

FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM CANA-DE-AÇÚCAR

ALAIDES PUPPIN RUSCHEL

Eng.º Agr.º, Master of Science

Pesquisador EMBRAPA-CENA

Orientador : DR. ENEAS SALATI

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universi-
dade de São Paulo, para obtenção do título
de "Doutor."

PIRACICABA

Est. São Paulo - Brasil

1975

E R R A T A

- Pag. 4 - Acrescenta-se na última linha, após a abertura do parenteses DO *BEREINER & DAY, 1974.*
- Pag. 5 - § 1, linha 2, em vez de *DOMERGUES et al. 1972*, lê-se *DOMMERGUES et al. 1973.*
§ 1, linha 3, em vez de *RUSCHEL et al. (1973)*, lê-se *RUSCHEL et al. (1975).*
§ 3, linha 17, em vez de *BALANDREAU (1973)*, lê-se *BALANDREAU (1975).*
§ 5, linha 34, em vez de *BECKING (1973)*, para *BECKING (1974).*
- Pag. 7 - Após o término da última linha, acrescentar *HARDY et al. 1971.*
- Pag. 25 - § 1, linha 7, após *BALANDREAU (1975)*, acrescentar *BALANDREAU & VILLEMIN (1973).*
- Pag. 32 - 1a. linha, em vez de "corado com *sudan-black*", lê-se "corado com violeta genciana".
- Pag. 42 - Após citação *RUSCHEL & BRITTO (1966)*, acrescentar *RUSCHEL A.P. & DOBEREINER, J. 1966. Bactérias fixadoras de N na rizosfera de gramíneas forrageiras. Bol. IPEACS 1103-1107.*
- Pag. 43 - Suprima-se as citações *TAKAHASHI 1970 a e b.*
- Pag. 70 - Linha 3, coluna 6, em vez de " $^{15}\text{N}^0/\text{oo}$ " lê-se, " $^{15}\text{N} \%$ ".
- Pag. 71 - Linha 3, coluna 7 e 8, em vez de " $^{15}\text{N}^0/\text{oo}$ " e excesso de $^{15}\text{N}^0/\text{oo}$ ", lê-se respectivamente " $^{15}\text{N} \%$ " e "Excesso de $^{15}\text{N} \%$ ".

DEDICO,

ao meu querido esposo RENATO,
e aos meus queridos filhos,
Regina Coeli,
Ricardo Henrique,
Rosane e
Roberto.

A G R A D E C I M E N T O S

Externamos nossos sinceros agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, principalmente as seguintes pessoas e entidades:

- Prof. Dr. Eneas Salati, pela orientação, estímulo e atenção demonstrados.

- Prof. Dr. Admar Cervellini, Diretor do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo apôio dado a este trabalho.

- Prof. Dr. Yigal Henis, pelas sugetões apresentadas.

- Eng^o Agr^o Reinaldo Luiz Victória e Fis. Eichii Matsui, pela contribuição nas análises de ^{15}N .

- Dr. Roberto Cesnik, do Planalsucar, pelo fornecimento de "seedlings" de cana-de-açúcar.

- Sr. José Renato de Freitas, Auxiliar de Laboratório da Seção de Microbiologia do Solo do CENA, pela colaboração prestada.

- À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), pelo apôio financeiro.

- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-CNEN), pelas facilidades oferecidas no laboratório da Seção de Microbiologia do Solo.

Í N D I C E

	página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Metodologia utilizada na avaliação da atividade da nitrogenase.	7
3.1.1. Método quantitativo de determinação de etileno.	7
3.1.2. Detalhes dos experimentos realizados com cromatografia de gás.	9
3.1.3. Método qualitativo de determinação de etileno para estudo da atividade da nitrogenase	11
3.1.4. Relação dos experimentos conduzidos no conjunto de minicâmaras	12
3.2. Incubação de plantas em atmosfera de 15-dinitrogênio.	13
3.2.1. Descrição do sistema (Fig. 1)	13
3.2.2. Funcionamento do sistema para incubação de plantas sob atmosfera controlada	14
3.2.3. Detalhes dos experimentos conduzidos na câmara em atmosfera controlada de 15-dinitrogênio.	15
3.3. Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio.	16
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	22
4.1. Atividade da nitrogenase em sistema intacto e perturbado	22
4.2. Inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio.	25
4.3. Atividade da nitrogenase avaliada por método qualitativo	26
4.4. Incubação de "seedlings" sob atmosfera de 15-dinitrogênio. ..	26
4.5. Atividade da nitrogenase e microrganismos fixadores de nitrogênio.	28
4.6. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar.	29
4.7. Variação natural de 15-nitrogênio em cana-de-açúcar.	30
5. RESUMO E CONCLUSÕES	33

6. SUMMARY	36
7. LITERATURA CITADA	39
8. APÉNDICE	44

ÍNDICE DE FOTOGRAFIAS

Foto	página
1. Conjunto de duas placas de lucite, contendo minicâmaras, usada na incubação de segmentos de raízes e determinação da atividade da nitrogenase	18
2. Placa de lucite com minicâmaras, mostrando reação com o reagente de Schiff, que evidencia a presença de etileno após a incubação de segmentos de raízes, sob atmosfera de acetileno, para determinação da atividade da nitrogenase.	19
3. Colônias de bactérias fixadoras de nitrogênio obtidas de raízes, após 48 horas de incubação, em meio de cultura com agar, sem nitrogênio mineral	20
4. Detalhes de células de raiz de cana-de-açúcar, coletada no campo, mostrando colônia de bactéria. Montagem feita em lactofenol, com aumento de 800 v, sob imersão.	21
5. Mistura de bactérias em esfregasso corado com <i>sudan-black</i> . Aumento de 800 v, sob imersão.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	página
1. Sistema de incubação de plantas sob atmosfera controlada com $^{15}\text{N}_2$	45
2. Detalhe da câmara de incubação.	46
3. Efeito da glicose na atividade da nitrogenase em planta inteira e raiz de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado..	47
4. Efeito da glicose na taxa da redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em planta inteira e raiz em sistema intacto e perturbado.	48
5. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrogenase em raízes de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado	49
6. Efeito de duas concentrações de glicose na taxa de evolução do etileno em sistema intacto e perturbado.	50
7. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrogenase em plantas inteiras em sistema intacto e perturbado. ..	51
8. Efeito de duas concentrações de glicose na taxa de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em plantas inteiras, em sistema intacto e perturbado.	52
9. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação de raízes destacadas de cana-de-açúcar, na atividade da nitrogenase.	53
10. Efeito de fontes energéticas e da inoculação de raízes destacadas de cana-de-açúcar, na taxa de redução do acetileno (atividade da nitrogenase).	54
11. Efeito de atmosfera enriquecida de CO_2 na atividade da nitrogenase em raízes e planta inteira de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.....	55

Figura

página

12. Efeito do enriquecimento de CO_2 na taxa de redução de acetileno (atividade da nitrogenase), em raízes e planta inteira de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado. 56

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO	página
1. Atividade da nitrogenase expressa em n moles/g de raiz de diferentes variedades de cana-de-açúcar, em sistema perturbado e intacto.	57
2. Efeito da glicose na atividade da nitrogenase expressa em μ moles de etileno/g de raiz em planta inteira e raiz da variedade PR 1117, em sistema intacto e perturbado (Exp. 2)	58
3. Efeito da glicose na taxa da atividade da nitrogenase/hora expressa em μ moles de etileno/g raiz em planta inteira e raiz da variedade PR 1117, em sistemas intacto e perturbado (Exp. 2) ..	59
4. Efeito de teores de glicose na atividade da nitrogenase, expressa em μ mol etileno/g/raiz, em plantas inteiras em sistema intacto e perturbado (Exp. 3)	60
5. Efeito de dois teores de glicose na taxa da atividade da nitrogenase expressa em μ moles/g raiz/hora em plantas inteiras, em sistema intacto e perturbado (Exp. 3)	61
6. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrogenase de raízes de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.	62
7. Taxa de atividade da nitrogenase, evidenciando o efeito de duas concentrações de glicose em raízes de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado (Exp. 4)	63
8. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação na atividade da nitrogenase (n moles etileno/g) em raízes de cana-de-açúcar, coletadas no campo (Exp. 5)	64
9. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação na taxa de fixação de nitrogênio pela nitrogenase, expressa em n moles etileno/g raiz/hora, em raízes destacadas (Exp. 5)	65

QUADRO

página

10.	Influência de atmosfera enriquecida com CO_2 na atividade da nitrogenase, expressa em μ moles de etileno em cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado (Exp, 6)	66
11.	Influência de atmosfera enriquecida de CO_2 na taxa da atividade de nitrogenase (μ moles etileno/hora) em cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado (Exp. 6)	67
12.	Atividade da nitrogenase em raízes de cana-de-açúcar incubadas sob atmosfera de acetileno, avaliada colorimetricamente.	68
13.	Efeito da adição de meio de cultura com glicose e sem nitrogênio, em raízes de toletes de cana-de-açúcar, recém germinados, na atividade da nitrogenase, avaliada colorimetricamente pelo etileno evoluído.	68
14.	Efeito de substância energética adicionada em raízes de toletes inoculados de cana-de-açúcar, 27 dias após a germinação, na atividade da nitrogenase, avaliada por teste colorimétrico qualitativo pelo etileno evoluído.	69
15.	Efeito de substâncias energéticas adicionadas a raízes de cana-de-açúcar coletadas no campo, na atividade da nitrogenase, avaliada qualitativa e colorimetricamente após incubação em acetileno.	69
16.	Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, em sistema perturbado, incubados 24 horas em câmara com baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono.	70
17.	Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados 24 horas em câmara com tensão de oxigênio e dióxido de carbono alto, em temperatura de 28 a 32°C (médias de duas repetições/amostra)	71

QUADRO

página

18. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados durante 24 horas em câmara com teor médio de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono, em temperatura de 28 a 32°C (médias de duas repetições/amostra)	72
19. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados durante 6 dias em câmara com condições normais simuladas, em temperatura de 28 a 32°C (média de duas repetições/amostra) ...	73

1. INTRODUÇÃO

A importância da cana-de-açúcar nos trópicos é indiscutível, notadamente no Brasil, onde 34% da produção de açúcar exportada somadas às exportações de álcool e melaço alcançaram valores na ordem de 1,4 bilhões de dólares em 1974, e tendo-se em vista a atual crise mundial de petróleo, pode-se visualizar o cunho que esta cultura tomará, em futuro próximo, na economia nacional e mundial com a produção de álcool.

Sendo a cana-de-açúcar uma planta extrativa, sua exportação de nutrientes do solo é grande. No tocante a nitrogênio, sabe-se que 100 toneladas de colmos, produção de um hectare, possuem 100 quilogramas de nitrogênio, que acrescidas das perdas de nitrogênio por volatilização, por ocasião das queimas, somam teores de 150 kg de nitrogênio extraídos do solo, que certamente deveriam ser repostos por uma adubação conveniente. No entanto, a experimentação realizada no Brasil, pouco tem eviden-

ciado sobre respostas da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada nas zonas de cultura intensiva, o que vem a indicar uma grande contribuição do nitrogênio do solo, possivelmente explicada por uma fixação biológica daquele elemento por microrganismos, os quais poriam à disposição da planta o nitrogênio necessário para seu desenvolvimento.

O fenômeno da interação de microrganismos e raízes de plantas da família *Gramineae*, resultando na fixação do nitrogênio atmosférico, foi comprovado indiretamente através do aumento da população de bactérias da rizosfera daquelas plantas (DOBEREINER, 1959; DOBEREINER e RUSCHEL, 1961; RUSCHEL e BRITTO, 1966), ou com o uso do método da redução do acetileno, que mede a atividade da nitrogenase, enzima fixadora de nitrogênio em todos os sistemas biológicos (YOSHIDA e ANCAJAS, 1971; DOBEREINER et al., 1972a e b). Evidência direta desta fixação foi obtida por RUSCHEL et al. (1975), utilizando 15-dinitrogênio.

A maioria dos trabalhos objetivando o estudo da fixação de nitrogênio por microrganismos na rizosfera de plantas cultivadas, tem-se prendido a plantas forrageiras, arroz, e mais recentemente ao milho, havendo alguns estudos preliminares com cana-de-açúcar. O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de introduzir métodos de avaliação da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar em sistema intacto e perturbado, bem como evidenciar aumentos desta fixação através de modificações introduzidas no sistema solo-planta.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos realizados com ^{15}N indicam que somente 26% do fertilizante nitrogenado é aproveitado pela cana-de-açúcar quando aplicado sob forma de NH_4^+ e 37% sob forma de NO_3^- (TAKAHASHI, 1968), o que vem a sugerir que altas doses de nitrogênio deveriam ser adicionadas ao solo para suprir as necessidades da planta; no entanto, não somente no Brasil, mas também no Havai, a cana-de-açúcar pouco responde a adições de nitrogênio ao solo.

A presença de bactérias não simbióticas fixadoras de nitrogênio em cana-de-açúcar foi constatada por DOBEREINER (1959). Porém, o número de microrganismo que aparece em determinado solo pouco diz sobre sua atividade, uma vez que a observação do desenvolvimento dos mesmos se dá em meio de cultura sob condições artificiais. A população microbiana fixadora de nitrogênio está mais na dependência da planta cultivada que

do solo (WAKSMAN, 1922), uma vez que solos descobertos apresentam poucos microrganismos em relação aqueles cultivados. Solo desprovido de raiz apresenta atividade da nitrogenase muito baixa. RINAUDO *et al.* (1971) comparando solo junto da raiz (rizosfera) com solo não próximo da raiz, notaram que neste último a fixação era quase nula, enquanto que no primeiro aquela fixação chegava a 3 µg de N/g raiz/dia. RUSCHEL & DOBEREINER, 1966, fazendo um estudo em oito gramíneas cultivadas normalmente no campo, observaram maior população de *Beijerinckia* em *Cynodon dactylon*, *Paspalum notatum* e *Sectaria sphacelata* e de *Azotobacter* em *Paspalum notatum*, indicando um efeito da planta na população fixadora de nitrogênio na rizosfera da planta. Recentemente, RUSCHEL & RUSCHEL (1974a), trabalhando com milho, notaram um efeito positivo da planta aumentando a atividade da nitrogenase, a qual foi 13 vezes superior na presença do "seedling". Em experimento em casa de vegetação, RUSCHEL & BRITTO (1966), pesquisando a influência de bactérias assimióticas na fixação de nitrogênio em quatro gramíneas e em *Cyperus rotundus*, observaram maior população destas bactérias no "rizoplan" de *Paspalum notatum* e um aumento do teor de nitrogênio da planta de *Paspalum* inoculada, evidenciando uma possibilidade de inoculação naquele sistema. Anteriormente, DOBEREINER & RUSCHEL (1961) obtiveram aumentos consideráveis na produção do arroz devido a inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Vários pesquisadores observaram que a adição de material orgânico (açúcares e restos vegetais) ao solo aumenta a fixação de nitrogênio (DELWICH & WIJLER, 1956; DOBEREINER & ALVAHYDO, 1959; CHANG & KNOWLES, 1965), concluindo-se que exudatos de raízes e produtos de decomposição da matéria orgânica oferecem o material energético necessário para a fixação de nitrogênio por microrganismos.

Por outro lado, a absorção seletiva de nutrientes pelas plantas, particularmente nitrogênio, altera a acidez em torno da raiz, o que viria a afetar a disponibilidade dos nutrientes nesta zona (JURGENSEN & DAVEY, 1970; RYLEY & BARBER, 1971), e desde que a matéria orgânica em volta do sistema radicular é relativamente pobre de nitrogênio (STARKEY, 1958), a rizosfera seria um lugar favorável para a fixação de nitrogênio.

Recentemente, com o advento do método da redução de acetileno, foi observado que maior fixação de nitrogênio ocorre na rizosfera de plantas cultivadas que no solo próximo ao sistema radicular em *Paspalum* (DOBE

REINER, 1966; KASS *et al.*, 1971); arroz (RINAUDO *et al.*, 1971; YOSHIDA & ANCAJAS, 1971); milho (DOMERGUES *et al.*, 1972; RUSCHEL & RUSCHEL, 1974b); cana-de-açúcar (DOBEREINER *et al.*, 1972a). RUSCHEL *et al.* (1974) incubou "seedlings" de cana-de-açúcar em atmosfera de $^{15}\text{N}_2$ conseguiram evidenciar fixação de nitrogênio equivalente a 740 μg de N/g de peso seco. Neste trabalho foi sugerido que o sistema fixador provavelmente localizava-se na raiz havendo transferência imediata do nitrogênio fixado para a planta sem ter o mesmo sido incorporado à proteína da bactéria como passo intermediário.

Diversos fatores poderiam afetar a fixação de nitrogênio na rizosfera. DOBEREINER *et al.* (1972b) observaram que pressão de O_2 em torno de 0,04 favoreceu a fixação em raízes de *Paspalum*, enquanto que na presença de sacarose foi indiferente à pressão do O_2 . YOSHIDA & ANCAJAS (1973) notaram maior fixação de nitrogênio na rizosfera de arroz em solos alagados, observando maior atividade da nitrogenase na época da iniciação da panícula, evidenciando um efeito do estágio de desenvolvimento da planta.

BALANDREAU (1973), observando os picos máximos de fixação em milho, verificou que os mesmos se distribuíam em uma curva que reproduzia grosseiramente a curva de desenvolvimento vegetativo da planta. Sendo assim o efeito da planta parece estar ligado à fotossíntese, que influencia indiretamente as excreções de raízes, fornecendo desta forma material energético para o microrganismo fixador de nitrogênio.

Locais com baixas tensões de O_2 são facilmente obtidos mesmo em solos arejados, pois a atividade microbiana encarrega-se de modificar a atmosfera do solo, sendo normal teores de 0,08 p O_2 , enquanto que o CO_2 poderá alcançar até 0,10 p CO_2 (VINE *et al.*, 1942). DE GEE (1950) notou que a diminuição do potencial de oxidação-redução a 10 cm de profundidade em um solo de savana seria devido a condições anaeróbicas. Tais fatos sugerem que microrganismos anaeróbios ou aeróbios facultativos exercem importante papel na fixação de nitrogênio, mesmo em meio supostamente aeróbio.

O dióxido de carbono aumenta a fixação de nitrogênio não só em leguminosas noduladas (MULDER & VAN VEEN, 1960) como também em *Azotobacter* e *Beijerinckia* em cultura pura (BECHING, 1973). BERGERSEN (1971) trabalhando com nódulos destacados de soja, notou efeito estimulatório de

CO₂ na fixação de nitrogênio, em baixas pressões de oxigênio, o mesmo não acontecendo quando esta era alta, acima de 0,3%, enquanto que *HARDY & HAVELKA (1975)* citam aumentos de fixação de nitrogênio em soja cultivada no campo devidos a maiores teores de CO₂ na atmosfera. No entanto, *GROBELAAR et al. (1970)*, não observaram efeito estimulativo do CO₂ em nódulos destacados de feijão. *WILSON (1940)* verificou que o aumento de CO₂ na atmosfera estimulava a fixação de nitrogênio, o que atribuiu ao aumento de fotossíntese no trevo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram utilizados três diferentes métodos no estudo da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. Dois métodos foram usados na avaliação da atividade da nitrogenase: quantitativo, através de cromatografia de gás, e qualitativo, através de teste colorimétrico. O terceiro método consistiu na incubação do sistema solo-planta sob atmosfera controlada de 15 -dinitrogênio.

3.1. Metodologia utilizada na avaliação da atividade da nitrogenase.

3.1.1. Método quantitativo de determinação de etileno.

Vários experimentos foram realizados, utilizando-se o método de redução de acetileno, que mede a atividade da nitrogenase, enzima fixadora de nitrogênio, através de cromatografia de gás.

Utilizou-se um cromatógrafo de gás Beckman GC-65, equipado com detector de ionização de chama, e coluna de vidro de 2 m com Perapak N de 80 a 100 mesh. Em todos os experimentos as amostras foram incubadas sob atmosfera de 10% de acetileno, a qual era conseguida retirando-se, com o auxílio de uma seringa, 10% do ar selado no frasco onde a amostra estava contida, e injetando-se idêntico volume em acetileno. Durante o período de incubação, amostras de 0,5 ml eram retiradas dos frascos para análise do etileno evoluído. Todas as determinações de etileno foram feitas em período diurno, havendo sempre um período noturno inserido entre as diferentes determinações.

Cálculos: O etileno evoluído foi calculado utilizando-se um padrão de 500 ppm (0,5 ml de etileno puro adicionado em frasco de 1000 ml, tendo-se anteriormente retirado 0,5 ml do ar selado no frasco). Foi injetado no cromatógrafo, para análise, 0,5 ml de todas as amostras, inclusive aquelas do padrão. Os picos foram medidos em milímetros, com o auxílio de uma régua comum.

Procedimento do cálculo:

1 mol 22,400 ml a 25^oC (temp. ambiente do laboratório)
X 0,5 ml

$$X = 111 \times 10^{-10} \text{ mol}$$

No cromatógrafo:

0,5 ml padrão
ou 111×10^{-10} mol Leitura em mm x atenuação x "range"
do aparelho
Y 1 mm

Y = altura do pico padrão no aparelho na ocasião do experimento.

Teor de etileno na amostra = Z

$$Z = \frac{L \times \text{Atenuação} \times \text{"range"} \times 2 \times V \times Y}{\text{peso da amostra}}$$

L = leitura da amostra no cromatógrafo.

V = Volume do frasco onde a amostra estava contida

x 2 = porque injetava-se somente 0,5 ml.

mas, $V \times \text{"range"} \times 2 \times Y = \text{constante } A$

$$Z = \frac{L \times A}{\text{peso da amostra}}$$

3.1.2. Detalhes dos experimentos realizados com cromatografia de gás

Exp. 1. Efeito da variedade de cana-de-açúcar: Testadas três variedades em sistema intacto ("seedlings" cultivados em sacos de polietileno, estando as plantas em bloco de 7 cm de diâmetro x 10 cm de altura) com duas repetições. Determinações de etileno foram feitas 1, 2, 3, 4, 19, 22 e 27 horas após o início da incubação em acetileno.

Tratamentos:

A- Var. CB 40-77; B- Var. CB 41-76 e C- Var. NR 56-62.

Resultados deste experimento e de outras variedades testadas nos demais encontram-se no Quadro 1.

Exp. 2. Neste experimento foi testado o efeito do tipo de sistema solo-planta: intacto (já descrito) e perturbado (planta inteira após ser retirada do bloco de solo e sacudida para eliminar o excesso de solo das raízes). Observou-se também o efeito da adição de fonte energética, glicose a 1% (15 ml injetados no solo quando o sistema era intacto e quando o sistema era perturbado as raízes foram mergulhadas na solução de glicose), com duas repetições. Determinações de etileno evoluído foram feitas 1, 5, 10, 22, 26, 30 e 48 horas após o início da incubação em acetileno, todas em período diurno.

Tratamentos:

A- sistema intacto; B- sistema intacto + glicose; C- sistema perturbado; e D- sistema perturbado + glicose.

Resultados nos quadros 2 e 3, Figuras 3 e 4.

Exp. 3 e 4. Nestes experimentos foram testados sistemas intactos e perturbados com (Exp. 3) e sem (Exp. 4) a parte aérea da planta, além de efeito de substância energética (glicose) em duas concentrações (1 e 5%) com duas repetições. No Exp. 3 foram feitas determinações de etileno 1, 4, 20 e 26 horas após o início de incubação em acetileno, e no Exp. 4 após 1, 2, 20, 22 e 24 horas.

Tratamentos:

A- sistema intacto (solo + raízes) + 15 ml de H₂O; B- Idem + 15 ml de glicose a 1%; C- Idem + 15 ml de glicose a 5%; D- sistema perturbado + 15 ml de H₂O quando o sistema era intacto; E- Idem + 15 ml de glicose a 1%; e F- Idem + 15 ml de glicose a 5%.

Resultados do Experimento 3 estão nos Quadros 4 e 5 e Figuras 5 e 6; do Experimento 4, nos Quadros 6 e 7 e Figuras 7 e 8.

Exp. 5. Utilizadas raízes coletadas em condições normais de cultivo no campo. Neste experimento foi testado o efeito de três fontes energéticas (glicose, sacarose e malato), bem como o efeito da inoculação de bactérias isoladas de cana-de-açúcar (dois isolamentos) e com *Azotobacter sp.* em cultura pura, com três repetições por tratamento. As determinações do etileno evoluído foram feitas 1, 3, 5, 24, 28 e 30 horas após o início da incubação em acetileno.

Tratamentos:

A- Raiz lavada; B- Idem + imersão da raiz em glicose a 1%; C- Idem + sacarose a 1%; D- Idem + malato a 1%; E- Idem + misturas A de bactérias isoladas de cana-de-açúcar; F- Idem + mistura B de bactérias isoladas de cana-de-açúcar; G- Idem + *Azotobacter* em cultura pura.

Resultados: Nos quadros 8 e 9 e Figuras 9 e 10.

Exp. 6. Testado o efeito do aumento de concentração de dióxido de carbono em sistema intacto e perturbado, com duas repetições. Foram feitas determinações do etileno 1, 3, 5, 23, 27, 30 e 42 horas após o início da incubação em acetileno.

Tratamentos:

A- Sistema intacto + planta inteira; B- Idem + CO₂ 0,06%; C-

Idem. (somente raízes); D- Idem + CO₂; E; F; G e H correspondentes a A, B, C e D, porém em sistema perturbado.

Resultados nos Quadros 10 e 11 e Figuras 11 e 12.

3.1.3. Método qualitativo de determinação de etileno para estudo da atividade da nitrogenase.

Com a finalidade de determinar-se a fixação de nitrogênio em pequenas quantidades de material, foi desenvolvido um método químico colorimétrico, que permitiu constatar a atividade da nitrogenase em pequenos segmentos de raízes, a fim de se indentificar se a raiz tinha fixação como um todo ou se os lugares de fixação se localizavam em diferentes partes do sistema radicular. Utilizaram-se minicâmaras para assegurar um pequeno compartimento, capaz de reter volumes diminutos de etileno. Este método é menos sensível que o de cromatografia de gás, porém tem a vantagem de poder ser executado em qualquer laboratório comum, além de dar uma idéia panorâmica do lugar da fixação em determinado sistema. O método baseia-se na determinação de aldeído sob reação colorimétrica com o reagente de Schiff.

Material:

Duas placas de lucite de 8,5 cm de diâmetro por 0,9 cm de altura, tendo cada placa 143 orifícios de 4 mm de diâmetro x 7 mm de altura na placa inferior, e 4 mm x 3,5 mm na placa superior. O volume médio de cada minicâmara calculado e determinado é de 132 mm³.

Folha de borracha com 8,5 cm de diâmetro com idêntico número de furos ao número de câmaras das placas.

Saco de polietileno, transparente de 15 x 13 cm.

Solução oxidante: (STEWART, 1974)

NaIO₄ 0,05 M 80 ml

KMnO₄ 0,005 M 10 ml

Ajustar o pH a 7,5 com KOH, e diluir a 100 ml.

Soluções redutoras: NaAsO₂ 4 M

Reagente de Schiff (CHERONS & EUTRIKIN, 1963)

Fuchsin 0,1% 100 ml

NaHSO₄ sol. saturada 4 ml

Misturar as soluções e deixar em repouso por 1 hora, e adicionar:

HCl conc. 2 ml

Método:

Reações prováveis:

Etileno + Oxidante → dialcool ou etanodiol → aldeído ou etanal ou formaldeído.

O etileno é oxidado a formaldeído; o excesso de oxidante é reduzido pelos arsenito de sódio e ácido sulfúrico. O reagente de Schiff é específico para aldeídos.

Procedimento:

As duas placas de lucite possuem minicâmaras que se superpõem. Em uma delas colocam-se os segmentos de raízes de 2 a 3 mm e na outra, com o auxílio de uma seringa hipodérmica, colocam-se 2 gotas de solução oxidante por minicâmara. A placa com as raízes é invertida sobre a placa com a solução oxidante, a qual possui sobre si o disco de borracha para vedação das minicâmaras. Antes da vedação completa, o conjunto é colocado dentro do saco de polietileno, o qual após ter sido herméticamente selado através de dobras e auxílio de fita vedadora, é insuflado com excesso de acetileno (10 a 15% do volume predeterminado) (foto 1). Então superpõem-se cuidadosamente as placas com as minicâmaras e incuba-se o sistema por 24 ou 48 horas. A seguir, determina-se o etileno qualitativamente, adicionando-se 1 gota de arsenito, outra gota de ácido sulfúrico e finalmente duas a três gotas do reativo de Schiff. O aparecimento da coloração rósea indica a presença de aldeído (foto 2).

3.1.4. Relação dos experimentos conduzidos no conjunto de minicâmaras.

Exp. 7: Metade do conjunto de minicâmaras recebeu raízes de cana-de-açúcar e a outra permaneceu vazia, havendo portanto dois tratamentos, com e sem raízes. Resultados no Quadro 12.

Exp. 8: Metade do conjunto de minicâmaras recebeu raízes lavadas de cana-de-açúcar recém germinada de toletes em areia; na outra metade, as raízes foram lavadas, e antes de cortá-las em pequenos pedaços, foram mergulhadas em solução de meio de cultura para desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio sem este elemento na composição. Resultados no Quadro 13.

Exp. 9: Procedeu-se como anteriormente descrito com os seguintes tratamentos: raízes lavadas de toletes recém germinados e inoculados antes do plantio (T), e T + solução de glicose a 1%. Resultados no Quadro 14.

Exp. 10: Foram testadas, diferentes substâncias energéticas (concentração 0,1%) adicionadas às raízes lavadas antes de serem cortadas para serem colocadas nas minicâmaras.

Tratamentos: Raiz lavada (T), T + glicose, T + sacarose e T + malato. Resultados no Quadro 15.

3.2. Incubação de plantas em atmosfera de 15 -dinitrogênio.

Sendo o 15 -dinitrogênio um material muito dispendioso (US \$ 700,00/litro) foi construído um sistema com a finalidade de se incubarem "seedlings" de cana-de-açúcar sob atmosfera controlada, onde o gás circulava durante cada experimento e após o final do mesmo era armazenado para uso posterior em sucessivos experimentos. O sistema era isento de vazamento, sendo próprio para vácuo, com torneiras e juntas especiais.

3.2.1. Descrição do sistema (Fig. 1)

Este sistema era composto de:

1. Uma câmara de incubação (R): Recipiente de vidro pirex com capacidade de 2 litros (Fig. 2), sendo que nos 3 últimos experimentos este vidro foi substituído por uma câmara de lucite com entrada larga.

2. Linha de vácuo: utilizada na remoção de gases do sistema no início do experimento, esta remoção podendo ser total ou parcial, Utilizava-se de uma bomba mecânica de dois estágios, com vácuo na ordem de 10^{-2} torr.

3. Reservatório para armazenagem de gás: usado para guardar a mistura de gás a qual foi utilizada em experimentos sucessivos. Constituído de um cilindro metálico com capacidade de 12 litros (A).

4. Linha de admissão e retirada de gás no cilindro de armazenagem: trata-se de uma bomba Toepler (C) e conjunto de torneiras de vácuo (D, E, F, G, H e J).

5. Linha de admissão e retirada de gás na câmara: constitui-se de uma série de torneiras de vácuo (L, M e N).

6. Conjuntos de "traps" (I e O): destinados a retirar impurezas de mercúrio, óxido nitroso da mistura de gases usado, excesso de dióxido de carbono (I), e a retirar o excesso de vapor d'água (O).

7. Barômetro (B).

8. Fluxômetro (P).

9. Bomba de Circulação (Q).

3.2.2. Funcionamento do sistema para incubação de plantas sob atmosfera controlada.

1. Admissão de gás no cilindro metálico: feito o vácuo no cilindro a 10^{-2} torr o gás foi admitido.

2. Admissão de gás na câmara e circulação do mesmo: fechada a torneira D, foi admitido gás na câmara através de J, K e N até o equilíbrio ser estabelecido. Logo após, com o auxílio da bomba Toepler o resto da mistura de gás foi admitido através de G, F, H e J. Impurezas foram removidas, envolvendo-se os "traps" I com nitrogênio líquido. A seguir e durante todo o decorrer do experimento, fez-se a circulação da mistura de gás, fechando-se K, ligando-se a bomba de circulação Q para empurrar o gás através de N, que o injetava no "trap" O (emergido em água com gelo para retirar o excesso de vapor d'água da mistura), seguindo através do fluxômetro P e entrando novamente na câmara.

3. Retirada de gás da câmara no final do experimento: o gás voltava através de N, K e J, estando F e G fechadas. Após o equilíbrio, fechando-se H o gás era empurrado pela bomba Toepler até A. Para a reti-

rada do gás que sobrava no sistema, fechava-se D, e abria-se H para entrada de gás na bomba Toepler, acionava-se a mesma, fechando-se H e abrindo-se D. Repetia-se sucessivamente a operação até todo o gás da câmara ter-se acumulado no cilindro A.

4. Amostras da mistura de gases para análise: retiradas através da torneira M, após terem sido fechadas as torneiras N e K, tendo sido feito anteriormente o vácuo no tubo de amostragem.

3.2.3. Detalhes dos experimentos conduzidos na câmara em atmosfera controlada de 15-dinitrogênio.

Foram conduzidos 4 experimentos. Os "seedlings" conforme o tratamento eram cuidadosamente colocados dentro da câmara (Fig. 2). A seguir era feito o vácuo, até a pressão da ordem de 20 mm (tensão de vapor d'água a temperatura ambiente) e então era admitida a mistura de gases correspondente a cada experimento.

Exp. 11: Foram usados "seedlings" de cana-de-açúcar de uma variedade CP, gentilmente cedidos pelo Dr. Roberto Cesnik, geneticista do Planalsucar, crescidos em mistura de solo mais subproduto de manufatura de café solúvel, mais bagacilho de cana nas mesmas proporções. Esta mistura estava contida em um saco de polietileno. O bloco de solo tinha 7cm de diâmetro x 10 cm de altura. As plantas, conjunto de 5 "seedlings" de 3 meses de idade, foram retiradas cuidadosamente do bloco, sacudidas para eliminar o excesso de solo em torno do sistema radicular (sistema perturbado), e colocadas na câmara. Os seguintes tratamentos foram testados:

A: Plantas inteiras;

B: Partes aéreas septadas da raiz;

C: Plantas inteiras que haviam recebido 15 ml de solução de glicose a 1,5% no bloco, de solo, antes do esboroamento para retirada da amostragem.

Os tratamentos A e B receberam água destilada (15 ml) para serem comparáveis a C.

A mistura de gás inicial era a seguinte: N₂ 84% com 15-N₂ a 95%, O₂ 2,2%, CO₂ 2,3% e Ar 11,0%.

Após o período de incubação de 24 horas, a mistura utilizada foi novamente armazenada e retiradas as plantas. As raízes foram separadas da parte aérea para constituírem duas amostras por tratamento. Estas foram secadas a 60°C, determinado o peso após a secagem completa, quando então foram moídas para análise de nitrogênio total através do método de Kjeldahl, com digestão em ácido sulfúrico e posterior destilação, e determinação de 15-nitrogênio pelo método de Dumas modificado (VICTORIA, 1975), com o uso do espectrômetro de massa. Resultados no Quadro 16.

Exp. 12: Método semelhante ao experimento 11, com os seguintes tratamentos:

- A. sistema intacto (bloco de solo + planta, já descrito anteriormente). Dois conjuntos.
- B. sistema perturbado (Planta inteira, retirada do bloco de solo).
- C. Idem B, porém com a raiz septada da parte aérea.
- D. Idem A, porém permanecia fora da câmara, junto do sistema para servir de testemunha.

Mistura de gás inicial: N₂ 41,13%; O₂ 2,47%; CO₂ 0,06% e Ar 52,22%. Resultados no Quadro 17.

Exp. 13: Tratamentos idênticos ao Exp. 2, porém neste, a mistura de gás inicial continha 15% de oxigênio. Resultados no Quadro 18.

Exp. 14: Neste experimento duas plantas em sistema intacto foram colocadas dentro da câmara por um período de 6 dias. Um bloco com plantas inteiras, em idênticas condições, permaneceu fora da câmara para controle e também servir de testemunha. A mistura de gás inicial possuía 20% de Oxigênio e o CO₂ era controlado a teores próximos do normal através de passagem da mistura gasosa em cal sodada. Resultados no Quadro 19.

3.3. Isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio.

O isolamento de bactérias fixadoras de nitrogênio foi feito colocando-se pedaços de raízes ligeiramente mergulhadas na superfície do meio de cultura LG (KH₂PO₄ - 0,4 g; K₂HPO₄ - 0,1 g; MgSO₄ . 7 H₂O - 0,02g; NaCl - 0,1 g; FeCl₃ - 0,01 g; NaMoO₄ . 2 H₂O - 0,002 g; solução alcoólica de azul de bromotimol a 0,5% - 5 ml; sacarose - 10,0 g; agar - 12 g; água

destilada - 1000 ml) distribuído em placa de Petri (foto 3). As bactérias que se desenvolviam, após a purificação eram transferidas para tubos de ensaio com o mesmo meio de cultura. A capacidade de fixação de nitrogênio das diferentes colônias era testada, retirando-se uma colônia em pleno desenvolvimento, pura, a qual era colocada em vidro de 10,0 ml, e incubada sob atmosfera de 10% de acetileno durante 30 minutos, sendo retiradas amostras para análise do etileno evoluído, por cromatografia de gás, de 10 em 10 minutos.

Observações da bactéria "in situ" foram feitas mergulhando-se raízes (lavadas ligeiramente em água para eliminar excesso de solo) em solução de lactofenol: fenol cristalizado - 20,0g; ácido lático - 20,0 g ; glicerina - 40,0 g; água destilada - 20,0 ml; anilina azul - 0,1 g. Uma gota da solução de lactofenol, era colocada sobre a raiz em uma lâmina, que após aquecimento ligeiro, sob chama direta, era coberta por uma lamínula para observação no microscópio. A foto 4 mostra detalhe de colônia de bactérias na raiz de cana-de-açúcar.

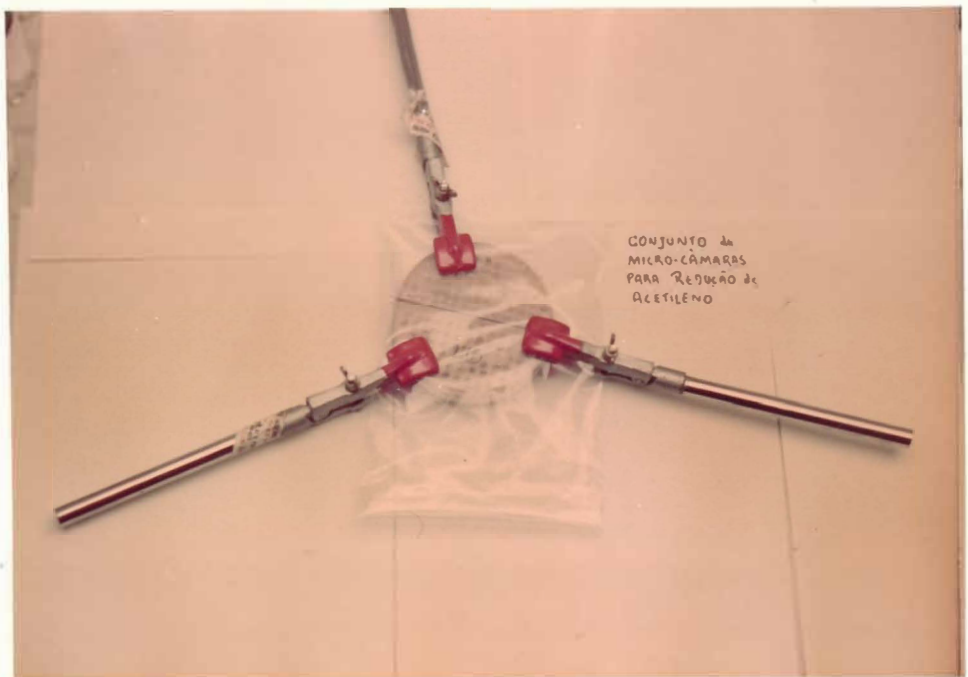


Foto 1. Conjunto de duas placas de lucite, contendo minicâmaras, usada na incubação de segmentos de raízes e determinação da atividade da nitrogenase.

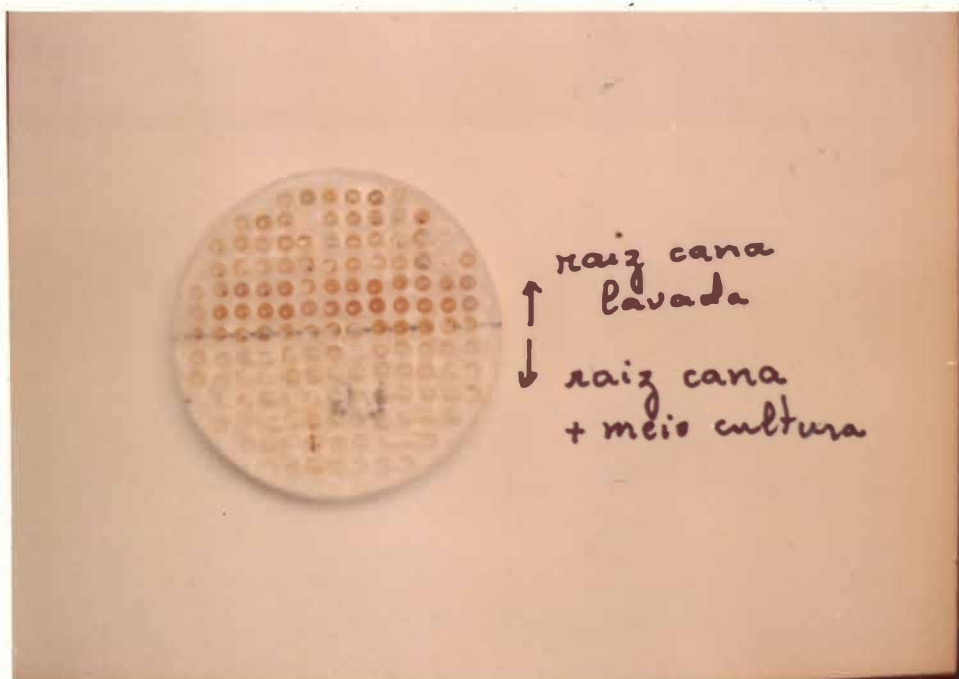


Foto 2. Placa de lucite com minicâmaras, mostrando reação com o reagente de Schiff, que evidencia a presença de etileno após a incubação de segmentos de raízes, sob atmosfera de acetileno, para determinação da atividade da nitrogenase.

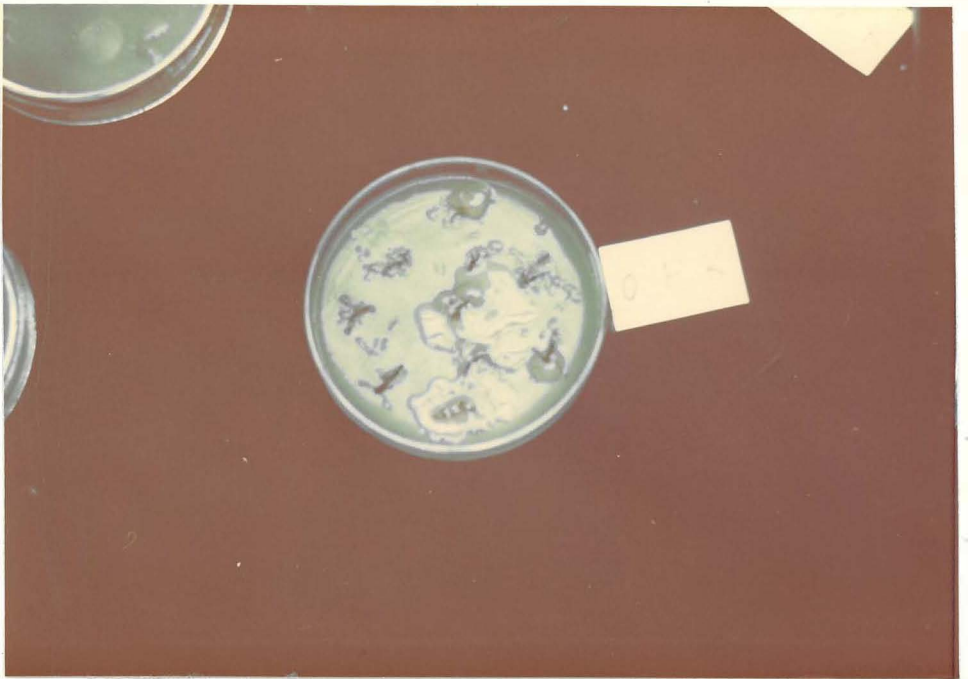


Foto 3. Colônias de bactérias fixadoras de nitrogênio obtidas de raízes, após 48 h de incubação, em meio de cultura com agar sem nitrogênio mineral.

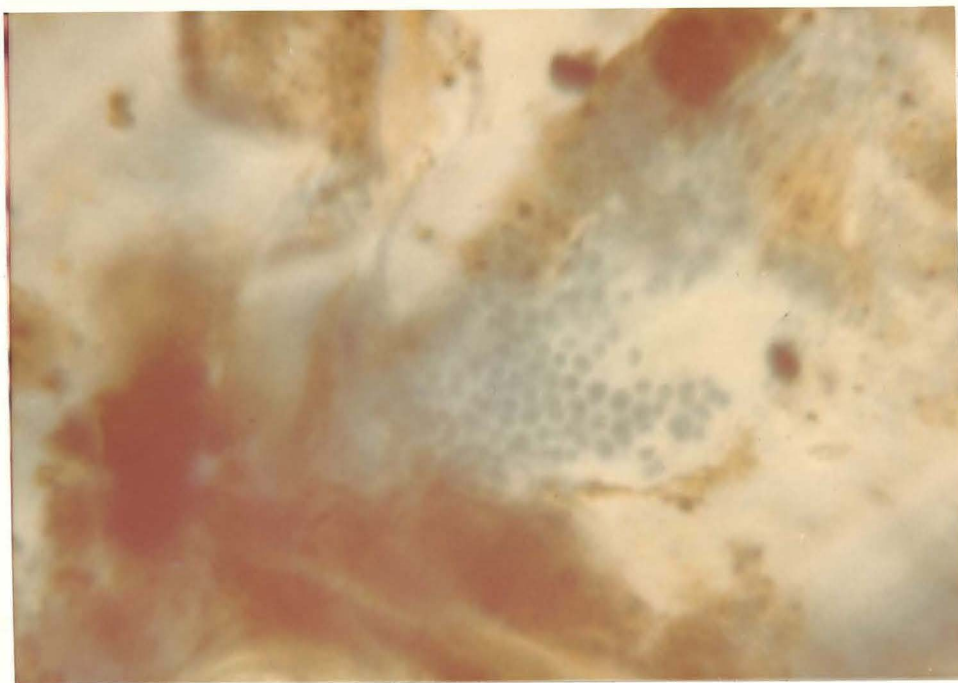


Foto 4. Detalhes de células de raiz de cana-de-açúcar, coletada no campo, mostrando colônia de bactéria. Montagem feita em lactofenol, com aumento de 800 v, sob imersão.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

4.1. Atividade da nitrogenase em sistema intacto e perturbado

Tendo em vista que a maioria dos estudos em fixação não simbiótica de nitrogênio no sistema solo-planta foram feitos modificando-se drasticamente o sistema (*HARRIS & DART, 1973; PATRIQUIN & KNOWLES, 1972; DOBEREINER et al., 1972a e b; YOSHIDA & ANCAJAS, 1971; RUSCHEL et al., 1975*), neste trabalho procurou-se comparar o efeito do sistema intacto, que representa as condições normais de desenvolvimento da planta, e sistema perturbado, que seria representado por modificações introduzidas no primeiro, tais como retirada do solo em torno da raiz, lavagem do material que envolvia a mesma, ou utilização de amostragem de raiz coletada no campo.

Observou-se que a atividade de nitrogenase avaliada através da redução de acetileno em sistema intacto era geralmente maior que em

sistema perturbado (fig. 3, 5 e 11). Inumeras razões poderão ser apontadas para justificar esta observação. Ao se modificar o sistema aparece um retardamento inicial ("fase lag") para a atividade da nitrogenase (RINAUDO, 1970; RINAUDO *et al.*, 1971; DOBEREINER, 1972b), que seria não só uma adaptação ao novo substrato acetileno, bem como uma resposta a condições de nova atmosfera de O_2 e CO_2 ; ou além deste retardamento inicial uma interferência na atividade da fotossíntese que será discutida posteriormente. Por outro lado, o volume de solo no sistema intacto é bem maior que aquele do sistema perturbado e possui população ativa de microrganismos fixadores de nitrogênio, enquanto que no sistema perturbado, além do volume de solo ser bem pequeno, o equilíbrio microbiano do solo e fisiológico da planta foi severamente modificado em todos os sentidos.

Na Fig. 3 nota-se que a adição de fonte energética (glicose) em sistema intacto aumentou a atividade da nitrogenase após 26 horas de incubação sob atmosfera de acetileno, enquanto que plantas que tiveram suas raízes mergulhadas em solução de glicose, sistema perturbado, apresentaram atividade da nitrogenase bem inferior que plantas não tratadas, provavelmente devido a competição com outros microrganismos não fixadores de nitrogênio. No entanto, quando o sistema era intacto, fica difícil atribuir-se os aumentos observados na atividade da nitrogenase somente a cana-de-açúcar, uma vez que também poderiam ser devidos a microflora autóctone do sistema (rizosfera e solo).

As taxas de fixação de nitrogênio diminuíram sensivelmente após o período noturno em ambos os sistemas, sendo mais acentuada em sistema intacto, o que sugere um efeito da luz sobre a atividade da nitrogenase. Esta observação é válida mesmo para raízes soltas (Fig. 10). Em se tratando de plantas inteiras, a luz poderia influenciar indiretamente no aumento dos produtos da fotossíntese, os quais serviriam de substrato para os microrganismos fixadores de nitrogênio, ou diretamente se os microrganismos responsáveis pela fixação necessitassem de luz para exercerem sua função. Entretanto o decréscimo da atividade da nitrogenase, no período noturno, em raízes soltas, poderia indicar efeitos indiretos, como por exemplo, aumento da temperatura sob presença de luz, que favoreceria a atividade das bactérias fixadoras de nitrogênio. Nota-se também que após um decréscimo inicial em plantas inteiras, em sistema intacto, há uma tendência para aumento da taxa de fixação de nitrogênio quando é adicionada uma substância energética (fig. 4, 6, 8 e 12), enquanto que para sistemas

perturbados esta observação nem sempre é real (Fig. 4); *BALANDREAU et al.* (1974), estudando variações diurnas da atividade da nitrogenase também notaram diminuição daquela atividade em períodos noturnos, correlacionando tais efeitos com a fotossíntese.

Numa tentativa de se observar o efeito de substâncias energéticas na fixação não simbiótica de nitrogênio, foram adicionadas ao sistema radicular de cana-de-açúcar, glicose (Figs. 3, 5 e 9) sacarose e malato (Fig. 9), as quais sempre aumentavam a atividade da nitrogenase, exceto em um experimento (Fig. 3). Este aumento foi proporcional a concentração, quando plantas inteiras ou raízes eram testadas em sistema perturbado (Figs. 5 e 7), o mesmo acontecendo, em sistema intacto, com plantas inteiras, porém em raízes testadas sob sistema intacto, tratamento com concentração mais elevada de glicose apresentou atividade da nitrogenase menor que tratamento com concentração mais baixa de glicose (Fig. 7). O sistema intacto foi o que apresentou maiores aumentos durante o decorrer dos experimentos. Conclui-se desta forma, que a adição de substrato ao meio aumenta a atividade da nitrogenase.

Os aumentos observados em raízes sem solo aderente levam a crer que a população de microrganismos fixadores de nitrogênio na raiz tem um grande potencial de fixação. Dentre as fontes energéticas testadas, a glicose parece ter oferecido resultados mais eficientes.

A taxa de fixação foi severamente modificada pela adição de substância energética (Figs. 4, 6, 8 e 10). Em sistemas perturbados a taxa de fixação foi alta em relação às demais quando o teor de glicose adicionado era elevado (5%, Figs. 6 e 8), o que sugere a necessidade de altos índices de carboidratos para o aumento da população fixadora ou atividade dos mesmos em torno da raiz.

Os efeitos observados indicam que ao serem adicionadas substâncias energéticas ao solo a população microbiana poderá beneficiar-se, induzindo maior fixação biológica de nitrogênio no sistema solo-planta.

Conforme poderá ser observado na maioria dos quadros, há uma grande variabilidade nos resultados com o uso de cromatografia de gás, que talvez pudesse ser atribuída ao efeito do genótipo dos diferentes "seedlings" usados nos diferentes experimentos. Entretanto, ao se observar os dados do Quadro 1, nota-se que não existe uma relação entre varie-

dades de cana-de-açúcar e atividade da nitrogenase. Os valores encontrados para períodos de incubação semelhantes, variam de nanomoles para micromoles por grama de raiz, em plantas da mesma idade, se bem que em experimentos feitos em épocas diferentes. Comparando-se plantas da mesma variedade, no mesmo experimento, verifica-se também grandes variações, parecendo que a variabilidade existente seja mais devida ao meio que a própria planta. Com efeito, *BALANDREAU (1975)*, *DOBEREINER et al. (1972b)* e *JURGENSEN (1973)*, observaram modificações na atividade da nitrogenase devida ao solo, luz e nutrição da planta. Sendo assim, acredita-se que os efeitos discutidos neste trabalho, sejam devidos principalmente aos tratamentos testados. Justifica-se o uso de "seedlings" de diferentes variedades dentro de um mesmo experimento, pela escassez deste material, obtido em determinadas épocas do ano, sob condições muito especiais de cultivo. No entanto, trata-se do material mais representativo de cana-de-açúcar, uma vez que plantas obtidas sob condições de campo, são por demais desenvolvidas para serem seladas e incubadas sob condições de laboratório. Acredita-se que estudos posteriores deveriam ser desenvolvidos com clones, material reproduzido normalmente em condições de campo, uma vez que, de início, os toletes possuem elevado teor de fonte energética que certamente influirá na microflora da rizosfera. Testes preliminares de inoculação de toletes, antes do plantio, evidenciaram alta atividade da nitrogenase, nos tratamentos inoculados, na primeira semana. Após este período e até 3 semanas após o plantio, aquela atividade foi semelhante para todos os tratamentos, evidenciando a presença de população nativa de microrganismos eficientes na fixação de nitrogênio.

4.2. Inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio.

Inoculação com misturas de microrganismos aumentou mais a atividade da nitrogenase que inoculação com bactéria em cultura pura (Fig. 9), o que indica o estabelecimento de um equilíbrio adequado mais rápido para misturas de microrganismos. Taxas de fixação mais elevadas apareceram em tratamentos inoculados (Fig. 10) que em tratamentos que receberam glicose ou sacarose, o que induz a uma conclusão preliminar da viabilidade da inoculação em cana-de-açúcar. No entanto, estudos mais detalhados deverão ser feitos neste sentido, sobre a sobrevivência da bactéria inoculada no meio e interação com a planta.

4.3. Atividade da nitrogenase avaliada por método qualitativo.

O método da redução do acetileno tem sido bastante usado na determinação da atividade da nitrogenase e trouxe uma verdadeira revolução no estudo da fixação biológica de nitrogênio. Não resta dúvida que o uso da cromatografia de gás na determinação de etileno é mais adequado, porém, um cromatógrafo é um aparelho dispendioso para ser adquirido por laboratórios comuns. O método descrito neste trabalho, trata-se de modificações do método desenvolvido em N.R.C. Praierie Laboratory em Saskatoon, Canadá, diferenciando-se pelo reagente colorimétrico e material empregado. Este método se evidenciou aplicável em trabalhos rotineiros com a finalidade de se observar a atividade da nitrogenase nos mais variados tratamentos. No Quadro 12 observa-se reação positiva somente nas raízes incubadas, individualmente em cada câmara, indicando a viabilidade do método e do conjunto elaborado. Por outro lado, nota-se que somente parte das raízes testadas apresentaram reação positiva (53,2%), indicando a atividade da nitrogenase restrita a determinadas minicâmaras, o que também justifica o uso e aplicação do método preconizado.

A viabilidade deste método foi comprovada em diferentes experimentos. Testou-se o efeito de adições de glicose adicionada em meio de cultura sem nitrogênio (Quadro 13), e substâncias energéticas (Quadros 14 e 15). Nota-se que a adição de glicose mais sais minerais não aumentou a atividade da nitrogenase em raízes de toletes recém germinados, mesmo nos inoculados, o que sugere uma competição inicial das bactérias fixadoras de nitrogênio com outras que populam o sistema, ou que o excesso de substâncias energéticas que o tolete continha, mascarava os resultados devido à glicose. Deve-se observar que em ambos os experimentos de raízes de toletes germinados sob condições de laboratório o número de raízes com reação positiva era pequeno. A hipótese da senescência e morte das bactérias durante o período de incubação na minicâmara, fica afastada ao se observar os dados do Quadro 15, quando adições de glicose, sacarose e melato estimularam a atividade da nitrogenase em raízes coletadas no campo.

4.4. Incubação de "seedlings" sob atmosfera de 15-dinitrogênio.

Plantas incubadas em atmosfera controlada evidenciaram que o sistema fixador se encontra em torno da raiz. Os teores de 15-nitrogênio

encontrados no solo da rizosfera, principalmente quando a glicose foi adicionada ao meio, corroboram os resultados obtidos com redução de acetileno, quando foi observado que adições de substâncias energéticas aumentavam a atividade da nitrogenase no sistema (Figs. 5 e 7), e sugerem um efeito indireto da planta na população de microrganismos fixadores de nitrogênio da rizosfera e imediações, os quais estariam na dependência de substâncias energéticas fornecidas pela mesma. Comparando-se os resultados obtidos nos tratamentos com e sem glicose, observa-se que maior fixação foi obtida nos primeiros, a qual se refletiu na planta, que apresentava teores de nitrogênio na raiz, duas ou cinco vezes maiores que nas demais testadas naquele experimento. Infelizmente, não foi possível realizar-se uma análise mais acurada neste experimento, que pudesse demonstrar transporte de nitrogênio para a parte aérea da planta. Sem esta observação, os aumentos de nitrogênio na raiz de planta que recebeu glicose no solo, poderiam ser devidos ao solo não retirado com a lavagem feita em água corrente ou substâncias aderentes nas superfícies das raízes.

Plantas em sistema perturbado (Quadros 16 e 17) e em sistema intacto (Quadros 18 e 19) evidenciaram fixação de nitrogênio na raiz e transporte para a parte aérea da planta sob condições normais simuladas (Quadro 19), ou sob condições de teor médio de oxigênio (7%) e alto teor de dióxido de carbono (Quadro 18), enquanto que fixação de nitrogênio na raiz foi observada em todos os experimentos (Quadros 16, 17, 18 e 19). A observação do transporte de nitrogênio para a parte aérea da planta ficou evidente nos experimentos onde a análise de 15-nitrogênio foi mais apurada (δ ‰/‰), o que indica a efetividade do sistema fixador, tendo em vista o período de incubação usado, e a diluição do nitrogênio na planta, uma vez que se usava "seedlings" bem desenvolvidos, com três meses de idade.

As respostas obtidas nos diferentes experimentos parecem não estarem ligadas à maior ou menor concentração de dióxido de carbono. Em experimento semelhante, onde a atividade da nitrogenase foi determinada através de cromatografia de gás (Quadros 10 e 11 e Figuras 11 e 12), "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados sob atmosfera de acetileno, não evidenciaram aumentos na atividade da nitrogenase devido ao aumento de concentração de CO_2 , em sistema intacto e perturbado, mesmo após 23 horas de incubação. Os aumentos da atividade da nitrogenase com o aumento da concentração de CO_2 , parecem estar mais ligados à fotossíntese que a efeiu

tos diretos sobre a nitrogenase (WILSON, 1940). Plantas de fotossíntese C_3 respondem ao aumento de concentrações de CO_2 , porém na cana-de-açúcar, planta C_4 , a fotossíntese poderia continuar mesmo em baixas concentrações de CO_2 , o que explicaria a falta de resposta dos tratamentos com CO_2 nos experimentos relatados. Observou-se que nos experimentos onde a concentração de CO_2 era elevada, porém com baixas concentrações de oxigênio (Quadros 16 e 17), a fixação de nitrogênio parece ter sido mais favorecida que nos experimentos onde a concentração de oxigênio era elevada, o que está de acordo com a sugestão de HARDY & HAVELKA (1975), os quais sugerem que deva existir, mesmo em sistemas biológicos de formas livres, proteção em relação ao oxigênio.

4.5. Atividade da nitrogenase e microrganismos fixadores de nitrogênio

A nitrogenase é extremamente sensível ao oxigênio, e esta limitação pode ser uma barreira para aumentos de nitrogênio em sistemas biológicos. Generalizando, a fixação de nitrogênio por microrganismos anaeróbios é mais eficiente que por microrganismos aeróbios, pois estes últimos devem possuir mecanismo que diminua a pressão interna de oxigênio, para facilitar a atividade da nitrogenase. *Azotobacter*, por exemplo, utiliza-se de elevadas taxas de respiração, enquanto que *Klavisia* e *Bacillus*, que são fixadores de nitrogênio facultativos, somente produzem nitrogenase em meio quase anaeróbio (HARDY & HAVELKA, 1975). Em Leguminosa o oxigênio é removido do lugar da fixação, nódulos, pela leghemoglobina, (BERGERSEN *et al.*, 1973), porém, em outros sistemas biológicos, a existência de um mecanismo de proteção da nitrogenase ao oxigênio seria necessário.

Os isolamentos de microrganismos fixadores de nitrogênio em cana-de-açúcar, em meio aeróbio, com agar ou sílica gel sem nitrogênio mineral, evidenciaram a presença de colônias com aspecto morfológico de colônias puras, mas que através de exame microscópico evidenciava mistura de microrganismos (foto 5). Ao tentar-se a separação dos mesmos em meio aeróbio, isolava-se a *Azotobacteriaceae* conhecida, perdendo-se as demais; em meio anaeróbio, não se observava desenvolvimento de nenhuma bactéria porém, a polimistura podia conservar-se com alta atividade da nitrogenase. Julga-se pois, que a colônia inicial constituía-se de microrganismos que podiam coexistir uma as expensas dos outros, como por exemplo, retirando-se o excesso de oxigênio para que um anaeróbio pudesse se desenvol

ver em meio aeróbio. Considera-se portanto neste trabalho, que a fixação de nitrogênio em cana-de-açúcar, seja mais devida a grupos de microrganismos que a uma única espécie de bactéria ou outro microrganismo.

4.6. Contribuição da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar.

Uma estimativa grosseira da fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar é apresentada, usando-se dados de experimentos de incubação de "seedlings" em câmara com atmosfera controlada com 15-dinitrogênio, e de experimento de incubação em acetileno.

Admitindo-se que 100 toneladas/ha de colmos e folhas (produção de cana-planta por ano) tenham 6,6 t de raízes, de acordo com *HUMBERT (1963)*, que cita variações médias de 15/1 para a relação parte aérea/raiz e tomando-se os valores de 3,42/ μ g de nitrogênio fixado por dia ou 18,78 μ g de N quando a glicose foi adicionada ao meio (Quadro 16), foi determinado o teor de nitrogênio fixado anualmente. Para tanto, admitiu-se que o crescimento do sistema radicular foi linear, alcançando seu máximo desenvolvimento no final do período de um ano. Foi calculado graficamente a área de um triângulo com base 365 (dias anuais) e altura igual ao nitrogênio fixado de acordo com a amostra $\times (6,6 \times 10^6)$ (peso total de raízes em grammas)/peso da amostra (g). A área do triângulo assim constituído equivalia-se respectivamente a 3,03 e 16,6 kg de nitrogênio/ha/ano sob tensão de oxigênio baixa. Em condições normais simuladas, aplicando-se o mesmo raciocínio e levando-se em consideração que o período de incubação foi de 6 dias, calculou-se 6,2 kg/ha/ano absorvidos pela planta e 0,4 kg de N/ha/ano nas raízes.

Em experimento com redução de acetileno (Quadro 6), amostra de planta inteira em sistema perturbado, tomada ao acaso, mostrava teores de etileno evoluído igual a 9 μ moles de etileno após 24 horas de incubação para planta com 2,23 g de raiz. Sabendo-se que a reação da nitrogenase para a redução de acetileno envolve 2 eletrons, enquanto que seriam usados na redução de nitrogênio seis eletrons (*RUSCHEL & RUSCHEL, 1974b*), o total de moles calculados foi dividido por 3. Procedendo-se da mesma maneira descrita acima, para cálculo de nitrogênio fixado, obteve-se 45,3 kg de N/ha/ano, valor este 15 vezes superior a estimativa feita para plantas incubadas em câmara com 15-nitrogênio, em sistema perturbado. Em sistema intacto, a estimativa com 22 μ moles e 2,84 g de raízes al

cançou o valor de 87 kg de N/ha/ano, o que vem a sugerir, que com o método da redução do acetileno, obtêm-se valores muito altos que na realidade deve representar a soma da atividade da nitrogenase da rizosfera e do solo propriamente dito.

Por outro lado, fazendo-se uma estimativa com os resultados obtidos na análise de 15 -nitrogênio no solo, e imaginando-se que a área explorada pelas raízes fosse de $2,3 \times 10^9$ kg de solo por hectare, tendo-se $0,19 \mu\text{g}$ de N/g de solo, a fixação calculada foi de 79,5 kg de N/ha/ano no solo, o que faria jus as observações com redução de acetileno. Não resta dúvida que se a planta conseguir retirar pelo menos metade do nitrogênio estimado, a fixação biológica de nitrogênio é um meio rendoso, que a natureza presenteou à agricultura, notadamente no Brasil, onde 1,3 milhões de hectares são plantados com cana-de-açúcar.

4.7. Variação natural de 15 -nitrogênio em cana-de-açúcar.

Com a finalidade de se observar variações naturais de 15 -nitrogênio em cana-de-açúcar, foram feitas análises de 13 amostras de folhas colhidas sob condições normais de cultivo no campo, ao acaso, na região de Piracicaba, de plantas com quatro meses de idade, de diferentes variedades. Os resultados são apresentados na tabela abaixo, onde:

$$\delta^{15}\text{N} \text{ ‰} = \frac{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ amostra} \times {}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ ar}}{{}^{15}\text{N}/{}^{14}\text{N} \text{ ar}} \times 10^{-3}$$

Nº amostra	Nº folha	$\delta^{15}\text{N} \text{ ‰}$	$\frac{\text{N} \text{ ‰}}{\delta^{15}\text{N} \text{ ‰}}$
			$\delta^{15}\text{N} \text{ ‰}$
01	0,48	6,6	0,072
02	0,62	8,5	0,072
03	0,58	6,7	0,087
04	0,40	4,2	0,095
05	0,67	9,6	0,070
06	0,70	9,2	0,075
07	0,60	8,1	0,074
08	0,52	7,2	0,072
09	0,40	4,3	0,092
10	0,83	11,8	0,071
11	0,48	5,2	0,092
12	0,61	8,0	0,075
13	0,63	6,0	0,105
M	0,58	7,3	0,08

Os resultados mostraram variações de $\delta \text{ ‰}$ de 4,31 a 11,77, e média de 7,33. A variação natural parece estar correlacionada com o nitrogênio percentual. As variações isotópicas natural em folhas de cana-de-açúcar devem ser devidas a fracionamentos isotópicos que ocorrem no solo, em função do teor de ^{15}N do solo original, do adubo e da atividade dos microrganismos durante as diversas transformações de distintas formas de nitrogênio.

Em trabalhos em que se procura uma identificação dos diversos processos para a seletividade de ^{15}N , um número muito maior de amostras deverá ser examinado, em condições de campo, onde haja registros históricos da utilização do solo.

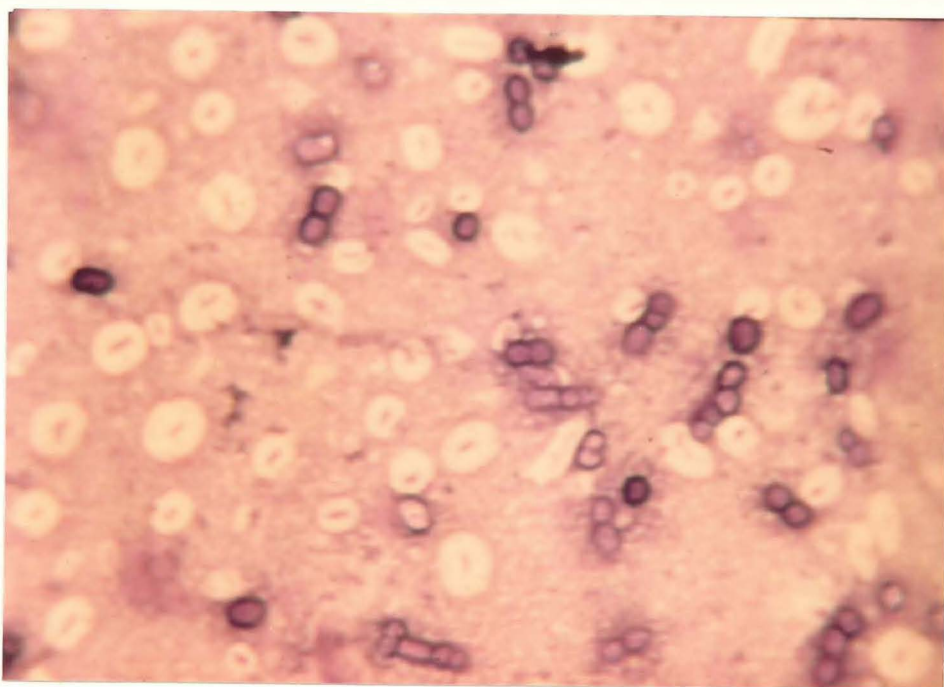


Foto 5. Mistura de bactérias em esfregasso corado com *sudan-black*. Aumento de 800 v, sob imersão.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Diversos experimentos foram conduzidos com a finalidade de se avaliar a fixação biológica de nitrogênio em cana-de-açúcar. Foi observada a atividade da nitrogenase em plantas inteiras e raízes de cana-de-açúcar em sistema intacto e perturbado, utilizando-se o método da redução de acetileno, sendo o etileno evoluído determinado por cromatografia de gás e por método químico-colorimétrico; bem como, foi estimada a fixação de nitrogênio, incubando-se "seedlings" de cana-de-açúcar em câmara com atmosfera controlada com 15 -dinitrogênio.

Os resultados obtidos evidenciaram a presença de sistema fixador em torno das raízes de cana-de-açúcar e no solo da rizosfera.

Plantas testadas em sistema intacto demonstraram maior atividade da nitrogenase em sistema perturbado, porém ficou evidente que a fixação de nitrogênio não foi inibida em sistema perturbado.

A incubação de "seedlings" de cana-de-açúcar em câmara com atmosfera controlada de 15 -dinitrogênio mostrou que a planta pode utilizar o nitrogênio fixado em sua rizosfera, parecendo ser este o método mais eficiente para comprovação de fixação por microrganismos livres fixadores de nitrogênio, no sistema solo-planta.

A utilização de método químico-colorimétrico da determinação de etileno em minicâmaras para observação da atividade da nitrogenase em segmentos de raízes, mostrou-se eficiente, possibilitando uma visão panorâmica de pontos de maior fixação em determinado sistema.

Adições de substâncias energéticas aumentaram a atividade da nitrogenase em plantas inteiras e em raízes em sistema intacto ou perturbado. Comprovação de maior fixação de nitrogênio, quando a glicose foi adicionada ao solo, foi obtida em experimento de 15 -nitrogênio, no caso, somente testada em sistema perturbado.

Adições de glicose, sacarose e malato em raízes soltas aumentaram a atividade da nitrogenase de acordo com o período de incubação, o que indica a presença de microrganismos fixadores nas mesmas e grande potencial de fixação de nitrogênio dos mesmos.

Os aumentos da atividade da nitrogenase e da fixação de nitrogênio quando uma substância energética é adicionada ao solo, sugerem que modificações no sistema solo-planta poderão trazer benefícios à cultura de cana-de-açúcar.

Ao inocularem-se raízes de cana-de-açúcar destacadas com mistura de microrganismos, observou-se alta atividade da nitrogenase, a qual aumentou durante o período de incubação.

A fixação de nitrogênio no solo foi comprovada e foi bem mais elevada quando glicose foi adicionada ao solo.

O transporte de nitrogênio para a parte aérea da planta também ficou evidente ao se adotar uma análise de nitrogênio- 15 mais apurada ($\delta^{15}\text{N} \text{ ‰/‰}$).

Estimativas grosseiras do nitrogênio fixado, usando os resultados dos experimentos de incubação de "seedlings" em câmaras com 15 -dini

trogênio, evidenciaram fixações de nitrogênio nas raízes de 3,3 kg de N/ha/ano em sistema perturbado, sendo este teor elevado a 16,6 kg de N/ha/ano quando glicose foi adicionada ao solo. Em sistema intacto foi observado que a planta pode absorver 6,2 kg de N/ha/ano (N na parte aérea). No solo, a fixação foi estimada em 79,5 kg de N/ha/ano.

A abundância de 15 -Nitrogênio em folhas de cana-de-açúcar cultivadas no campo em δ ‰, variou de 4,31 a 11,77, com médias em torno de 7,33.

6. SUMMARY

Several experiments were carried out to evaluate biological nitrogen fixation in sugar cane. Nitrogenase activity in whole plants and roots of sugar cane in intact and disturbed system were observed, using acetylene reduction method. The evolved ethylene being determined using gas chromatography and colorimetical method. Nitrogen fixation was also estimated by the incubation of seedlings in 15 -dinitrogen controlled chamber.

The results obtained indicated the presence of a fixing system around sugar cane roots and in the rhizosphere soil. Plants tested in intact system showed higher nitrogenase activity than in disturbed system, however it became evident that the nitrogen fixation was not inhibited in the disturbed system.

The incubation of sugar cane seedlings in 15 -dinitrogen controlled chamber indicated that the plant can utilize the nitrogen fixed in its rhizosphere, showing an efficient method to determine N-fixation by free microorganisms and uptake of fixed nitrogen in the plant.

The utilization of colorimetric method in the determination of ethylene in minichambers to observe nitrogenase activity in the root segments, has proved to be efficient, making it possible to see sites of higher nitrogen fixation in a certain system.

The addition of energetic substance increased the nitrogenase activity in whole plants and in the root, both in intact and disturbed systems. According to incubation period the nitrogenase activity increased in detached roots when glucose, saccharose, and malate were added indicating the presence of nitrogen fixing microorganisms in the roots and their large N-fixation potential. The increases in nitrogenase activity and N-fixation when an energetic source is added, suggests that certain changes in the soil-plant system could be beneficial to sugar cane cultivation.

High nitrogenase activity was obtained when detached roots were inoculated with mixtures of microorganisms and this activity increased during incubation period. It was suggested that N-fixation in sugar cane was due to a group of microorganism, rather than just to one bacteria.

Nitrogen fixation in the soil has been proved and it was higher when glucose was added to the soil.

Nitrogen uptake by the top plant also became evident when a more accurate analysis of nitrogen- 15 was carried out ($\delta^{15}\text{N}^{\circ}/\text{oo}$).

Rough estimation of de N-fixed from results obtained with the experiments of incubation of seedlings in 15 -dinitrogen indicated 3.3 kg N/ha/yr from roots in disturbed system, this content being increases to 16.6 kg of N/ha/yr when glucose was added to the soil. In an intact system it was noted that the plant can uptake 6.2 kg of N/ha/yr (N in the top part of the plant). Nitrogen fixation in the soil was estimated at 79.5 kg N/ha/yr.

Nitrogen-15 abundance in sugar cane leaves from field plants varied from 4.31 to 11.77 with a mean of 7.33 $\delta^{15}\text{N}$ ‰/‰.

7. LITERATURA CITADA

- BALANDREAU, J.* 1975. Mesure de l'activité nitrogénasique des microorganismes fixateurs libres d'azote de la rhizosphère de quelques graminées. *Rev. d'Ecol. Biol. Sol.* 12:259-279.
- BALANDREAU, J.; MILLER, C.R. & DOMMERGUES, Y.R.* 1974. Diurnal variations of nitrogenase activity in the field. *Appl. Microb.* 27:662-665.
- BALANDREAU, J. & VILLEMIN, G.* 1973. Fixation biologique de l'azote moléculaire en Savane de Lamto (basse Côte d'Ivoire) résultats préliminaires. *Revue d'Écol. Biol. Sol.* 10:25-33.
- BECKING, J.H.* 1974. Biological nitrogen fixation and its economic significance. IAEA-PL-341/14:189-221.

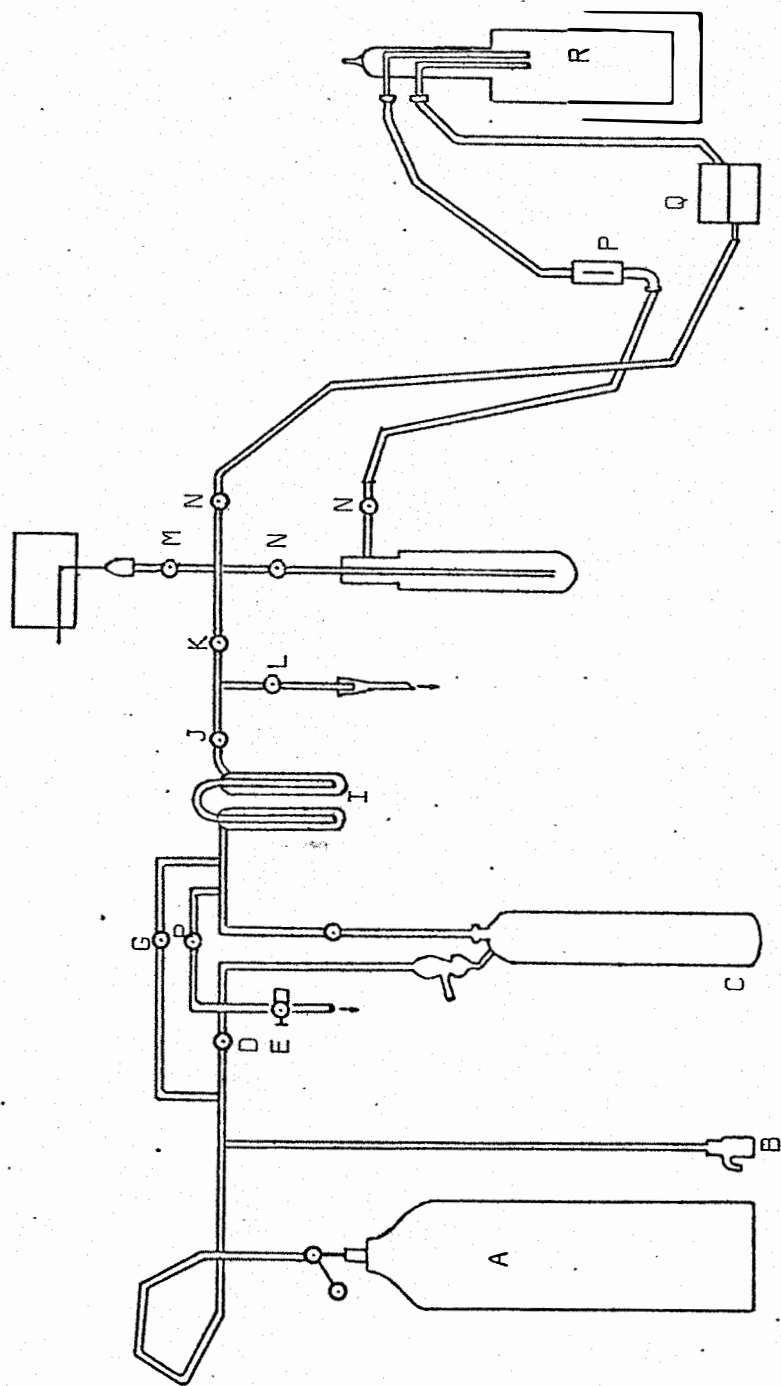
- BERGERSEN, F.J. 1971. Biochemistry of nitrogen fixation in legumes. An. Rev. Pl. Physiol. 22:121-140.
- BERGERSEN, F.J.; TURNER, G.L. & APPLEBY, C.A. 1973. Biochem. Biophys. Acta 292,271. In: The biology of nitrogen fixation Chap. 11.3 Formation and function of bacteroids 473-498. Ed. A. Quispel, North-Holland/American Elsevier.
- CHANG, P.E. & KUOWLES, R. 1965. Nonsymbiotic nitrogen fixation in some Quebec soils. Can. J. Microb. 11:29-38.
- CHERONS, N.D. & EUTRIKIN, J.B. 1963. Identification of organic compounds. A student's Text Using Semimicro Techniques. Wiley Intern. Edition. John Wiley & Sons, N.York-London.
- DE GEE, J.C. 1950. Preliminary oxidation potential determinations in a "sawab"-profile near Borgor (Java). Trans. 4th Int. Congr. Soil Sci. Amsterdam 1:300-303.
- DELWICHE, C.C. & WIJLER, J. 1956. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil. Plant and Soil 7:113-129.
- DOBEREINER, J. 1959. Influência da cana-de-açúcar na população de *Beijerinckia* no solo. Rev. Bras. Biol. 19:251-258.
- DOBEREINER, J. 1966. Uma bactéria fixadora de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum*. Pesq. agrop. brasil. 1:357-363.
- DOBEREINER, J. & ALVAHYDO, R. 1959. Sobre a influência da cana-de-açúcar na ocorrência de *Beijerinckia* no solo. II. Influência das diversas partes do vegetal. Rev. Bras. Biol. 19:401-412.
- DOBEREINER, J. & DAY, J.M. 1974. Associative symbiosis in tropical grasses. Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. International Symposium on N₂ Fixation - Interdisciplinary Discussions. Washington State University.
- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. & DART, P.J. 1972a. Nitrogenase activity in the rizosfera of sugar cane and some tropical grasses. Pl. and Soil 37:191-196.

- DOBEREINER, J.; DAY, J.M. & DART, P.J. 1972b. Rhizosphere associations between grasses and nitrogen-fixing bacteria: effect of O₂ and nitrogenase activity in the rhizosphere of *Paspalum notatum*. Soil Biol. Biochem. 5:157-159.
- DOBEREINER, J. & RUSCHEL, A.P. 1961. Inoculação de arroz com bactérias fixadoras de nitrogênio do gênero *Beijerinckia* Derx. Rev. Bras. Biol. 21:397-407.
- DOMMERMUES, J.; BALANDREAU, J.; RINAUDO, J. & WEINHARD, P. 1973. Non-symbiotic nitrogen fixation in the rhizospheres of rice, maize and different tropical grasses. Soil Biol. Biochem. 5:83-89.
- GROBELAAR, N.B.; CLARK, M.B.; HOUGH, H.C. & STRAUS, J.M. 1970. Biological nitrogen fixation of isolated roots of *Phaseolus vulgaris* L. II. The influence of light, carbon dioxide, and ethylene. Intern. Biol. Progr. Tech. Meeting - Wageningen. Netherlands.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HERBERT, R.R.; HOLSTEN, R.D. & JAKSON, E.K. 1971. Biological nitrogen fixation: A key to world protein. Pl. and Soil (Special volume):516-590.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. 1975. Nitrogen fixation research: A key to world food? Science 188:633-643.
- HARRIS, D. & DART, P.J. 1973. Nitrogenase activity in the rizosphere of *Stachys sylvatica* and some other dicotyledoneus plants. Soil Biol. Biochem. 5:277-378.
- HUMBERT, R.P. 1963. The growing of sugar cane. Chap. I. Factors affecting the growth of sugar cane:15-49.
- JURGENSEN, M.F. 1973. Relationship between nonsymbiotic nitrogen fixation and soil nutrient status - a review. J. Soil Sci. 24:512-522.
- JURGENSEN, M.F. & DAVEY, C.B. 1970. Non-symbiotic nitrogen fixing microorganisms in acid soil and risosphere. Soil Fert. 33:435-446.

- KASS, D.L.; DROSDOFF, M. & ALEXANDER, M. 1971. Nitrogen fixation by *Azotobacter paspali* in association with bahiagrass (*Paspalum notatum*). Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35:286-289.
- MULDER, E.G. & VAN VEEN, W.L. 1960. The influence of carbon dioxide on symbiotic nitrogen fixation. Pl. and Soil 13:265-278.
- PATRIQUIN, D. & KNOWLES, R. 1972. Nitrogen fixation in the rizosphere of marine angiosperms. Marine Biol. 16:49-78.
- RILEY, D. & BARBER, S.A. 1971. Effect of ammonium and nitrate fertilization on phosphorus uptake as related to root induced pH changes at the root soil interference. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 35:301-306.
- RINAUDO, G. 1970. Fixation biologique de l'azote dans trois types of sols de rizières de Côte d'Ivoire. Thèse Doctorat Ing. Fac. Sci. Montpellier, p. 121.
- RINAUDO, G.; BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Pl. and Soil (special volume):471-479.
- RUSCHEL, A.P. & BRITTO, D.P.P.S. 1966. Fixação assimbiótica de nitrogênio atmosférico em algumas gramíneas e na tiririca pelas bactérias do gênero *Beijerinckia* Derx. Pesq. Agrop. bras. 1:65-69.
- RUSCHEL, A.P.; HENIS, Y. & SALATI, E. 1975. Nitrogen-15 tracing of N-fixation with soil-grown sugarcane seedlings. Soil Biol. Biochem. 7:181-182.
- RUSCHEL, A.P. & RUSCHEL, R. 1974a. Inoculação de bactérias não simbióticas em milho e atividade da nitrogenase. XVI Reun. Nac. de Milho. Sete Lagoas. Brasil.
- RUSCHEL, A.P. & RUSCHEL, R. 1974b. Avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio em feijão. Rev. agrop. bras. (no prelo).

- STARKEY, R.L.* 1958. Interrelation between microorganisms and plant roots in the rizosphere. *Bact. Rev.* 22:152-172.
- STEWART, D.P.W.* 1973. Nitrogen-fixing blue-green algac. Pratical Paperback. Advanced Course on Microbiological Nitrogen Transformations. IV Global Impact of Applied Microbiology (GIAM IV). Campinas. S.Paulo. Brasil.
- TAKAHASHI, D.T.* 1968. Fate of ammonium and nitrate fertilizers in lysimeter studies with ^{15}N . *Haw. Plan. Rec.* 58:1-11.
- TAKAHASHI, D.T.* 1970a. Fate of applied fertilizer nitrogen as determined by the use of ^{15}N . III. Summer and Winter plants ratoon crops at two location on Kawai. *Haw. Plant. Rec.* 58:53-69.
- TAKAHASHI, D.T.* 1970b. ^{15}N field studies with sugarcane in coral soil. *Haw. Plant. Rec.* 58:119-126.
- VICTORIA, R.L.* 1975. Uso de $^{15}\text{N}_2$ com baixo enriquecimento para testes de fixação simbiótica. [Mestrado - ESALQ]
- VINE, H.; THOMPSON, H.A. & HARDY, F.* 1942. Studies on aeration of cacao Soils in Trinidad. Part I and II. *Trop. Agric. Trinidad* 19:175-180 and 215-236.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R.* 1971. Nitrogen fixation by bacteria in the root zone of rice. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 35:156-157.
- YOSHIDA, T. & ANCAJAS, R.R.* 1973. The fixation of atmosferic nitrogen in the rice rizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 5:153-155.
- WAKSMAN, S.A.* 1922. Microbiological analysis of soil as an index of soil fertility. III. Influence of Fertilization upon numbers of microorganisms in the soil. *Soil Sci.* 14:321-346.
- WILSON, P.W.* 1940. The biochemistry of symbiotic nitrogen fixation. The University of Wiscosin Press, Madison: 114-141.

8. APÉNDICE



A. Cilindro de armazenagem de gás; B. Barômetro; C. Bomba Toepler; D. Torneira entrada de gás; E. Torneira p/ vácuo; F e G. Torneira p/ admissão de gás na câmara; H. Torneira p/ retirada de gás na câmara; I. "Traps"; J e K. Torneiras; L. Saída de vácuo; M e N. Torneira p/ retirada de amostra de gás da câmara; O. Trap. para vapor d'água; P. Fluxômetro; Q. Bomba de vácuo; R. Câmara de incubação.

Fig. 1. Sistema de incubação de plantas sob atmosfera controlada com $^{15}\text{N}_2$

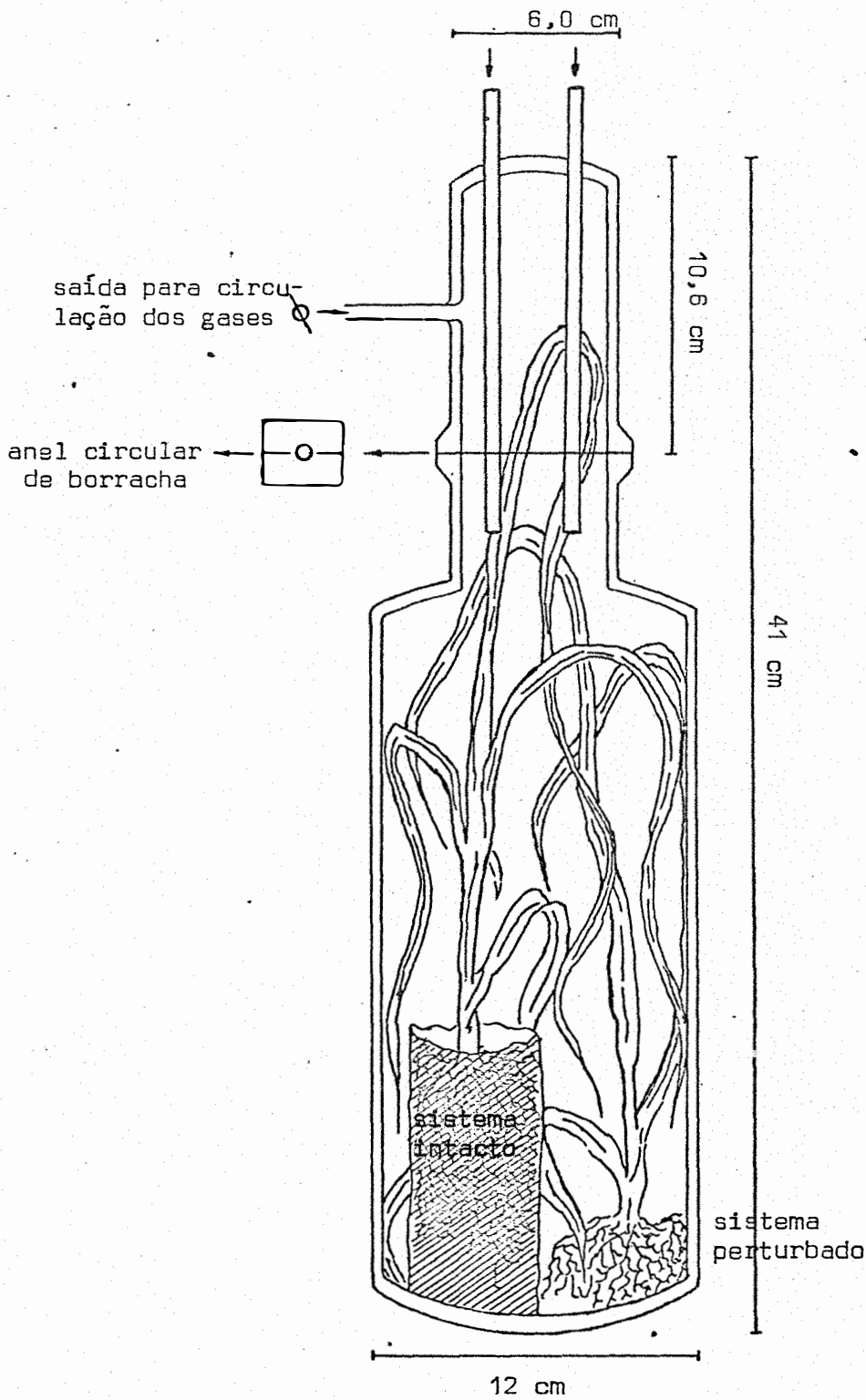
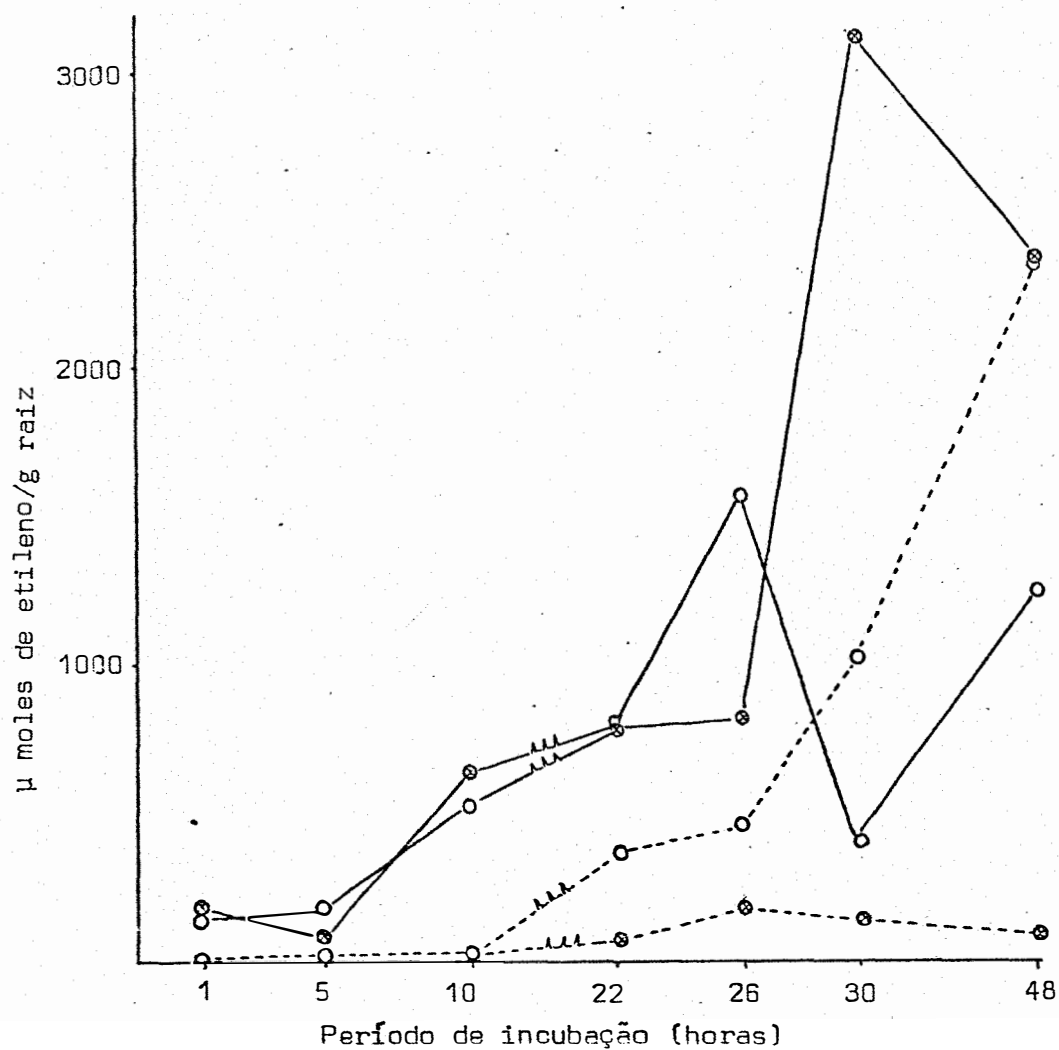
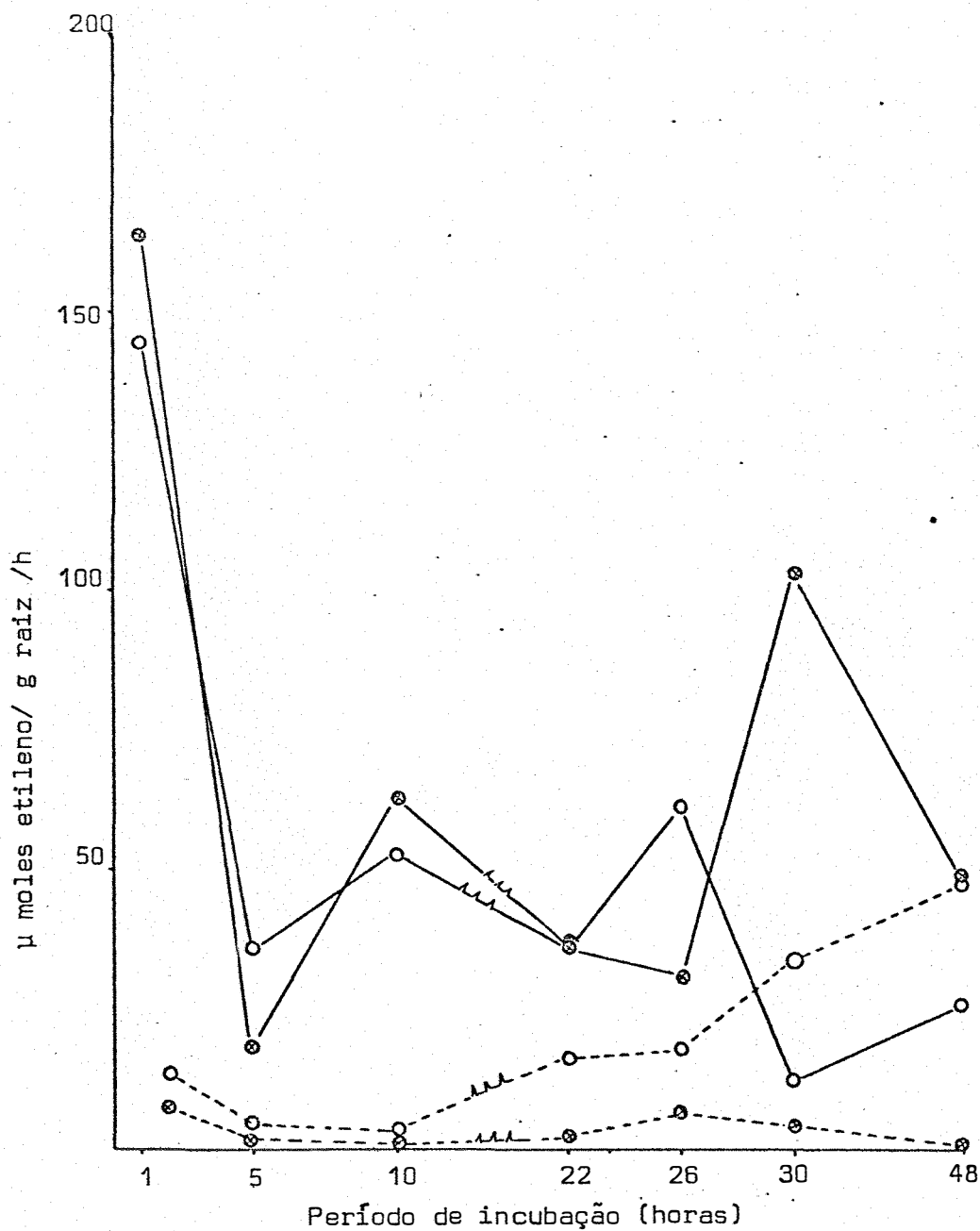


Fig. 2. Detalhe da câmara de incubação.



- o — o sistema intacto, planta inteira
 x — x idem + glicose 1%
 o - - - o sistema perturbado, planta inteira
 x - - - x idem + glicose 1%

Fig. 3. Efeito da glicose na atividade da nitrogenase em planta inteira e raiz de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.



- — ○ sistema intacto, planta inteira
- — ■ idem + glicose 1%
- - - - ○ sistema perturbado, planta inteira
- - - - ■ idem + glicose 1%

Fig. 4. Efeito da glicose na taxa da redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em planta inteira e raiz em sistema intacto e perturbado.

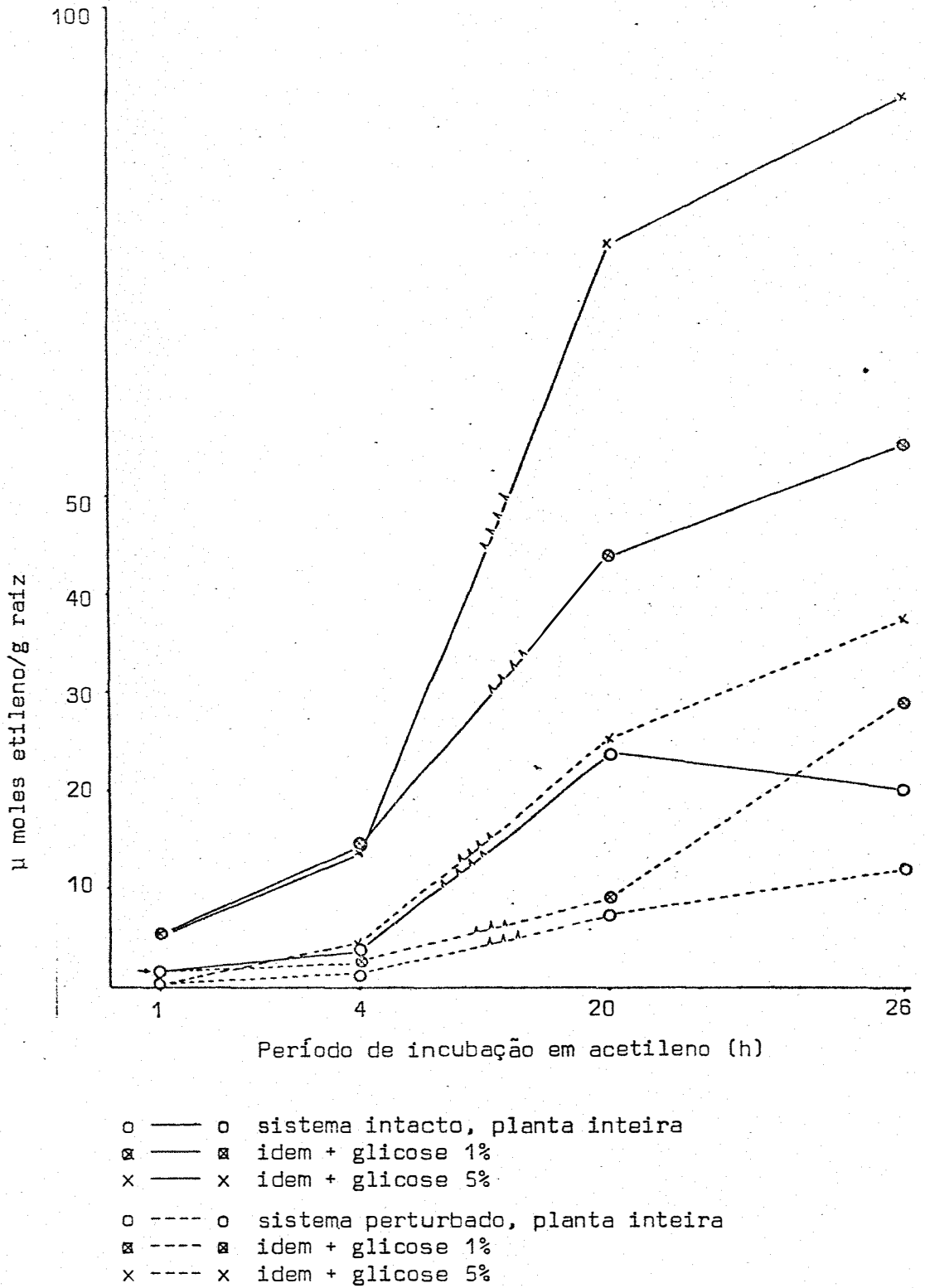
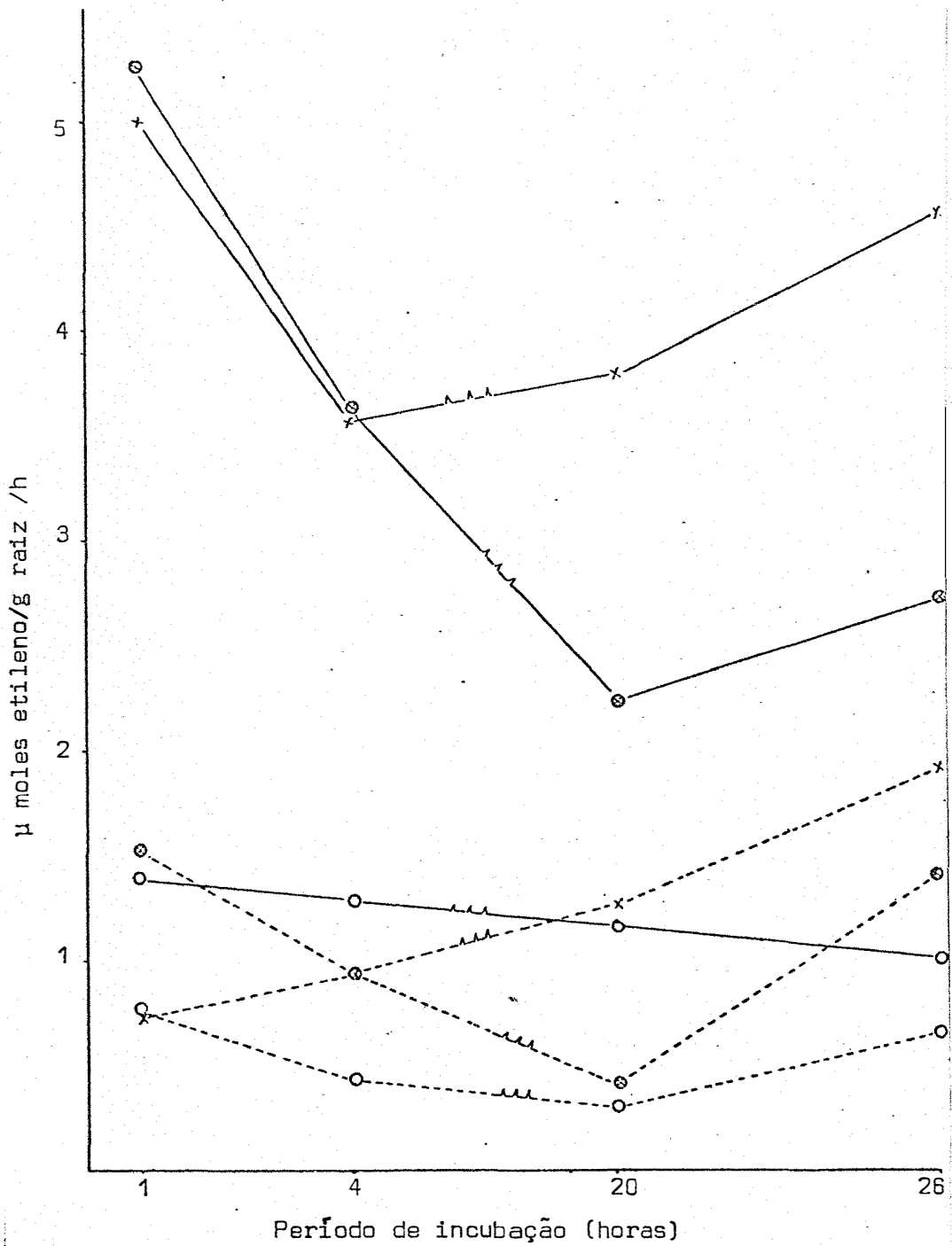
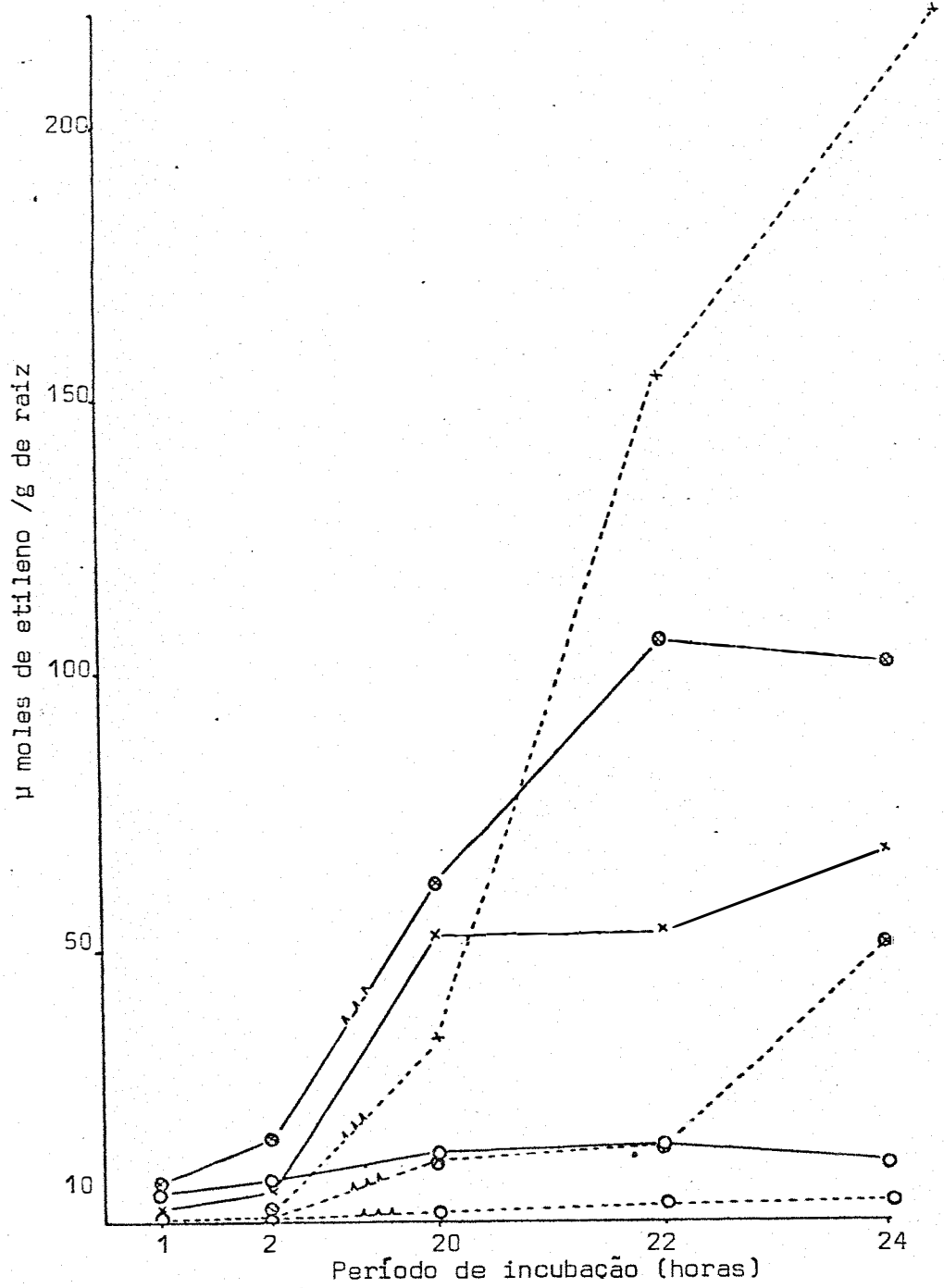


Fig. 5. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrogenase em raízes de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.



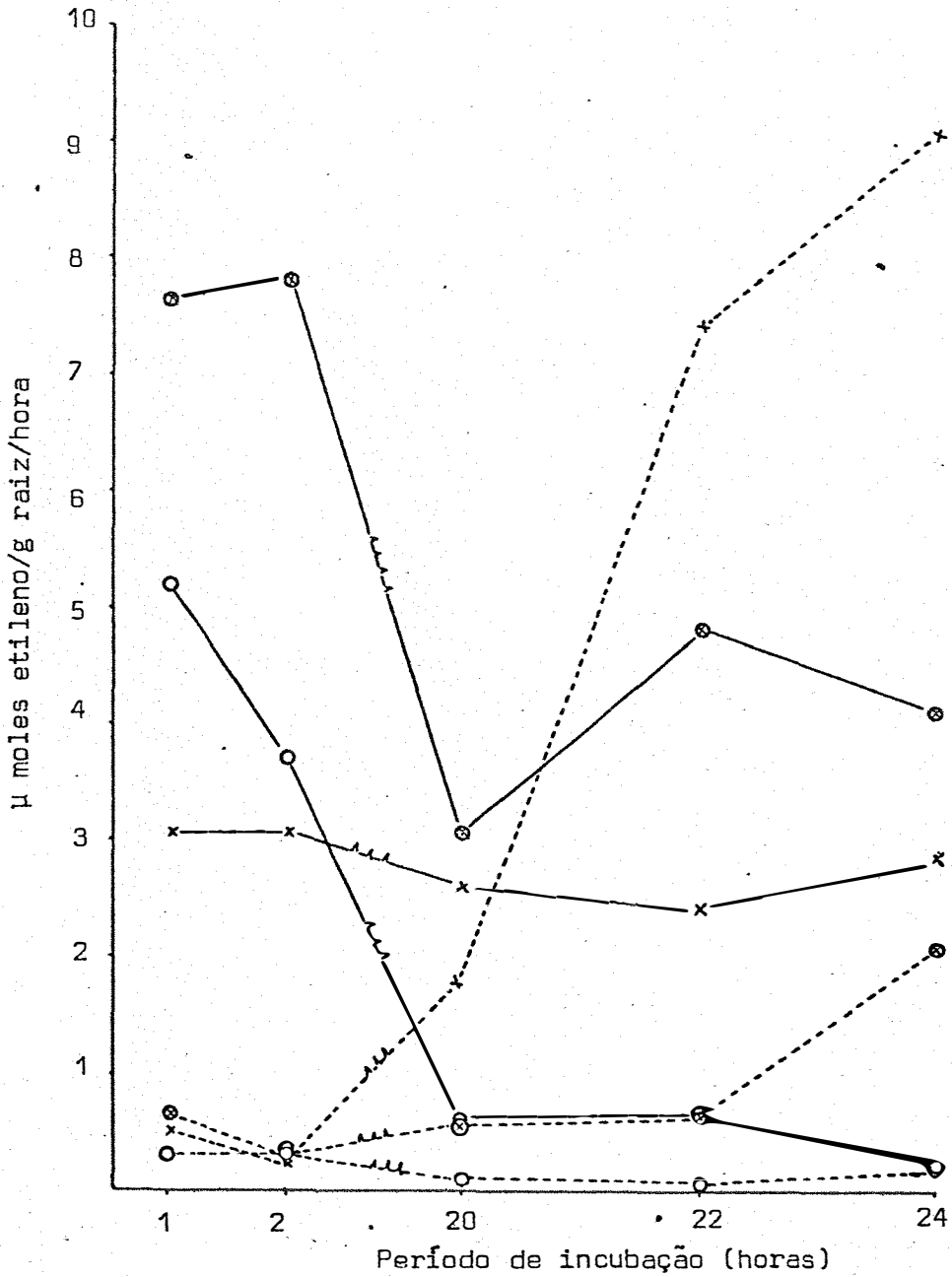
- o — o sistema intacto, planta inteira
- ⊗ — idem + glicose 1%
- x — idem + glicose 5%
- o - - - o sistema perturbado, planta inteira
- ⊗ - - - idem + glicose 1%
- x - - - x idem + glicose 5%

Fig. 6. Efeito de duas concentrações de glicose na taxa de evolução do etileno em sistema intacto e perturbado.



- o — o raiz sistema intacto
- ▣ — ▣ raiz sistema intacto + glicose 1%
- x — x raiz sistema intacto + glicose 5%
- o - - - o raiz sistema perturbado
- ▣ - - - ▣ raiz sistema perturbado + glicose 1%
- x - - - x raiz sistema perturbado + glicose 5%

Fig. 7. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrogenase em plantas inteiras em sistema intacto e perturbado.



- o — o raiz sistema intacto
 □ — □ raiz sistema intacto + glicose 1%
 x — x raiz sistema intacto + glicose 5%
 o - - - o raiz sistema perturbado
 □ - - - □ raiz sistema perturbado + glicose 1%
 x - - - x raiz sistema perturbado + glicose 5%

Fig. 8. Efeito de duas concentrações de glicose na taxa de redução de acetileno (atividade da nitrogenase) em plantas inteiras, em sistema intacto e perturbado.

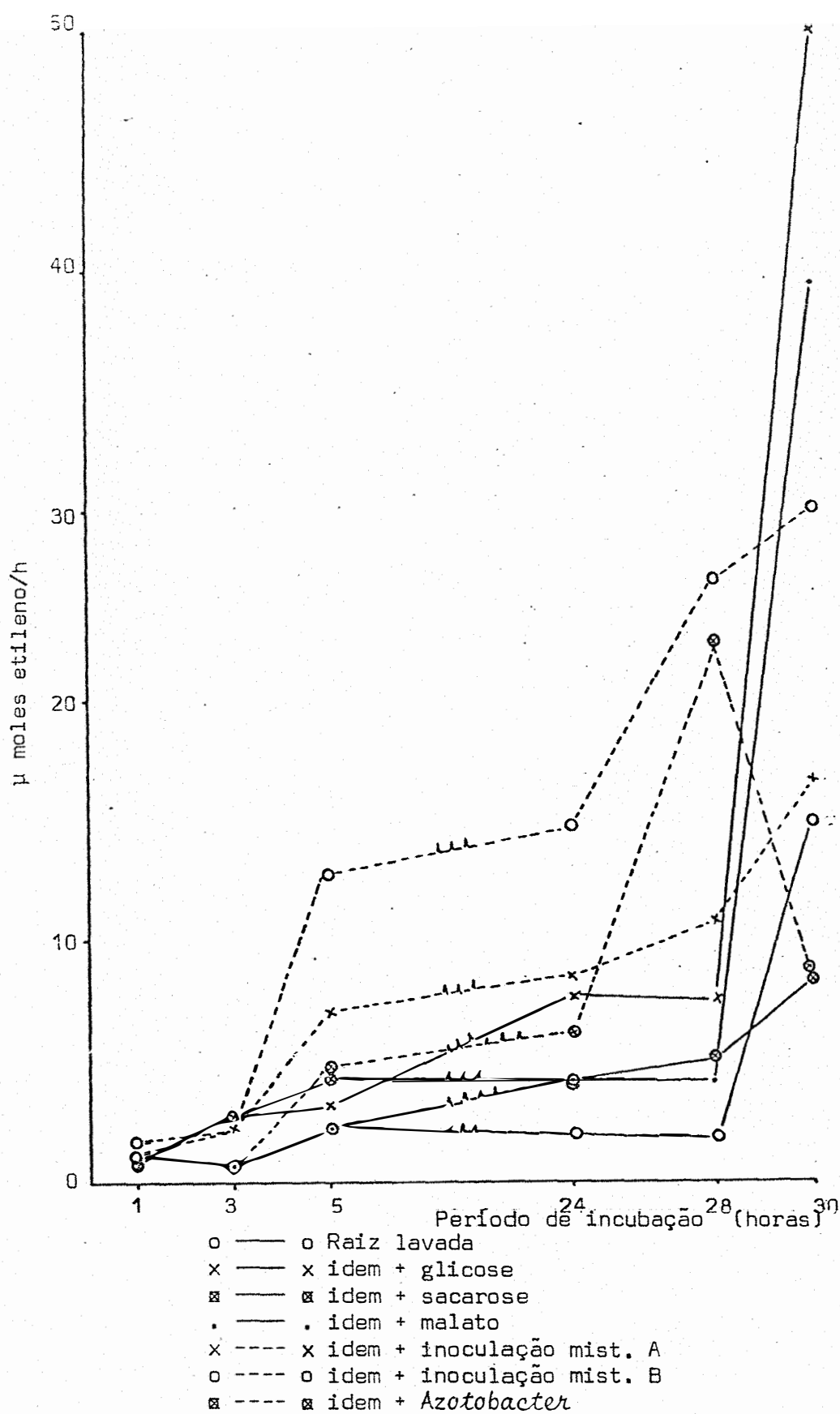
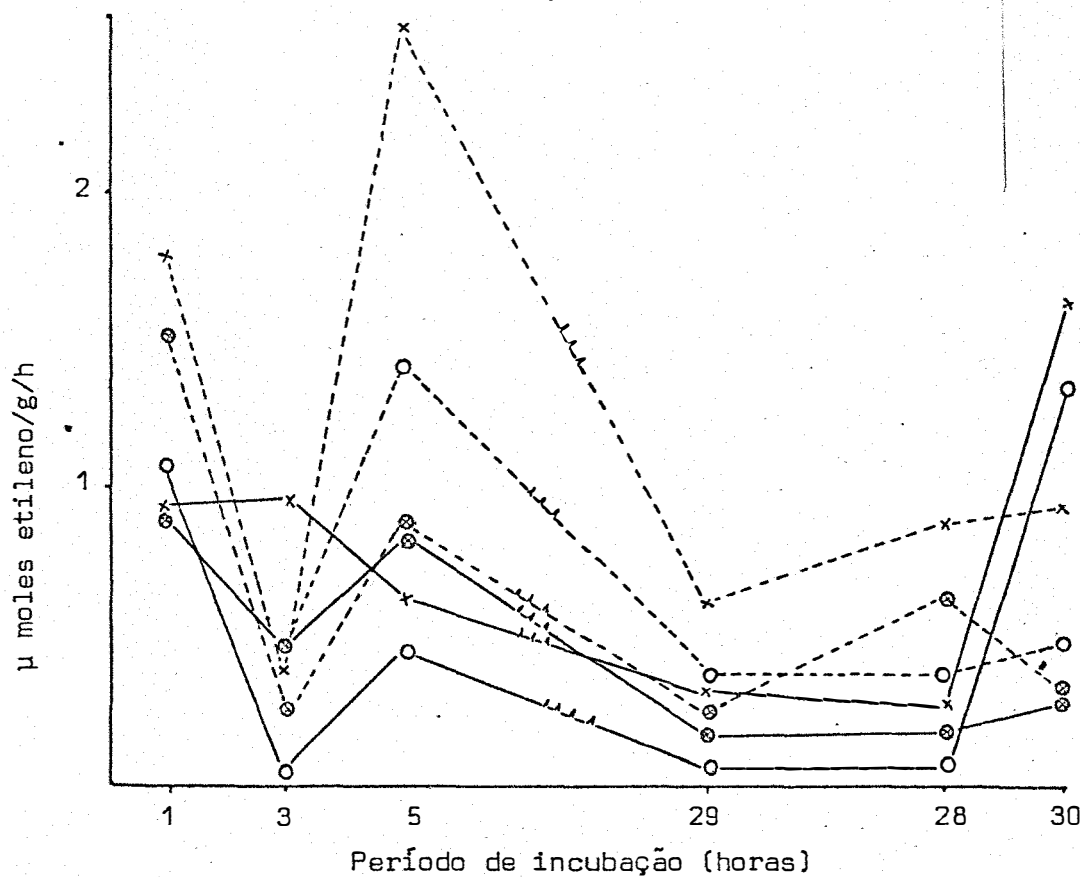
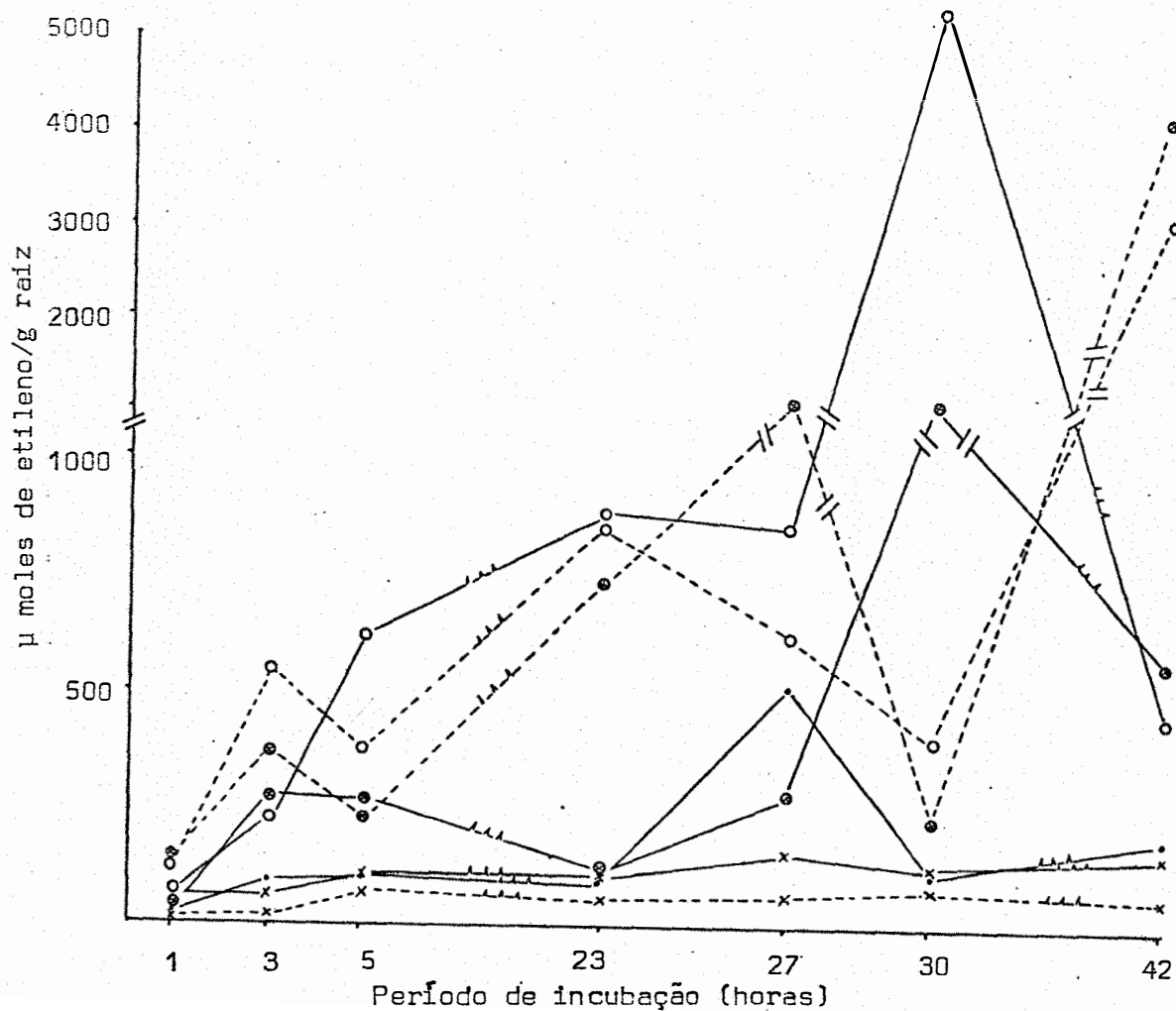


Fig. 9. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação de raízes destacadas de cana-de-açúcar na atividade da nitrogenase.



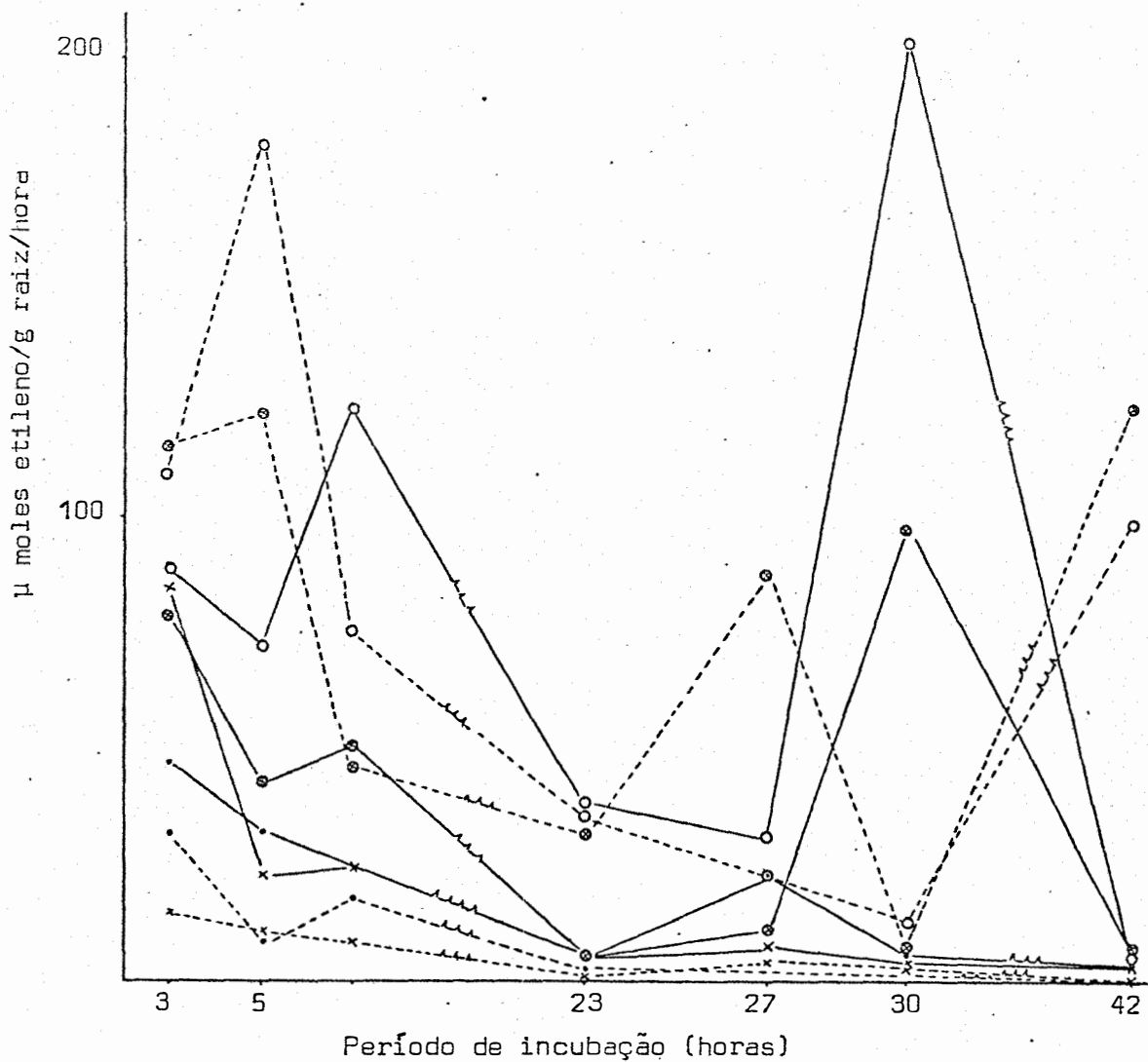
- o — Raiz lavada e ou + malato
- x — Raiz lavada + glicose
- ⊠ — Raiz lavada + sacarose
- o - - - Raiz lavada + inoculação mist. A
- x - - - Raiz lavada + inoculação mist. B
- ⊠ - - - Raiz lavada + *Azotobacter*

Fig. 10. Efeito de fontes energéticas e da inoculação de raízes destacadas de cana-de-açúcar na taxa de redução do acetileno (atividade da nitrogenase).



- o — o planta inteira, sistema intacto
 ◻ — ◻ idem + CO₂
 x — x raiz intacto
 • — • idem + CO₂
 o - - - o planta inteira, sistema perturbado
 ◻ - - - ◻ planta inteira, sistema perturbado + CO₂
 x - - - x raiz pert. c/ e s/ CO₂.

Fig. 11. Efeito de atmosfera enriquecida de CO₂ na atividade da nitrogenase em raízes e planta inteira de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.



- o — o planta inteira, sistema intacto
- ⊗ — ⊗ Idem + CO₂
- x — x raiz, sistema intacto
- . — . Idem + CO₂
- o - - - o planta inteira, sistema perturbado
- ⊗ - - - ⊗ Idem + CO₂
- x - - - x raiz, sistema perturbado
- . - - - . raiz, sistema perturbado + CO₂

Fig. 12. Efeito de enriquecimento de CO₂ na taxa de redução de acetileno (atividade da nitrogenase), em raízes e planta inteira de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado.

QUADRO 1. Atividade da nitrogenase expressa em n moles/g de raiz de diferentes variedades de cana-de-açúcar, em sistema perturbado e intacto.

Variedades	n moles de etileno/g de raiz									
	Sistema Perturbado									
	Período de incubação em acetileno (horas)									
	1	2	3	4	19	20	22	24	26	27
CB 40-72	43	-	250	136	150	-	150	-	-	13
	39	105	98	42	94	-	88	-	-	35
CB 41-76	58	61	109	46	58	-	24	-	-	82
	180	227	226	110	94	-	63	-	-	212
NA 56-72	66	64	88	14	57	-	59	-	-	59
	19	53	43	11	19	-	36	-	-	34
IAC 50-147	1090	-	-	2180	-	-	9940	-	17490	-
CB 50-122	490	-	-	180	-	-	4690	-	14090	-
L 64-43	350	590	-	-	-	3940	4040	4240	-	-
IAC 52-147	-	210	-	-	-	720	2130	-	-	-
Sistema Intacto										
L 63-43	2320	-	-	5980	-	-	25260	-	37800	-
	1240	-	-	3180	-	-	34890	-	13040	-
IAC 52-147	2900	-	-	6750	-	-	2637	-	33560	-
	4210	-	-	9590	-	-	64170	-	79750	-
CB 48	8360	-	-	26340	-	-	125850	-	14870	-

QUADRO-2. Efeito da glicose na atividade da nitrogenase expressa em μ moles de etileno/g de raiz em planta inteira e raiz da variedade PR 1117, em sistema intacto e perturbado. (Exp. 2)

		μ moles etileno evoluído/g de raiz						
		Período de incubação em acetileno em horas						
		1h	5h	10h	22h	26h	30h	48h
S.intacto pl.inteira		206,2	214,8	737,4	1277,2	2276,2	537,0	1858,1
		83,8	150,2	342,2	342,2	914,9	300,2	638,6
	M	145,0	182,5	534,8	809,7	1595,5	418,6	1248,3
Idem + glicose 1%		107,4	159,4	-	287,0	784,0	2008,6	1756,0
		221,8	31,3	638,6	1299,6	837,8	4196,4	3022,8
	M	164,6	95,3	638,6	793,4	810,1	3101,5	2389,4
S.perturba do, raiz		21,1	5,3	40,8	371,1	368,4	1031,5	1186,8
		6,6	13,3	33,3	353,3	541,6	993,3	3501,6
	M	13,8	9,3	18,7	362,2	455,0	1012,4	2344,2
Idem + glicose 1%		7,0	-	14,0	35,0	178,9	210,5	131,5
		-	-	-	93,9	-	61,4	63,5
	M	7,0	-	14,0	64,4	178,9	135,9	97,5

M = Média

QUADRO 3. Efeito da glicose na taxa da atividade da nitrogenase/hora expressa em μ moles de etileno/g raiz em planta inteira e raiz da variedade PR 1117, em sistemas intacto e perturbado. (Exp. 2)

		μ moles de etileno evoluído/g raiz/hora.						
		Período de incubação em horas.						
		1h	5h	10h	22h	26h	30h	48h
S.intacto pl. inteira		206,2	42,9	73,7	58,1	87,5	17,9	38,7
		83,8	30,1	34,2	15,6	35,2	10,0	13,3
	M	145,0	36,5	53,9	36,8	61,3	13,9	26,0
Idem + glicose 1%		107,4	31,9	-	13,4	30,2	66,9	36,5
		221,8	6,3	63,9	59,1	32,2	139,9	62,9
	M	164,6	19,1	63,9	36,2	31,2	103,4	49,7
S.perturba do, raiz		21,1	1,0	4,1	16,9	14,2	34,4	24,7
		6,6	2,7	3,3	16,5	20,8	33,1	72,9
	M	13,8	1,8	3,6	16,7	17,5	33,8	48,8
Idem + glicose 1%		7,0	-	1,4	1,6	6,9	7,0	1,3
		-	-	-	4,3	-	2,0	0,7
	M	7,0	-	1,4	2,4	6,9	4,5	1,0

M = média

QUADRO 4. Efeito de teores de glicose na atividade da nitrogenase, expressa em μ mol etileno/g/raiz, em plantas inteiras em sistema intacto e perturbado. (Exp. 3)

		peso raiz (g)	μ mol/g raiz			
			Período de incubação em acetileno (horas)			
			1h	4h	20h	26h
Sist. intacto + pl. inteira	L 64-43	2,84	1,86	4,78	20,21	30,24
	L 64-43	2,24	0,99	2,54	27,43	10,43
	M		1,43	3,66	23,82	20,33
Idem + glicose 1%	L 64-143	1,92	8,26	23,69	68,32	83,53
	IAC 52-147	1,92	2,32	5,40	21,09	26,85
	M		5,29	14,55	44,70	55,19
Idem + glicose 5%	CB 48	1,72	3,37	7,67	51,33	63,78
	CB 48	1,60	6,68	21,07	100,68	118,97
	M		5,03	14,37	76,00	91,37
S. perturbado + pl. inteira	CB 50-122	2,23	0,49	1,30	4,69	14,09
	IAC 50-147	2,04	1,09	2,18	9,94	11,47
	M		0,79	1,74	7,32	12,78
Idem + glicose 1%	CB 48	1,33	2,01	5,53	3,18	37,39
	CB 50-22	1,72	1,05	2,07	13,35	18,93
	M		1,53	3,80	8,27	28,16
Idem + glicose 5%	CB 48	2,49	0,45	2,68	13,87	17,81
	CB 50-12	1,50	1,04	4,93	36,66	57,25
	M		0,75	3,81	25,27	37,53

M = média

QUADRO 5. Efeito de dois teores de glicose na taxa da atividade da nitrogenase expressa em μ moles/g raiz /hora em plantas inteiras, em sistema intacto e perturbado. (Exp. 3)

		μ moles/g raiz/hora					
		variedade		horas de incubação		em acetileno	
				1h	4h	20h	26h
Sist. intacto + pl. inteira	L 64-43			1,86	1,95	1,01	1,51
	L 64-43			0,99	0,64	1,37	0,52
		M		1,42	1,30	1,19	1,02
Idem + glicose 1%	L 64-43			8,26	5,92	3,41	4,17
	IAC 52-147			2,32	1,35	1,06	1,34
		M		5,29	3,64	2,24	2,76
Idem + glicose 5%	CB 48			3,37	1,92	2,56	3,19
	CB 48			6,68	5,26	5,03	5,94
		M		5,03	3,59	3,80	4,57
Sist. perturbado + pl. inteira	CB 50-122			0,49	0,33	0,23	0,70
	IAC 50-147			1,09	0,55	0,49	0,57
		M		0,79	0,44	0,36	0,64
Idem + glicose 1%	CB 48			2,01	1,38	0,16	1,87
	CB 50-22			1,05	0,52	0,66	0,94
		M		1,53	0,95	0,41	1,41
Idem + glicose 5%	CB 48			0,45	0,67	0,69	0,89
	CB 50-122			1,04	1,23	1,83	2,86
		M		0,75	0,95	1,26	1,88

M = média

QUADRO 6. Efeito de duas concentrações de glicose na atividade da nitrógenase de raízes de cana-de-açúcar em sistema intacto e perturbado.

	peso raiz (g)	μ moles etileno/g de raiz				
		horas de incubação				
		1h	2h	20h	22h	24h
Raiz sistema intacto	2,25	1,86	3,09	11,48	13,87	14,50
	1,34	8,66	11,78	13,97	15,85	8,25
	M	5,26	7,43	12,72	14,86	11,38
Idem + glicose 1%	2,66	4,03	8,43	29,66	30,08	35,20
	1,10	11,35	23,19	94,55	183,42	170,40
	M	7,79	15,77	62,11	106,75	102,80
Idem + glicose 5%	1,60	4,85	10,24	83,28	84,18	109,16
	1,44	1,24	2,47	22,17	23,16	25,77
	M	3,05	6,36	52,73	53,67	67,47
Raiz sistema perturbado	2,26	0,35	0,59	3,94	4,04	4,24
	1,57	-	0,21	0,73	2,13	-
	M	0,35	0,40	2,33	3,08	4,24
Raiz + glicose 1%	1,55	0,99	1,01	6,18	4,48	55,10
	1,66	0,34	0,87	18,13	24,04	47,69
	M	0,66	0,94	12,15	14,25	51,39
Raiz + glicose 5%	1,57	0,78	2,76	16,74	272,00	375,41
	3,10	0,25	0,47	52,87	56,03	67,54
	M	0,51	1,36	34,80	164,01	221,47

M = média

QUADRO 7. Taxa de atividade da nitrogenase, evidenciando o efeito de duas concentrações de glicose em raízes de cana-de-açúcar, em sistema intacto e perturbado. (Exp. 4)

		μ moles etileno/g/hora				
		horas de incubação				
		1h	2h	20h	22h	24h
Raiz no sistema intacto	L 64-48	1,86	1,54	0,57	0,63	0,60
	CB 50-2	8,66	5,89	0,70	0,72	0,34
	M	5,26	3,72	0,64	0,68	0,47
Idem + glicose 1%	L 64-43	4,03	4,17	1,48	1,36	1,46
	CB 50-22	11,35	11,59	4,73	8,34	7,10
	M	7,69	7,88	3,11	4,85	4,28
Idem + glicose 5%	CB 48	4,85	5,12	4,16	3,82	4,55
	IAC 52-147	1,24	1,23	1,11	1,05	1,07
	M	3,05	3,17	2,64	2,44	2,81
Raiz	L 64-43	0,35	0,30	0,20	0,11	0,17
	IAC 52-147	-	-	0,03	0,10	-
	M	0,35	0,30	0,11	0,10	0,17
Raiz + glicose 1%	L 64-43	0,99	0,45	0,28	0,20	2,29
	IAC 52-147	0,34	0,17	0,84	1,09	1,98
	M	0,66	0,31	0,56	0,64	2,13
Raiz + glicose 5%	CB 48	0,78	0,39	0,83	12,36	15,64
	IAC 52-147	0,25	0,12	2,64	2,54	2,81
	M	0,51	0,25	1,73	7,54	9,22

M = média

QUADRO 8. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação na atividade da nitrogenase (n moles etileno/g) em raízes de cana-de - açúcar coletadas no campo. (Exp. 5)

		n moles/g raiz					
		Período de inoculação em acetileno - horas					
	raiz peso (g)	1h	3h	5h	24h	28h	30h
Raiz lavada	0,47	1,11	1,11	1,83	2,19	2,55	1,40
	0,41	1,27	0,83	1,27	2,10	0,83	42,74
	0,63	0,83	0,22	2,96	1,63	2,46	1,75
	M	1,07	0,72	2,02	1,97	1,95	15,29
Raiz + glicose	0,27	0,63	3,81	3,81	14,67	12,74	146,00
	0,41	1,27	2,51	3,37	4,20	7,98	5,88
	0,71	0,94	2,42	2,42	4,61	1,70	4,01
	M	0,95	2,91	3,20	7,83	7,47	51,96
Raiz + sacarose	0,40	0,85	0,43	3,03	3,00	1,43	4,10
	0,35	0,97	3,43	4,43	3,43	8,34	9,40
	0,37	0,92	0,46	5,14	6,05	5,57	10,65
	M	0,91	1,44	4,20	4,16	5,11	8,05
Raiz + malato	0,47	1,47	0,72	1,47	3,30	2,91	104,38
	0,53	0,98	0,32	3,25	6,17	6,81	8,26
	0,46	0,74	1,13	2,24	3,00	3,37	5,24
	M	1,06	0,72	2,23	4,16	4,36	39,29
Raiz + inocul. mistura bact. A	0,46	0,74	1,50	3,28	7,11	6,35	13,32
	0,31	1,68	1,74	12,19	12,77	17,19	21,90
	0,35	0,48	0,97	5,88	5,88	9,34	9,40
	M	0,97	1,40	7,12	8,59	10,96	14,87
Raiz + inocul. mistura bact. B	0,50	0,68	1,08	11,00	15,48	26,48	27,60
	0,40	2,15	1,72	15,05	12,55	24,07	30,12
	0,48	2,52	0,71	12,10	16,12	24,71	27,37
	M	1,78	1,17	12,72	14,72	25,09	28,36
Raiz + inocul.+ Azotobac.	0,58	1,48	0,59	5,64	7,71	48,03	12,84
	0,70	1,96	0,48	4,91	7,37	10,07	10,01
	0,65	1,06	1,06	2,65	3,17	4,51	6,74
	M	1,50	0,71	4,40	6,07	20,87	8,87

QUADRO 9. Efeitos de fontes energéticas e da inoculação na taxa de fixação de nitrogênio pela nitrogenase expressa em n moles etileno/g raiz/hora em raízes destacadas. (Exp. 5)

	n moles/g raiz/hora					
	Período de incubação em acetileno (horas)					
	1h	3h	5h	24h	28h	30h
Raiz lavada	1,11	0,37	0,37	0,09	0,09	0,05
	1,27	0,28	0,25	0,09	0,03	1,42
	0,83	0,07	0,59	0,07	0,09	0,06
	M 1,07	0,24	0,48	0,08	0,07	0,53
Raiz lavada + glicose	0,63	1,27	0,76	0,61	0,45	4,87
	1,27	0,84	0,67	0,17	0,29	0,20
	0,94	0,81	0,48	0,19	0,06	0,13
	M 0,95	0,97	0,64	0,32	0,27	1,73
Raiz lavada + sacarose	0,85	0,14	0,61	0,12	0,05	0,14
	0,97	1,14	0,87	0,14	0,30	0,31
	0,92	0,15	1,03	0,25	0,20	0,35
	M 0,91	0,48	0,84	0,17	0,18	0,27
Raiz lavada + malato	1,47	0,24	0,29	0,14	0,10	3,48
	0,98	0,11	0,65	0,26	0,24	0,27
	0,74	0,38	0,45	0,12	0,12	0,17
	M 1,06	0,24	0,46	0,17	0,15	1,31
Raiz + inoculação + mistura bact. A	0,74	0,50	0,66	0,30	0,23	0,44
	1,68	0,58	2,44	0,53	0,61	0,73
	0,48	0,32	1,18	0,24	0,33	0,31
	M 0,97	0,47	1,43	0,36	0,39	0,49
Raiz + inoculação + mistura bact. B	0,68	0,36	2,20	0,64	0,94	0,92
	2,15	0,57	3,01	0,52	0,86	1,00
	2,52	0,24	2,42	0,67	0,88	0,91
	M 1,78	0,39	2,54	0,61	0,89	0,94
Raiz + Azotobacter.	1,48	0,20	1,12	0,32	1,71	0,43
	1,96	0,16	0,98	0,31	0,38	0,33
	1,06	0,35	0,53	0,13	0,16	0,22
	M 1,50	0,25	0,88	0,25	0,75	0,33

QUADRO 10. Influência de atmosfera enriquecida com CO₂ na atividade da *ni* trogenase expressa em μ moles de etileno em cana-de-açúcar em sistema intacto e perturbado. (Exp. 6)

		μ moles de etileno								
		Período de incubação (horas)								
		1h	3h	5h	23h	27h	30h	42h		
sistema intacto	Pl. inteira		113,5	113,5	937,4	1063,0	1352,9	6764,8	205,4	
		M	65,2	326,1	304,4	720,0	326,1	5508,4	700,6	
	Idem + CO ₂		89,3	219,8	620,9	891,5	859,5	5886,6	453,0	
		M	96,6	224,5	101,4	205,3	236,8	183,6	589,5	
	Raiz		62,8	347,9	415,5	67,6	347,9	4107,2	546,0	
		M	79,7	286,2	278,4	136,4	242,3	2145,4	567,7	
	Raiz + CO ₂		58,0	48,3	125,6	125,6	166,7	130,5	77,3	
		M	113,6	91,8	125,6	128,0	169,1	159,4	231,9	
	Raiz + CO ₂		85,8	70,0	125,6	126,8	167,8	144,9	154,6	
		M	58,2	144,9	147,3	140,1	195,7	169,1	236,8	
	sistema perturbado	Pl. inteira		36,2	50,7	96,6	84,2	831,1	108,7	147,4
			M	47,2	97,8	121,9	112,1	513,4	138,9	192,1
Idem + CO ₂			66,4	537,5	480,2	966,4	489,2	489,3	1050,9	
		M	154,0	555,7	283,8	749,0	718,8	314,1	7380,9	
Raiz			110,2	546,6	382,0	857,7	604,0	401,7	4215,9	
		M	181,2	634,3	286,9	1026,8	2440,2	163,1	8697,6	
Raiz + CO ₂			51,3	81,5	187,2	446,9	2343,5	308,0	1836,2	
		M	116,2	357,9	237,0	736,8	2391,8	235,5	5266,9	
Raiz			9,6	46,3	49,8	22,6	37,7	74,0	42,2	
		M	19,6	24,1	83,5	57,4	214,4	78,5	17,2	
Raiz + CO ₂			14,6	35,2	66,6	40,0	126,0	76,2	29,7	
		M	40,7	27,8	74,0	61,9	75,5	81,5	111,7	
Raiz + CO ₂		24,2	24,2	111,7	86,7	89,9	110,2	151,0		
	M	32,4	26,0	92,8	74,3	82,7	95,8	81,3		

QUADRO 11. Influência de atmosfera enriquecida de CO_2 na taxa da atividade de nitrogenase (μ moles etileno/hora) em cana-de-açúcar em sistema intacto e perturbado. (Exp. 6)

		μ moles etileno/h							
		Período de incubação (horas)							
		1h	3h	5h	23h	27h	30h	42h	
sistema intacto	Pl. Inteira		113,5	37,8	187,5	46,2	50,1	225,5	4,8
			65,2	108,7	60,8	31,3	12,1	183,6	16,7
	M		89,3	73,2	124,1	38,7	31,1	204,5	10,7
			96,6	74,9	20,3	8,9	8,8	6,1	14,0
	Idem + CO_2		68,2	12,0	83,2	3,0	12,9	136,9	13,0
		M	79,7	43,4	51,7	5,9	10,8	98,9	13,5
	Raiz		58,0	16,0	25,1	6,1	7,2	4,3	1,8
			113,6	30,6	25,1	5,6	7,4	5,3	5,5
	M		85,8	23,3	25,1	5,8	7,3	4,8	3,6
			58,2	48,3	29,4	6,1	8,5	5,6	5,6
	Raiz + CO_2		36,2	16,9	19,3	4,1	36,1	3,6	3,5
		M	47,2	32,6	24,3	5,1	22,3	4,6	4,5
sistema perturbado	Pl. Inteira		66,4	179,2	96,0	42,0	18,1	16,1	25,0
			154,0	185,2	56,8	32,6	26,6	10,4	175,4
	M		110,2	182,2	76,4	36,3	22,3	13,2	100,2
			181,2	214,4	57,4	44,6	90,4	5,4	207,1
	Idem + CO_2		51,3	27,2	37,5	19,4	86,8	10,2	43,7
		M	116,2	123,0	47,4	32,0	88,6	7,7	125,4
	Raiz		9,6	15,4	1,0	1,0	1,4	2,5	1,0
			19,6	8,1	16,7	2,5	8,0	2,6	0,4
	M		14,6	11,7	8,8	1,7	4,7	2,5	0,7
			40,7	9,3	14,8	2,7	2,8	2,7	2,6
	Raiz + CO_2		24,2	8,1	22,4	3,8	3,4	3,7	3,6
		M	32,4	8,7	18,6	3,1	3,1	3,2	3,1

QUADRO 12. Atividade da nitrogenase em raízes de cana-de-açúcar incubadas sob atmosfera de acetileno, avaliada colorimetricamente.

Tratamento	reação %		
	forte	fraca	sem reação
minicâmaras s/ raiz	-	-	100 %
minicâmaras c/raízes	17,7	35,5	46,8

QUADRO 13. Efeito da adição de meio de cultura com glicose e sem nitrogênio, em raízes de toletes de cana-de-açúcar, recém germinadas, na atividade da nitrogenase, avaliada colorimetricamente pelo etileno evoluído.

Tratamento	nº total raízes testadas	nº raízes c/ ativid. <u>nase</u>	%
Raiz lavada	65	7	10,7
Raiz lavada + meio de cultura, s/agar, s/N.	66	2	3,0

QUADRO 14. Efeito de substância energética adicionada em raízes de toletes inoculados de cana-de-açúcar, 27 dias após a germinação, na atividade da nitrogenase, avaliada por teste colorimétrico qualitativo pelo etileno evoluído.

Tratamentos	Reação Positiva		
	nº total raízes testadas	%	% em relação ao peso total raízes
Raízes lavadas	65	35	42,5
R.lavada + glicose 1%	66	20	29,5

QUADRO 15. Efeito de substâncias energéticas adicionadas a raízes de cana-de-açúcar coletadas no campo, na atividade da nitrogenase, avaliada qualitativa e colorimetricamente após incubação em acetileno.

Tratamentos	nº total raízes testadas	% de reação positiva	% em µl ao peso total das raízes
Raiz lavada (T)	26	7,6	6,8
T + glicose	30	50,0	53,3
T + sacarose	27	22,2	70,3
T + malato	30	53,3	70,3

QUADRO 16. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, em sistema perturbado, incubados 24 horas em câmara com baixo teor de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono.

	peso (g)	N%	N total (mg)	$\delta^{15}\text{N}^0/\text{oo}$	$^{15}\text{N}^0/\text{oo}$	$^{15}\text{N}^0/\text{oo}$	Excesso $\delta^{15}\text{N}^0/\text{oo}$	Excesso $^{15}\text{N}\%$ -0,365	N total fixado (μg)	N fixado/g raiz (μg)
	p. aérea	1,83	1,25	23,13		0,367		0,002	-	-
Planta inteira	raiz	1,36	0,91	12,38		0,391		0,026	3,42	2,51
	solo	10,00	0,62	62,00	18,13		8,13		1,93	0,91
	p. aérea	2,02	1,32	26,66		0,367		0,002	-	-
Planta inteira + glicose	raiz	1,36	1,17	15,91		0,476		0,111	18,78	13,80
	solo	10,00	0,58	58,00	190,69		180,69		40,13	4,13
	p. aérea	2,13	1,20	25,56		0,364		-	-	-
P. aérea septa da raiz	raiz	1,43	1,17	13,73		0,409		0,044	7,83	5,47

$p\text{N}_2$ 0,84; $p\text{O}_2$ 0,02; $p\text{Ar}$ 0,11; $p\text{CO}_2$ 0,03

Enriquecimento ^{15}N = 94%

Erro padrão ^{15}N , análise coletor simples \pm 0,002

QUADRO 17. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubadas 24 horas em câmara com tensão de oxigênio baixo e dióxido de carbono alto, em temperatura de 28° a 32°C (médias de duas repetições/amostra)

	peso (g)	N%	N total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ ‰	$\delta^{15}\text{N}$ ‰ em excesso	N fixado (μg)	N fixado/g raiz (μg)
Pl. testemunha	p. aérea	1,53	1,46	22,34	0,371	-	-
	raiz	2,13	1,06	22,58	0,367	-	-
Pl. incubada $^{15}\text{N}_2$ (A)	p. aérea	4,40	1,56	68,64	0,367	-	-
	raiz	3,51	1,21	42,47	0,402	17,48	4,98
Idem A	p. aérea	2,03	1,32	26,80	0,371	-	-
	raiz	1,45	1,37	19,87	0,392	5,84	4,03
Pl. incubada $^{15}\text{N}_2$ (B)	p. aérea	1,46	1,76	25,99	0,371	-	-
	raiz	1,48	1,63	15,24	0,369	0,002	-
Idem B, c/ p. aérea septada da raiz	p. aérea	1,68	1,37	23,02	0,363	-	-
	raiz	1,38	1,26	17,39	0,416	10,02	7,26

p N₂ 0,62; p O₂ 0,30; p Ar 0,33; p CO₂ 0,002
 Enriquecimento ^{15}N , 85%
 Erro padrão, análise coletor simples \pm 0,002

QUADRO 18. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados durante 24 horas em câmara com teor médio de oxigênio e alto teor de dióxido de carbono, em temperatura de 28 a 32°C (médias de duas repetições/amostra).

Tratamentos	peso (g)	N%	N total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ ‰	Excesso $\delta^{15}\text{N}$ ‰	N fixado (μg)	^{15}N fixado/g raiz (μg)
Pl. testemunha	p. aérea	1,50	1,38	20,70	6,11	-	-
	raiz	3,00	0,88	26,40	5,21	-	-
Pl. incubada $^{15}\text{N}_2$ (A)	p. aérea	2,00	1,27	25,40	8,39	2,28	0,24
	raiz	5,44	0,75	40,80	8,83	3,62	0,63
Idem (A)	p. aérea	1,73	1,30	22,49	4,98	-	-
	raiz	4,60	1,05	48,30	5,74	0,53	0,11
Pl. incubada $^{15}\text{N}_2$ (B)	p. aérea	2,65	1,40	37,10	5,60	-	-
	raiz	1,88	1,08	20,30	8,07	2,86	0,25
Idem B, c/ folha septada da raiz	p. aérea	2,40	1,33	31,92	5,69	-	-
	raiz	1,89	1,01	19,09	11,61	6,40	0,52

p N₂ 0,55; p O₂ 0,08; p Ar 0,31; p CO₂ 0,07

Enriquecimento $^{15}\text{N}_2$ = 85%

Erro padrão ^{15}N $\delta < \pm 0,5$ ‰

QUADRO 19. Fixação de nitrogênio em "seedlings" de cana-de-açúcar, incubados durante 6 dias em câmara com condições normais simuladas, em temperatura de 28 a 32°C (média de duas repetições/amostra).

Tratamentos	parte aérea	raiz	peso (g)	N%	N total (mg)	$\delta^{15}\text{N}$ ‰	Excesso $\delta^{15}\text{N}$ ‰	^{15}N fixado (μg)	^{15}N fixado/g de raiz (μg)
Planta testemunha	parte aérea		1,50	1,38	20,70	6,11	0	-	-
	raiz		3,00	0,88	26,40	5,21	0	-	-
Planta incubada em câmara c/ $^{15}\text{N}_2$ (A)	parte aérea		1,94	1,31	25,41	17,99	11,88	1,34	0,69
	raiz		4,55	1,00	45,50	15,42	10,21	2,06	0,45
Idem (B)	parte aérea		1,43	1,49	31,30	16,67	20,77	2,90	2,03
	raiz		3,40	0,88	29,90	26,82	21,61	2,87	0,87

p N₂ 0,54; p O₂ 0,17; p Ar 0,29

Enriquecimento ^{15}N = 81%

Erro padrão ^{15}N $\delta < \pm 0,5$ ‰