprio padrão). Frequentemente, pode-se fazer uma aproximação e usar a altura do pico em vez da área. A relação da altura de pico versus a quantidade do componente deve ser conferida para cada componente em cada cromatógrafo utilizado. Quando grandes quantidades de um componente são injetadas (ex. 0,5 ml de 10 a 20% de acetileno) é possível que a relação não seja mais linear e é preciso medir a área do pico ou modificar os cálculos.

Hoje em dia, quase todos os cromatógrafos são equipados com integradores que fornece a área sob cada pico em unidades aleatórias. Como a área sob o pico de cada componente (A_p) injetado no cromatógrafo é proporcional às quantidades de cada componente, a relação $A_{pp}/A_{pa} = Q_{pp}/Q_{ps}$, onde A_{pp} = área sob o pico do padrão do componente (e.g. etileno), A_{pa} = área sob o pico do mesmo componente na amostra, Q_{pp} = quantidade (μ mole) do componente no padrão, e Q_{ps} = quantidade (μ mole) do componente na amostra.

5.2. Cálculo da atividade de redução de acetileno

A primeira suposição a ser feita é que o mesmo volume de gás (normalmente 0,5 ml) seja injetado no cromatógrafo para todos os padrões e amostras. Neste caso, as áreas sob os picos (ou suas alturas) são proporcionais às quantidades dos componentes. Então, o cálculo da concentração de etileno na amostra é:

(C_E) concentração de etileno na amostra ($\mu\text{L.L}^{-1}$) / área sob o pico de etileno na amostra

=

(K_E) concentração de etileno no padrão ($\mu\text{L.L}^{-1}$) / área sob o pico de etileno no padrão

Eq. 1

Onde K_E é a concentração de etileno no padrão, em $\mu\text{L.L}^{-1}$ (volumes por milhão).

Para a conversão desta concentração em unidades molar, deve-se supor que todas as amostras foram injetadas no cromatógrafo à 25°C (298°K). O volume gram molecular de qualquer gás à 25°C e 760 mm Hg de pressão é igual a 24450 ml. Então, a concentração de etileno na amostra será:

$$C_E = E \times K_E / S_E \times 24450 \mu\text{mol.ml}^{-1} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde E = altura do pico de etileno na amostra

S_E = altura do pico de etileno no padrão (de $K_E \mu\text{L etileno. L}^{-1}$).

Se duas amostras foram tiradas de um frasco de volume "F" ml, com um tempo de "t" horas entre amostragens, a taxa de produção de etileno (X) durante a incubação é:

$$X = (C_{E2}) - (C_{E1}) F / t \quad \text{em } \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{Eq.3}$$

Onde C_{E1} = concentração inicial de etileno e C_{E2} = concentração final de etileno

Incorporando Eq.2 com Eq. 1:

$$X = (E_2 - E_1) F K_E / 24450 S_E t \quad \text{em } \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ h}^{-1} \quad \text{Eq.4}$$

Onde E_1 = altura do pico de etileno na amostra inicial

E_2 = altura do pico de etileno na amostra final

Este valor X pode ser considerado a taxa de redução de acetileno por organismos dentro do frasco de volume F (ml) desde que as seguintes hipóteses sejam consideradas positivas:

1. A única fonte de etileno é a redução de acetileno.
2. Não ocorre vazamento dos gases durante a incubação ou injeção das amostras (e padrões) no cromatógrafo.
3. A taxa de redução de acetileno é constante com o tempo.

5.3. Correção para vazamento de gases após a incubação

Freqüentemente ocorre a perda de uma fração da amostra, seja durante o tempo de espera pela injeção no cromatógrafo, seja durante a injeção. Se isto acontece, os resultados podem ser corrigidos através da utilização da altura dos picos inicial e final de acetileno, que na ausência de vazamento deve ser idêntica.

$$X = (E_2 \cdot A_1 / A_2) (F \cdot K_E / 24450 \cdot S_E \cdot t \quad \text{em } \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{Eq.5}$$

(Lembrar que às vezes concentrações altas de acetileno não têm resposta linear no cromatógrafo e por isso esta equação não é válida).

A equação 5 pode ser utilizada para o cálculo da redução do acetileno de um frascos de volume conhecido.

5.4. Cálculo da taxa de redução de acetileno na presença de um padrão interno (propano)

Quando a incubação é feita num frasco grande ou flexível, freqüentemente torna-se muito difícil estimar o volume englobado. Neste caso recomenda-se o uso de um padrão interno. O propano é o padrão interno mais usado por ser facilmente detectado pelo cromatógrafo e raramente ser encontrado no solo etc.

A injeção de "v" ml de propano puro no frasco no início da incubação, resultaria numa concentração de propano no frasco igual a v/F. Utilizando um padrão de propano de concentração $C_P \mu\text{l} \cdot \text{L}^{-1}$ que

produz um pico de altura S_P , e utilizando a *equação 1* adaptada para propano,

C_P/S_P = concentração de propano na redoma ($\mu\text{L.L}^{-1}$)/altura do pico de propano na amostra *Eq. 6*

Substituindo v/F pela concentração de propano no frasco,

$$C_P/S_P = v / F \cdot P \quad \mu\text{L.L}^{-1} \quad \text{Eq. 7}$$

Onde P = altura do pico de propano na amostra.

O volume do frasco (F) agora será

$$F = v \cdot S_P \cdot 10^6 / P \cdot C_P \quad \text{ml} \quad \text{Eq. 8}$$

Substituindo esta equação para F na equação 5 e usando a perda de propano para estimar vazamento de gases,

$$X = (E_2 \cdot P_1 / P_2) - E_1 (v \cdot S_P \cdot K_E \cdot 10^6 / 24450 \cdot S_E \cdot t \cdot C_P \cdot P_1) \quad \mu\text{mol.h}^{-1} \quad \text{Eq. 9}$$

O que implica em:

$$X = (E_2/P_2) - (E_1/P_1) (v \cdot S_P \cdot K_E / 0,024450 \cdot S_E \cdot t \cdot C_P \cdot P_1) \quad \mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1} \quad \text{Eq. 10}$$

Onde:

P_1 = altura do pico de propano na amostra inicial.

P_2 = altura do pico de propano na amostra final.

E_1 = amostra do pico de etileno na amostra inicial.

E_2 = amostra do pico de etileno na amostra final.

V = volume de propano injetado no início da incubação.

S_P = altura do pico do padrão de propano.

C_P = concentração do padrão de propano.

K_E = concentração do padrão de etileno.

S_E = altura do pico do padrão de etileno.

T = duração da incubação em horas.

Lembrar-se de que todas as alturas dos picos devem ser expressas numa mesma unidade (ex. em x atenuação do cromatógrafo)

Esta equação é essencialmente aquela usada por BALANDREAU & DOMMERGUES (1976) e BODDEY et al. (1978).

5.5. Correção para vazamento de gases durante a incubação

As incubações freqüentemente são feitas em sacos plásticos ou em outros frascos permeáveis. Nestes casos a equação 10 não deve ser utilizada porque o vazamento de propano (ou outro padrão interno) começa a partir de uma concentração alta e diminui, mas a concentração de etileno é inicialmente baixa e aumenta com o tempo. A hipótese sugerida quando as incubações são feitas em frascos permeáveis é que a perda do etileno é proporcional à sua própria concentração (Lei de Fick. Ver PATRIQUIN & KEDDY, 1978; BORJESSON & SKUJINS, 1988)

$$\text{ie, } d[E] / d t = r \cdot [E] \quad \text{Eq. 11}$$

Onde r = constante de efusão de etileno e $[E]$ = concentração de etileno

Aplicando a mesma lei para a efusão (vazamento) de propano,

$$D[P] / d t = r \cdot [P] \quad \text{Eq. 12}$$

ou

$$s \cdot d t = d[P] / [P] \quad \text{Eq. 13}$$

Onde s = constante de efusão do propano.

Por integração,

$$s \cdot t = \ln ([P_2] / [P_1]) \quad \text{Eq. 14}$$

Onde t = tempo de incubação ($t_2 - t_1$) e $[P_1]$ e $[P_2]$ são, respectivamente, as concentrações de propano no início e final da incubação.

A redução de acetileno (X) é a soma do aumento de etileno observado, mais a quantidade perdida por efusão (vazamento).

$$X = (d [P] / d t) + (- r \cdot [E]) \quad \text{Eq. 15}$$

PATRIQUIN & KEDDY (1978) sugeriram que as constantes da difusão de etileno e propano fossem consideradas iguais (ie, ser). Esta hipótese, a integração da equação para o cálculo da atividade de redução de acetileno para incubações feitas em frascos permeáveis.

$$\text{ARA} = \ln (P_1 / P_2) \cdot [E_2 - (E_1 \cdot P_2 / P_1)] \cdot v \cdot S_P \cdot K_E / (P_1 - P_2) \cdot C_P \cdot S_E \cdot t \cdot 0,024450 \text{ (}\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{h}^{-1}\text{)}$$

Eq. 16

Onde:

P_1 = altura do pico de propano na amostra inicial.

P_2 = altura do pico de propano na amostra final.

E_1 = altura do pico de etileno na amostra inicial.

E_2 = altura do pico de etileno na amostra final.

v = volume de propano injetado no início da incubação.

S_P = altura do pico padrão de propano.

C_P = concentração do padrão de propano.

K_E = concentração do padrão de etileno.

S_E = altura do pico do padrão de etileno.

t = duração da incubação em horas.

Lembrar-se de que todas as alturas dos picos devem ser expressas numa mesma unidade (ex., em x atenuação do cromatógrafo).

6. Referências Bibliográficas

ABELES, F.B. **Ethylene in plant biology**. New York: Academic, 1973. 302 p.

ABELES, F. B.; CRAKER, L. E.; FORRENCE, L. E.; LEATHER, G. R. Fate of air pollutants: Removal of ethylene, sulfur dioxide and nitrogen dioxide by soil. **Science**, Washington, v. 173, p. 914-916, 1971.

BALANDREAU, J.; DOMMARGUES, Y. Mesure in situ l'activite nitrogenasique. **Comptes Rendus d'Academie du Science**, Paris, v. 273, p. 2020-2023, 1971.

BALANDREAU, J.; DOMMARGUES, Y. Assaying nitrogenase (C_2H_2) activity in the field. In: ROSSWALL, T. (Ed.). **Modern methods in the study of microbial ecology**. Uppsala: Swedish Natural Science Research Council, 1976. 508 p. (Bulletins from the Ecological Research Committee, 17).

BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 911-922, 1997.

BARBER, L. E.; TJEPKEMA, J. D.; RUSSELL, S. A.; EVANS, H. J. Acetylene reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 108-113, 1976.

BASHAN, Y.; LEVANONY, H. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 36, p. 591-608, 1990.

BERGERSEN, F. J. The relationship between hydrogen evolution, hydrogen exchange, nitrogen fixation and applied oxygen tension in soybean root nodules. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 16, p. 669-680, 1963.

BERGERSEN, F. J. Some properties of nitrogen-fixing breis prepared from soybean root nodules. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 130, p. 304-312, 1966.

BERGERSEN, F. J. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene-reduction assay. **Australian Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 23, p. 1015-1025, 1970.

BODDEY, R. M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **CRC Critical Reviews Plant Science**, Boca Raton, v. 6, p. 209-266, 1987.

BODDEY, R. M.; AHMAD, N. Seasonal variations in nitrogenase activity of various rice varieties measured with an in situ acetylene reduction technique in the field. In: VOSE, P. B.; RUSCHEL, A. P. (Ed.). **Associative N^2 fixation**. Boca Raton: CRC, 1981. p. 219-229.

BODDEY, R. M.; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Quantificação da fixação biológica de nitrogênio associada a plantas, utilizando o isótopo ^{15}N . In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília, DF: EMBRAPA/SPI, 1994. p. 471-494. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 46).

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. In: SUBBA RAO, N.S. (Ed.). **Current developments in biological nitrogen fixation**. New Delhi: Oxford, 1984. p. 277-306.

BODDEY, R. M.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent results and perspectives for future research. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 108, p. 53-65, 1988.

BODDEY, R. M.; OLIVEIRA, O. C. de; ALVES, B. J. R.; URQUIAGA, S. Field application of the ^{15}N isotope dilution technique for the reliable quantification of plant-associated biological nitrogen fixation. **Fertilizer Research**, Netherlands, v. 42, p. 77-87, 1995.

BODDEY, R. M.; PEOPLES, M. B.; PALMER, B.; DART, P. J. Use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystems**, Dordrecht, v. 57, p. 235-270, 2000.

BODDEY, R. M.; QUILT, P.; AHMAD, N. Acetylene reduction in the rhizosphere of rice: methods of assay. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 50, p. 567-574, 1978.

BORJESSON, I.; SKUJINS, J. Corrections for effusion from gas-permeable enclosures for the determination of low N_2 (C_2H_2) fixation rates *in situ*. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 11-17, 1988.

BOUTON, J. H.; ALBRECHT, S. L.; ZUBERER, D. A. Screening and selection of pearl millet for associated bacterial nitrogen fixation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 11, p. 131-140, 1985.

BROUZES, R.; KNOWLES, R. Inhibition of growth of *Clostridium pasteurianum* by acetylene: implication for nitrogen fixation assay. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 17, n. 12, p. 1483-1489, 1971.

BROUZES, R.; MAYFIELD, C. I.; KNOWLES, R. Effect of oxygen partial pressure on nitrogen fixation and acetylene reduction in a sandy loam soil amended with glucose. **Plant and Soil**, The Hague, Special volume, p. 481-494, 1971.

BULEN, W. A.; BURNS, R. C.; LECOMTE, J. R. Nitrogen fixation: hydrosulphite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 53, p. 532-539, 1965.

BURNS, R. C. The nitrogenase system from *Azotobacter*: activation energy and divalent cation requirement. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 171, p. 253-259, 1969.

BURRIS, R. H. Methodology. In: QUISPÉL, A. (Ed.). **The Biology of nitrogen fixation**. Amsterdam: North Holland, 1974. p. 9-33.

BURRIS, R. H. The acetylene reduction technique. In: STEWART, W. D. P. (Ed.). **Nitrogen fixation by free-living microorganisms**. Cambridge: Cambridge University, 1975. p. 249-257. (International Biological Programme, 6).

BURRIS, R. H. 100 years of discoveries in biological nitrogen fixation. In: BOTHE, H.; DE BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988. p. 21-30.

CAPONE, D. G.; BUDIN, J. M. Nitrogen fixation associated with rinsed roots and rhizomes of eelgrass *Zostera marina*. **Plant Physiology**, Washington, v. 70, p. 1601-1604, 1982.

CHALK, P. M. Estimation of N₂ fixation by isotope dilution: an appraisal of techniques involving ¹⁵N enrichment and their application. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 389-410, 1985.

CHALK, P. M.; LADHA, J. K. Estimation of legumes symbiotic dependence: an evaluation of techniques based on ¹⁵N dilution. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 31, p. 1901-1917, 1999.

CORNFORTH, I. S. The persistence of ethylene in aerobic soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 42, p. 85-96, 1975.

DA SILVA, E. J.; HENRIKSSON, E.; HENRIKSSON, L. A. Ethylene production by fungi. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 2, p. 63-66, 1974.

DAESCH, G.; MORTENSON, L. E. Effect of ammonia on the synthesis and function of the N₂-fixing enzyme system in *Clostridium pasteurianum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 110, p. 103-109, 1972.

DALTON, H.; POSTGATE, J. R. Growth and physiology of *Azotobacter chroococum*. **Journal of General Microbiology**, London, v. 56, p. 307-319, 1969.

DANSO, S. K. A. The use of ¹⁵N enriched fertilizers for estimating nitrogen fixation in grain and pasture legumes. In: BECK, D. P.; MATERON, L. A. (Ed.). **Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1988. p. 345-358. (Developments in Plant and Soil Sciences, 32).

DART, P. J. Nitrogen fixation associated with non-legumes in agriculture. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 30, p. 303-334, 1986.

DART, P. J.; DAY, J. M. Effects of incubation temperature and oxygen tension nitrogenase activity of legume root nodules. **Plant and Soil**, The Hague, Special volume, p. 167-184, 1971.

DART, P. J.; DAY, J. M.; HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity of legume root nodules. In: **USE of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops**. Vienna: IAEA, 1972. p. 85-100.

DAVID, K. A. V.; FAY, P. Effects of long-term treatment with acetylene on nitrogen-fixing microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 34, n. 6, p. 640-646, 1977.

DAY, J. M. Nitrogen-fixing associations between bacteria and tropical grass roots. In: AYANABA, A.; DART, P. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics**. Chichester: John Wiley, 1977. p. 273-288.

DAY, J. M.; DÖBEREINER, J. Physiological aspects of N₂-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 45-50, 1976.

DAY, J. M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 7, p. 107-112, 1975.

DE BONT, J. A. M. Oxidation of ethylene by soil bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Paris, v. 42, p. 59-71, 1976a.

DE BONT, J. A. M. Bacterial degradation of ethylene and an acetylene reduction test. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, p. 1060-1062, 1976b.

DE BONT, J. A. M.; MULDER, E. G. Nitrogen fixation and co-oxidation of ethylene by a methane-utilizing bacterium. **Journal of General Microbiology**, London, v. 83, p. 113-121, 1974.

DE BONT, J. A. M.; MULDER, E. G. Invalidity of the acetylene-reduction assay in alkane-utilizing nitrogen-fixing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 31, p. 640-647, 1976.

DILWORTH, M. J. Acetylene reduction fixing preparations of *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 127, n. 2, p. 285-294, 1966.

DIXON, R. O. D. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 62, p. 272-283, 1968.

DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grass-bacteria associations in the tropics. In: **ISOTOPES in biological dinitrogen fixation**. Vienna: IAEA, 1978. p. 51-58. (Panel Proceedings Series).

DÖBEREINER, J.; DAY, J. M.; DART, P. J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-*Azotobacter paspali* association. **Journal of General Microbiology**, London, v. 71, p. 103-116, 1972.

ESKEW, D. L.; TING, I. P. Comparison of intact plant and excised root assays for acetylene reduction in grass rhizospheres. **Plant Science Letters**, Amsterdam, v. 8, p. 327-331, 1977.

FLETT, R. J.; HAMILTON, R. D.; CAMPBELL, E. R. Aquatic acetylene-reduction techniques: solutions to several problems. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 22, n. 1, p. 43-51, 1976.

HABTE, M. Apparatus for the intact whole plant-soil systems. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 15, p. 719-720, 1983.

HABTE, M.; ALEXANDER, M. Use of streptomycin for suppressing blue-green algal nitrogenase activity during the assessment of nitrogenase activity in the rice rhizosphere. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v. 44, p. 756-760, 1980.

HAM, G. E. The acetylene-ethylene assay and other measures of nitrogen fixation in field experiments. In: AYANABA, A.; DART, P. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation in farming systems of the tropics**. Chichester: John Wiley, 1977. p. 325-334.

HARDY, R. W. F.; BURNS, R. C.; HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 5, n. 1, p. 47-81, 1973.

HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Washington, v. 43, p. 1185-1207, 1968.

HARDY, R. W. F.; KNIGHT JR., E. Reductant-dependent adenosine triphosphatase of nitrogen-fixing extracts of *Azotobacter vinelandii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 132, p. 520-531, 1966.

HOCH, G. E.; SCHNEIDER, K. C.; BURRIS, R. H. Hydrogen evolution and exchange, and conversion of N₂O to N₂ by soybean root nodules. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 37, p. 273-279, 1960.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Ontogenia da fixação biológica de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, p. 715-730, 1986.

KOCH, B. L. Associative nitrogenase activity by some Hawaiian grass roots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 47, p. 703-706, 1977.

LEE, K. K.; ALIMAGNO, B.; YOSHIDA, T. Field technique using the acetylene reduction method to assay nitrogenase activity and its association with the rice rhizosphere. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 47, n. 3, p. 519-526, 1977.

LETHBRIDGE, G.; DAVIDSON, M. S.; SPARLING, G. P. Critical evaluation of the acetylene reduction test for estimating the activity of nitrogen-fixing bacteria associated with the roots of wheat and barley. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 27-35, 1982.

MAGUE, T. H.; BURRIS, R. H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. **New Phytologist**, Cambridge, v. 71, p. 275-286, 1972.

MATSUGUCHI, T.; SHIMOMURA, T.; LEE, S. K. Reexamination of assay conditions for heterotrophic nitrogen fixation (C₂H₂) in paddy soil. In: GRANHALL, U. (Ed.). **Environmental role of nitrogen-fixing blue-green algae and asymbiotic bacteria**. Stockholm: Ecological Bulletins, Swedish Natural Science Research Council, 1978. p. 137-147. (Ecological Bulletins/NFR, 26).

MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; WITTY, J. F. Further errors in the acetylene reduction assay: effects of plant disturbance. **Journal of Experimental Botany**, Bronx, v. 37, n. 183, p. 1581-1591, 1986.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E. A new technique for the measurement of respiratory costs fo symbiotic nitrogen fixation. In: JONES, D. G.; DAVIES, D. R. (Ed.). **Temperate legumes: physiology, genetics and nodulation**. Boston: Pitman, 1983b. p. 201-217.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J. F.; SHEEHY, J. E.; MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 34, n. 142, p. 641-649, 1983a.

MOZEN, M. M.; BURRIS, R. H. The incorporation of ¹⁵N-labelled nitrous oxide by nitrogen fixing agents. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 14, p. 577-578, 1954.

NEILSEN, A.; RIPPKA, R.; KUNISAWA, R. Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in Anabaena species: a kinetic study. **Archives of Microbiology**, New York, v. 76, p. 139-150, 1971.

NERY, M.; ABRANTES, G. T. V.; SANTOS, D. D.; DÖBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 1, p. 15-20, 1977.

NEYRA, C. A.; DÖBEREINER, J. Nitrogen fixation in grasses. **Advances in Agronomy**, Madison, v. 29, p. 1-38, 1977.

NOHRSTEDT, H. O. Natural formation of ethylene in forest soils and methods to correct results given by the acetylene reduction assay. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 15, p. 281-286, 1983.

NOHRSTEDT, H. O. Carbon monoxide as an inhibitor of N₂-ase activity (C₂H₂) in control measurements of endogenous formation of ethylene by forest soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 16, p. 19-22, 1984.

OKON, Y.; ALBRECHT, S. L.; BURRIS, R. H. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 85-88, 1977.

PATRIQUIN, D. G. New developments in grass-bacteria associations. In: SUBBA RAO, N. S. (Ed.). **Advances in agricultural microbiology**. New Delh: Oxford and IBH, 1982. p. 139-190.

PATRIQUIN, D. G.; KEDDY, C. Nitrogenase activity (acetylene reduction) in a Nova Scotian salt marsh: its association with angiosperms and the influence of some edaplic factors. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 227-244, 1978.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEN, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989. 76 p. (ACIAR Monograph, 11).

PEREIRA, P. A. A.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J.; NEYRA, C. A. Nitrate reduction and nitrogenase activity in excised corn roots. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 59, p. 2445-2449, 1981.

POSTGATE, J. Biochemical and physiological studies with free-living, nitrogen-fixing bacteria. **Plant and Soil**, The Hague, Special volume, p. 551-559, 1971.

REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; DÖBEREINER, J. Biological dinitrogen fixation in gramineae and palm trees. **Critical Reviews Plant Science**, Boca Raton, v. 19, p. 227-247, 2000.

RENNIE, R. J. Advantages and disadvantages of nitrogen-15 isotope dilution to quantify dinitrogen fixation in field-grown legumes - A critique. In: HAUCK, R. D.; WEAVER, R. W. **Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification**. Madison: SSSA/ASA, 1986. p. 43-58. (SSSA Special Publication, 18).

RICE, W. A.; PAUL, E. A. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 17, p. 1049-1056, 1971.

SCHÖLLHORN, R.; BURRIS, R. H. Study of the intermediates in nitrogen fixation. **Federation Proceedings**, Bethesda, v. 25, p. 710, 1966.

SCHUBERT, K. R.; EVANS, H. J. Hydrogen evolution. A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in waterlogged soil. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 73, p. 1207-1211, 1976.

SHEARER, G. B.; KOHL, D. H. N₂-fixation in field settings: estimations based on natural ¹⁵N abundance. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 13, p. 699-756, 1986.

SMITH, K. A.; BREMNER, J. M.; TABATABAI, M. A. Sorption of atmospheric pollutants by soils. **Soil Science**, Madison, v. 116, p. 313-319, 1973.

SMITH, K. A.; RESTALL, S. W. F. The occurrence of ethylene in anaerobic soil. **Journal of Soil Science**, Oxford, v. 22, p. 430-443, 1971.

SMITH, R. V.; EVANS, M. C. W. Soluble nitrogenase from vegetative cells of the blue green alga *Anabaena cylindrica*. **Nature**, London, v. 225, p. 1253-1254, 1970.

SOUTO, S. M.; DÖBEREINER, J. Variação estacional da fixação de N₂ e assimilação de nitrato em gramíneas forrageiras tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, p. 319-334, 1985.

SPIFF, E. D.; ODU, C. T. I. Acetylene reduction by *Beijerinckia* under various partial pressures of oxygen and acetylene. **Journal of General Microbiology**, London, v. 78, p. 207-209, 1973.

SPRENT, J. I.; BRADFORD, A. M. Nitrogen fixation in field beans (*Vicia faba*) as affected by population density, shading and its relationship with soil moisture. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, p. 303-310, 1977.

TANN, C. C.; SKUJINS, J. Soil nitrogenase assay by ¹⁴C-acetylene reduction: comparison with the carbon monoxide inhibition method. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 17, n. 1, p. 109-112, 1985.

TJEPKEMA, J.; VAN BERKUM, P. Acetylene reduction by soil cores of maize and sorghum in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, p. 626-629, 1977.

TRINICK, M. J.; DILWORTH, M. J.; GROUNDS, M. Factors affecting the reduction of acetylene by root nodules of *Lupinus* species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 77, p. 359-370, 1976.

TROLLDENIER, G. Influence of some environmental factors on nitrogen fixation in the rhizosphere of rice. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 47, p. 203-217, 1977.

VAN BERKUM, P.; BOHLOOL, B. B. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 44, p. 491-517, 1980.

VAN BERKUM, P.; DAY, J. M. Nitrogenase activity associated with soil cores of grasses in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 137-140, 1980.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C. Immediate acetylene reduction by excised grass roots not previously preincubated at low oxygen tensions. **Plant Physiology**, Washington, v. 64, p. 739-743, 1979.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C. Comparing time course profiles of immediate acetylene reduction by grasses and legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, p. 184-189, 1981.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C. Physiology of root-associated nitrogenase activity in *Oryza sativa*. **Plant Physiology**, Washington, v. 69, p. 1161-1165, 1982.

VAN BERKUM, P.; SLOGER, C. Interaction of combined nitrogen with the expression of root-associated nitrogenase activity in grasses and with the development of N₂ fixation in soybean (*Glycine max* Merr. L.). **Plant Physiology**, Washington, v. 72, p. 741-745, 1983.

VAUGHN, C. E.; JONES, M. B. Nitrogen fixation by intact annual rangeland species in soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 68, p. 561-564, 1976.

VESSEY, J. K. Measurement of nitrogenase activity in legume root nodules: In defense of the acetylene reduction assay. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 158, p. 151-162, 1994.

VOSE, P. B.; VICTORIA, R. L. Re-examination of the limitations of nitrogen-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. In: HAUCK, R. D.; WEAVER, R. W. **Field measurement of dinitrogen fixation and denitrification**. Madison: SSSA/ASA, 1986. p. 23-41. (SSSA Special Publication, 18).

WALKER, C. C.; YATES, M. G. The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. **Biochimie**, Paris, v. 60, n. 3, p. 225-231, 1978.

WANI, S. P.; DART, P. J.; UPADHYAYA, M. N. Factors affecting nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) associated with sorghum and millet estimated using the soil core assay. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 1063-1069, 1983.

WANI, S. P.; UPADHYAYA, M. N.; DART, P. J. An intact plant assay for estimating nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) of sorghum and millet plants grown in pots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 1, p. 15-29, 1984.

WEIER, K. L. Nitrogenase activity associated with three tropical grasses growing in undisturbed soil cores. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 2, p. 131-136, 1980.

WITT, W. W.; WEBER, J. B. Ethylene adsorption and movement in soils and adsorption by soil constituents. **Weed Science**, Champaign, v. 23, p. 302-307, 1975.

WITTY, J. F. Acetylene reduction assay can over estimate nitrogen-fixation in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 11, p. 209-210, 1979.

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. (Ed.). **Nitrogen fixation by legumes in mediterranean agriculture**. Dordrecht; Martinus Nijhoff, 1988. p. 331-343. (Developments in Plant and Soil Sciences, 32).

WITTY, J. F.; MINCHIN, F. R.; SHEEHY, J. E.; MINGUEZ, M. I. Acetylene-induced changes in the oxygen diffusion resistance and nitrogenase activity of legume root nodules. **Annals of Botany**, London, v. 53, p. 13-20, 1984.

WYCH, R. D.; RAINS, D. W. Simultaneous measurement of nitrogen fixation estimated by acetylene-ethylene assay and nitrate absorption by soybeans. **Plant Physiology**, Washington, v. 62, n. 3, p. 443-448, 1978.

YOSHIDA, T.; ANCAJAS, R. R. Application of the acetylene reduction method in nitrogen fixation studies. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 16, p. 234-237, 1970.

YOSHIDA, T.; SUZUKI, M. Formation and degradation of ethylene in submerged rice soils. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, v. 21, p. 129-135, 1975.

ZUBERER, D. A.; ALEXANDER, D. B. Effects of oxygen partial pressure and combined nitrogen on N₂-fixation (C₂H₂) associated with *Zea mays* and other graminaceous species. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 90, p. 47-58, 1986.



Agrobiologia

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

