

ANTONIA GARCIA TORRES VOLPON

FISIOLOGIA DO CRESCIMENTO DE *Azospirillum lipoferum*

T E S E

Apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação da
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro para o
Grau de "*Magister Scientiae*"

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

RIO DE JANEIRO

1979

FISIOLOGIA DO CRESCIMENTO DE *Azospirillum lipoferum*

TESE

Apresentada ao Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação
da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
para o Grau de "Magister Scientiae".

ANTONIA GARCIA TORRES VOLPON

SETEMBRO DE 1979

ORIENTADOR:

JOHANNA DÖBEREINER

EXAMINADORES:

JOHANNA DÖBEREINER

ADAM DROZDOWICZ

MARIA CRISTRINA PRATA NEVES

BIOGRAFIA DO AUTOR

ANTONIA GARCIA TORRES VOLPON, natural de Caniles, Estado de Granada-Espanha, naturalizada brasileira, nascida a 18 de maio de 1951.

Diplomou-se em 1973 em Licenciatura em ciências e em 1976 em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Estado de São Paulo.

Professora de Ciências Físicas e Biológicas do Colégio Diocesano de São Carlos, SP em 1976.

Atualmente exerce a função de pesquisadora do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, desenvolvendo trabalhos na área de Microbiologia dos Solos.

AGRADECIMENTOS

Expresso meus sinceros agradecimentos:

A CAPES pelo apoio financeiro.

A Dra. Johanna Döbereiner pela orientação e incentivo proporcionados no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Helvécio De-Polli pelas valiosas colaborações prestadas no decorrer do trabalho.

Ao Departamento de Solos da Universidade Rural do Rio de Janeiro.

Ao pessoal da seção dos solos - Programa Fixação do Nitrogênio - EMBRAPA (Km 47); RJ pelos inestimáveis auxílios prestados.

A todos aqueles que colaboraram para tornar este trabalho possível.

Ao meu esposo Ismar

Aos meus pais.

ÍNDICE GERAL

	pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Taxonomia	3
2.2. Ecologia	5
2.2.1. Efeito do pH	6
2.2.2. Efeito da Temperatura	6
2.3. Fisiologia de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio	7
2.3.1. Oxigênio	7
2.3.1.1. Efeito do O ₂ no crescimento e na nitrogenase	7
2.3.1.2. Desenvolvimento de Mecanismos Prote- tores da Nitrogenase contra o O ₂ .	8
2.3.2. Metabolismo do Carbono	9
2.3.3. Metabolismo do Nitrogênio	10

2.3.3.1. Crescimento em Diferentes Fontes de Nitrogênio	10
2.3.3.2. Eficiência da Fixação de Nitrogênio	11
2.3.4. Hidrogenase e Evolução de H ₂	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Materiais	14
3.1.1. Condições de Crescimento	15
3.1.2. Organismo e Inóculo	15
3.1.3. Crescimento em Cultura "batch"	16
3.1.3.1. Equipamento	16
3.1.3.2. Instrumentação e Controle do Oxigênio	16
3.2. Métodos	18
3.2.1. Determinações Analíticas	18
3.2.1.1. Turbidez	19
3.2.1.2. Glucose no meio de cultura	19
3.2.1.3. Proteína	20
3.2.1.4. Peso Seco.....	20
3.2.1.5. Nitrogênio Total	21
3.2.1.5.1. N-Total na Bactéria ...	21
3.2.1.5.2. N-Total no Sobrenadante	21
3.2.1.6. Amônia	21
3.2.1.7. Nitrato	21
3.2.1.8. Redução de Acetileno e Consumo de O ₂	22
3.2.1.9. Evolução de H ₂	22
3.2.2. Atividade Hidrogenase	23

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
4.1. Crescimento em Meio de Cultura sem Nitrogênio	24
4.2. Fixação e Excreção de Nitrogênio	25
4.3. Eficiência da Fixação de Nitrogênio	29
4.4. Efeito do O_2 na Redução do Acetileno	34
4.5. Consumo de O_2 pelas Células.....	37
4.6. Correlação entre Hidrogenase, Nitrogenase, Consumo e Tolerância ao O_2	39
5. CONCLUSÕES	41
6. RESUMO	43
7. SUMMARY	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

ÍNDICE DAS FIGURAS

FIGURA 1 - Equipamento e instrumentação para o controle de oxigênio utilizados no crescimento das bactérias em cultura "batch".....	17
FIGURA 2 - Curva de Crescimento e N-total acumulado em cultura "batch" com <i>Azospirillum lipoferum</i>	25
FIGURA 3 - Peso seco e N-total acumulado em relação à glucose consumida durante o período de incubação da cultura de <i>Azospirillum lipoferum</i>	27
FIGURA 4 - Nitrogênio fixado pela bactéria e nitrogênio excretado ao meio em cultura "batch" de <i>Azospirillum</i>	28

FIGURA 5 - Efeito da concentração da glucose na eficiência da fixação do nitrogênio	30
FIGURA 6 - Mudanças fisiológicas durante as fases logarítmica e estacionária em cultura "batch" de <i>Azospirillum lipoferum</i>	32
FIGURA 7 - Efeito do oxigênio na atividade da nitrogenase (redução do acetileno) de células do <i>Azospirillum lipoferum</i> em diferentes estágios de crescimento	35

ÍNDICE DA TABELA

TABELA 1 - Comparação entre N-total fixado e redução de acetileno na relação teórica 3 C ₂ H ₂ : 1 N ₂	38
--	----

1. INTRODUÇÃO

A crise mundial de energia e os problemas de poluição ligados ao uso indiscriminado de adubos minerais nitrogenados despertaram interesse para os estudos sobre possibilidades de suprir a maior parte do nitrogênio necessário para a produção de proteínas vegetais e animais através da fixação biológica desse elemento. Esta utiliza produtos fotossintéticos das plantas baseando-se portanto no uso da energia solar ao invés de combustíveis fósseis que são reservas não renováveis.

Há muito tempo foi evidenciada a importância, da fixação de N_2 pelas leguminosas de grão e forrageiras mas só recentemente surgiu interesse nas associações de gramíneas com bactérias fixadoras de N_2 que podem, sob condições ainda não bem definidas, fixar quantidade de N_2 quase equivalentes às fixadas pelas leguminosas (Rinaudo et al., 1971; Balandreau Villemin, 1973; Döbereiner et al., 1973a, Döbereiner & Day, 1973b; Day et al., 1975; Bülow & Döbereiner, 1975). A atividade da nitrogenase associada com as raízes de gramíneas tropi-

cais tem sido atribuída à presença de *Azotobacter paspali* ou *Azospirillum*. *Azospirillum* spp são bactérias importantes devido ao fato de viverem em associação simbiótica com as raízes de diversas gramíneas de solos tropicais (Day & Döbereiner, 1976; Döbereiner & Day, 1976; Bülow & Döbereiner, 1975). Recentemente foi sugerida a denominação de Rhizocoenosis para essa associação (International Workshop on Associative N₂-Fixation 2-6 julho 1979 CENA, Piracicaba, S.P., Brasil). Essas gramíneas possuem a via fotossintética C₄ (Hatch & Slack, 1970) que é duas vezes mais eficiente e capaz de obter o dobro de produtos fotossintéticos com a metade da quantidade de água necessária para plantas de zonas temperadas. Fatores genéticos e fisiológicos influenciam no comportamento tanto das plantas como das bactérias envolvidas no processo de fixação do N₂. Diferenças genéticas de plantas favorecendo o número de bactérias e/ou a fixação de N₂ nas raízes das gramíneas foram demonstrados por Day et al. (1975); Bülow & Döbereiner, (1975). Foram realizados vários estudos sobre a fisiologia e bioquímica de *Azospirillum* spp (Okon et al., 1976 a, b, 1977a), porém não se tem ainda informações detalhadas sobre a natureza das associações gramínea-bactéria. Estudos comparativos têm sido realizados com sistemas mais perfeitos como a simbiose das leguminosas, líquens e hepáticas. Resultados interessantes foram recentemente apresentados por Stewart (1976) que, assemelha as simbioses das algas aos demais sistemas mas especialmente aos das gramíneas. As algas são capazes, como o *Azospirillum*, de crescer com nitrogênio fixado como única fonte de nitrogênio.

Este trabalho avalia a eficiência da fixação de nitrogênio em relação ao uso da fonte de carbono, atividade da hidrogenase, consumo e tolerância ao oxigênio durante vários estágios do crescimento do *Azospirillum lipoferum*, a fim de contribuir para melhor entendimento da fisiologia dessa bactéria e da interação com os cereais e gramíneas forrageiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. TAXONOMIA

Beijerinck (1922) descreveu pela primeira vez a bactéria fixadora de N_2 *Spirillum lipoferum* como *Azotobacter spirillum* isolada de solos de jardim na Holanda, mas foi incapaz de demonstrar a fixação de N_2 em cultura pura. Mais tarde denominou essa bactéria de *Spirillum lipoferum* (Beijerinck, 1925). Schröder (1932) também não conseguiu confirmar a fixação de N_2 por esse organismo em cultura pura e portanto a espécie foi retirada da lista das bactérias fixadoras de N_2 (Postgate, 1971a; Buchanan & Gibbons, 1974; Mulder & Brotonegoro, 1974). Becking (1963) verificou assimilação de $^{15}N_2$ em cultura pura na presença de extrato de levedura por uma espécie de "Vibrio ou *Spirillum*" isolada de solos africanos que descreveu como "provavelmente idêntico com o *S. lipoferum* de Beijerinck". Em meio com açúcar, deficiente em nitrogênio, as células continham grânulos de poli-

- β -hidroxibutirato. Estirpes de *S. lipoferum* isoladas por Beijerinck ou Becking não estão disponíveis. Döbereiner & Day (1974, 1976) verificaram que essa bactéria era responsável pela atividade da nitrogenase em raízes de *Digitaria decumbens* cv *transvala*. Desde então mais de 200 estirpes foram isoladas em todo o mundo de raízes de gramíneas forrageiras, leguminosas, cereais e solos coletados no Brasil, África e Ásia (Döbereiner et al., 1975; Kumari et al., 1976; Bülow & Döbereiner, 1975). Sua capacidade de fixar N_2 em cultura pura foi demonstrada em agar semi-sólido (Döbereiner & Day, 1975). Embora *S. lipoferum* tenha sido omitido da nova edição do Manual de Bergey (Buchanan & Gibbons, 1974 devido ao fato de nenhuma cultura estar disponível na época da escrita do manual, Krieg (1976) incluiu este organismo em uma revisão mais recente da família Spirillaceae.

Foram observados dois ou três grupos definidos entre as estirpes de *S. lipoferum* (Okon et al., 1976a, Sampaio et al., 1976; Tarrand & Krieg, 1977; Tyler et al., 1978; Krieg & Tarrand, 1978; Neyra & Döbereiner, 1977). A composição das bases de DNA é similar para várias estirpes de *S. lipoferum* (G+C = 70) mas através do exame da homologia do DNA, Tarrand & Krieg (1977), Krieg & Tarrand (1978) observaram que existem apenas dois grupos distintos com genomas similares e foi proposta a criação de um novo gênero com o nome de *Azospirillum* apresentando 2 espécies: *A. lipoferum* e *A. brasilense* (Tarrand et al., 1978). A denominação de *Azospirillum lipoferum* foi proposta para as estirpes do grupo II (Sampaio et al., 1978; Neyra et al., 1977) consideradas idênticas com *S. lipoferum* Beijerinck. Essas bactérias produzem ácido a partir de manitol, sorbitol ou ribose e utilizam a glucose como fonte de carbono para crescer em meio semi-sólido sem nitrogênio. Todas estas estirpes são auxotróficas à biotina e não crescem se esta vitamina não for acrescentada ao meio (Tarrand & Krieg, 1977; Krieg & Tarrand, 1978). Em meio de malato semi-sólido sem nitrogênio com 0,005% de extrato de levedura as células tornam-se mais largas (cerca 1,4-1,7) mm) e

mais longas (forma helical ou S) e não móveis (Tarrand et al., 1978).

A denominação de *Azospirillum brasilense* foi proposta para as estirpes dos grupos I e III (Sampaio et al., 1978) encontradas mais freqüentemente em habitats tropicais. Estas bactérias não necessitam de vitaminas para o seu crescimento. Em meio de malato sem nitrogênio semi-sólido com 0,005% de extrato de levedura, as células apresentam-se pequenas (aproximadamente 1 µm de diâmetro) vibróide e móveis; podendo ocorrer em culturas velhas células em forma de S (Tarrand et al., 1978).

Dentro de *A. brasilense* há dois grupos, um grupo possui uma nitrato redutase dissimilatória (nir^+) e outro que não possui (nir^-). Apenas o grupo nir^+ é capaz de denitrificar o nitrato a formas gasosas.

2.2. ECOLOGIA

Azospirillum ocorre em abundância nos solos de regiões tropicais, não tendo sido encontrado com tanta freqüência nas regiões temperadas (Döbereiner et al., 1976; Kumari et al., 1976); entretanto Schröder (1932), encontrou essa bactéria em todas as amostras de 76 solos coletados na Alemanha e Austria, concluindo que tinha ampla distribuição e não era indicador de solos férteis. Becking (1963) observou a ocorrência dessa bactéria regularmente em amostras coletadas para um estudo sobre *Beijerinckia* na África. Os solos de florestas tropicais ou cerrados possuem esta bactéria esporadicamente, enquanto em solos sob vegetação de gramíneas sua ocorrência é generalizada. Raízes de leguminosas possuem menos *Azospirillum* que os solos ao seu redor. Alto número (de 10^6 a 10^7 g⁻¹) é comumente encontrado em solos e raízes (Magalhães et al., 1979). Contagens revelam

maior número de *Azospirillum* na superfície das raízes que no seu interior (Burris et al., 1976). Essas bactérias mostraram especificidade quanto à planta hospedeira sendo que *A. lipoferum* foi predominantemente encontrado em raízes esterilizadas de milho e *A. brasilense* em raízes de trigo e arroz (Baldani & Döbereiner, 1979).

2.2.1. EFEITO DO pH

A incidência do *Azospirillum spp* nos solos depende do pH, sendo que o pH ótimo está ao redor de 7,0 (Döbereiner et al., 1976), mas ocorre esporadicamente em solos com pH 4,8. Raízes esterilizadas de *Panicum maximum* coletadas de solos com pH na faixa de 4,8-7,2 continham alto número dessa bactéria que não apresentou correlação com o pH do solo (Döbereiner, 1978). Essa necessidade de pH elevado é explicada devido ao fato dessas bactérias viverem no interior da cortex ou na rizosfera de certas gramíneas onde o pH é superior ao do solo (Döbereiner, 1978). Os requisitos de pH pela nitrogenase em culturas puras (Day & Döbereiner, 1976), e em extratos obtidos de células (Okon et al., 1977a) estão correlacionados com a atividade máxima da nitrogenase na faixa de pH 6,8-7,8; onde se verifica também ótimo crescimento.

2.2.2. EFEITO DA TEMPERATURA

Azospirillum necessita para o seu crescimento uma temperatura considerada alta; o valor ótimo encontrado foi de 34°C mostrando pouco crescimento abaixo de 28°C (Neves et al., 1976).

Entretanto, nenhuma estirpe isolada de regiões temperadas foi comparada com estirpes de regiões tropicais (Day & Döbereiner, 1976; Neves et al., 1976). Entre várias estirpes

estudadas observou-se rápido crescimento na faixa de 32-36°C com atividade da nitrogenase máxima entre 33-40°C e pronunciada queda abaixo de 33°C. Essa atividade foi completamente inibida a 45°C temperatura esta que foi letal para todas as estirpes (Neves et al., 1976). O efeito da temperatura tanto na atividade da nitrogenase de culturas puras como na atividade de raízes de milho crescidas no campo é bastante semelhante confirmando a hipótese dessas bactérias serem responsáveis pela fixação do nitrogênio que ocorre nas raízes dessas gramíneas (Neves et al., 1976). As necessidades de altas temperaturas por esses microrganismos tem grande importância ecológica visto que em regiões temperadas a temperatura do solo raramente atinge 28°C; entretanto, nas regiões tropicais, as temperaturas ótimas para a atividade da nitrogenase ocorrem diariamente durante o período de crescimento.

2.3. FISILOGIA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO.

2.3.1. OXIGÊNIO

2.3.1.1. EFEITO DO OXIGÊNIO NO CRESCIMENTO E NA NITROGENASE.

Apesar do oxigênio ser necessário para a respiração e fornecimento de ATP em todas as bactérias aeróbias, ele é prejudicial à enzima nitrogenase. Esta é extremamente sensível ao oxigênio pois inativa a proteína de ferro constituindo um problema para todas as bactérias fixadoras e cianobactérias de nitrogênio. As cianobactérias são obrigadas a conciliar a fixação de nitrogênio com a evolução de oxigênio da fotossíntese. O *Azospirillum* é um aeróbio obrigatório comportando-se como micro-

aerofílico quando fixa nitrogênio (Day & Döbereiner, 1976). Okon et al.(1976a), observaram a perda irreversível da nitrogenase quando culturas semi-sólidas foram agitadas e a película destruída. Entretanto, Hill (1976a) verificou que a nitrogenase do *Azospirillum* pode ser reversivelmente inibida pelo oxigênio como ocorre em um grande número de organismos fixadores de nitrogênio, tais como o aeróbio obrigatório *Azotobacter chroococcum* (Yates, 1970; Drozd & Postgate, 1970) e o anaeróbio facultativo *Klebsiella pneumoniae* (Hill, 1976b). Portanto, essa bactéria não fixa nitrogênio quando exposta ao ar mas cresce rapidamente quando há suprimento de nitrogênio combinado (Okon et al., 1977a). O crescimento em condições de fixação de N_2 é muito mais lento. Okon et al.(1977a) encontraram um tempo de geração de 5,5 a 7 horas em meio líquido a pO_2 de 0,005-0,007 atm, sendo que pressões de oxigênio menores que esse valor são necessárias para que a nitrogenase seja funcional (Okon et al., 1977b; Vargas, 1977). O crescimento do *Azospirillum* em meio semi-sólido evita estas dificuldades devido haver um gradiente de difusão de O_2 (Neyra & Döbereiner, 1977).

2.3.1.2. MECANISMOS DE PROTEÇÃO DA NITROGENASE CONTRA O OXIGÊNIO.

A maioria das bactérias fixadoras de nitrogênio tem desenvolvido eficientes mecanismos de proteção para excluir o oxigênio do sítio da fixação do nitrogênio (Postgate, 1971b, 1974; Yates & Jones, 1974; Yates, 1977). A tolerância limitada do *Azospirillum* ao oxigênio indica a falta de um mecanismo protetor ou pelo menos parece ter um pobre mecanismo protetor para a nitrogenase contra níveis altos de oxigênio (Okon et al., 1976a, Döbereiner, 1977). Bergersen & Gibson (1978) demonstraram a falta de um mecanismo protetor da nitrogenase do *Rhizobium* em

meio de cultura. Okon et al.(1976b) observaram que os quocientes respiratórios (Q_{O_2}) de *Azospirillum* que fixa N_2 são de apenas 10-20% do *Azotobacter* mas que é semelhante ao do *Rhizobium* nas mesmas condições. *Azospirillum* parece não apresentar um mecanismo conformacional para proteger a nitrogenase como o *Azotobacter* (Postgate, 1974) já que Okon et al.,(1976a) verificaram que células fixadoras de N_2 quando expostas ao ar não recuperam a atividade da nitrogenase e ao acrescentar cloranfenicol ao meio não a recuperam, indicando que a nitrogenase necessita da síntese proteica para ser restaurada. As exigências à concentração de oxigênio reduzida provoca acúmulo de bactérias numa determinada faixa abaixo do nível do meio semi-sólido. Essa tendência das células agruparem-se pode representar um dos mecanismos protetores da nitrogenase.

2.3.2. METABOLISMO DO CARBONO

Os açúcares em geral não atuam no aumento da absorção de O_2 pelos extratos obtidos de células de *A. brasilense* (Okon et al., 1976a,b). As células intactas apresentam pouco crescimento com frutose e galactose (Okon et al., 1976a; Day & Döbereiner, 1976). Entretanto, há metabolização rápida e bom crescimento com malato, lactato, piruvato e succinato, constituindo estes as melhores fontes de carbono e energia para o crescimento destas bactérias com N_2 ou com amônia. O aumento da absorção de O_2 com a adição dos produtos intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico (lactato ou piruvato) indica que esse ciclo atua nesses microrganismos (Okon et al., 1976b). Em condições anaeróbicas tendo glucose como fonte de carbono não ocorre acidificação do meio de cultura.

A. lipoferum cresce bem tendo glucose como fonte de carbono (Okon et al., 1976a; Sampaio et al., 1978; Döbereiner 1977) tanto com amônia ou N_2 . Tarrand et al., (1978) verificaram

que essa bactéria pode crescer aerobicamente e produzir ácido em meio de glucose com peptona e quase não cresce em meio com glucose ou frutose em condições anaeróbicas acidificando o meio.

2.3.3. METABOLISMO DO NITROGÊNIO.

2.3.3.1. CRESCIMENTO EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO.

Quando há suprimento de uma fonte de nitrogênio (N-NO_3 ou N-NH_4) as bactérias não fixam nitrogênio devido a capacidade de assimilação do nitrato ou da amônia.

Entretanto em condições limitadas de oxigênio *A. brasilense nir⁺* e *A. lipoferum* dissimilam NO_3 para NO_2 , o qual é reduzido a gás. *A. brasilense nir⁻* dissimila o NO_3 a NO_2 mas não reduz a N_2 , sendo o NO_2 acumulado no meio. Em condições de anaerobiose não há crescimento (Neyra & Van Berkun, 1977) mas o NO_3 é reduzido podendo ser usado no processo respiratório ao invés do O_2 . Neyra et al. (1977) verificaram o processo da denitrificação em estirpes de *A. brasilense nir⁺* através de cromatografia gasosa pelo acúmulo de N_2O sob C_2H_2 .

Azospirillum parece apresentar o mesmo mecanismo de incorporação de NH_4^+ e da regulação da nitrogenase de outras bactérias fixadoras de nitrogênio. As células crescidas em meio com nitrogênio mostram maior atividade do sistema GS-GOGAT (glutamina sintetase-glutamato oxoglutarato amino transferase) e menor atividade do sistema GDH (glutamina dehidrogenase) quando comparadas com células crescidas com NH_4^+ (Okon et al., 1976b).

Usando extratos obtidos de células contendo nitrogenase ativa de *A. lipoferum*, Okon et al. (1977a) verificaram que

esta enzima apresenta propriedades semelhantes a das demais nitrogenases quanto a necessidade de um redutor forte e um sistema gerador de ATP e Mg. No entanto, a proteína de ferro é praticamente inativada quando é isolada necessitando de um fator de ativação que utiliza Mn semelhante ao do *Rhodospirillum rubrum*.

2.3.3.2. EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE N₂.

A eficiência da transformação do substrato pelas bactérias varia de acordo com as condições de crescimento e com a fonte de carbono. Jensen (1953), trabalhando com culturas "batch" de *Azotobacter*, encontrou 10-15 mg N₂ fixado g⁻¹ substrato de carbono consumido; esse valor aumenta para 40-45 mg em cultura contínua limitada por O₂ (Dalton Postgate, 1969; Hine & Lees, 1976). Eficiência relativamente alta também foi encontrada em culturas semi-sólidas de *Azospirillum spp* (da ordem de 50 mg N₂ fixado g⁻¹ malato ou glucose) (Döbereiner & Day, 1976 e Day & Döbereiner 1976). Em cultura contínua com pressões ótimas de O₂ (0,005-0,007 atm) para o crescimento do *Azospirillum* com N₂ a eficiência foi de 8-10 mg N g⁻¹ malato diminuiu com níveis mais altos de O₂ (Okon et al., 1977a). Em meio semi-sólido Okon et al. (1976a) obtiveram valores na faixa de 10-25 mg N g⁻¹ substrato de carbono. Nelson & Knowles (1978) e Vargas (1977) encontraram valores de eficiência de N₂ para *A. brasilense* da ordem de 20 mg N g⁻¹ malato consumido e 26-28mg N g⁻¹ succinato respectivamente.

2.3.4. HIDROGENASE E EVOLUÇÃO DE H₂.

Além da nitrogenase e seus doadores de elétrons a hidrogenase está envolvida na fixação de N₂. A hidrogenase tem sido definida como uma enzima que cataliza a formação e utiliza-

ção de H_2 de um modo reversível atuando na seguinte reação: $2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2$. Entretanto, o critério de reversibilidade não é sempre respeitado, e qualquer evolução ou oxidação de H_2 é evidência da presença da hidrogenase. Existem três tipos de reações de H_2 encontradas em diversos microrganismos. O primeiro, é a evolução de H_2 dependente de ATP catalizada pela nitrogenase, que utiliza prótons como acceptor alternativo. A segunda reação, é a da hidrogenase reversível independente de ATP encontrada nos organismos anaeróbicos. O terceiro tipo é a hidrogenase oxidativa ("uptake-hidrogenase") que é irreversível e independente de ATP. Esta enzima cataliza a oxidação de H_2 mas não a evolução de H_2 . Ocorre nos organismos aeróbios fixadores de N_2 como *Azotobacter* (Hyndman, et al., 1953), nódulos de leguminosas e não leguminosas (Dixon, 1967; Schubert & Evans, 1976) e cianobactérias (Bothe et al., 1977b).

Cerca de 20 anos atrás descobriu-se que a nitrogenase libera H_2 "in vivo" (Hoch et al., 1957; Hoch et al., 1960; Bergersen, 1963). Atualmente a maior preocupação estudo da relação entre a "uptake hidrogenase" e a evolução de H_2 pela nitrogenase devido ao desperdício de energia para a evolução de H_2 (Schubert & Evans, 1976; Evans et al., 1977; Hill, 1976c; Andersen & Shanmugam, 1977; Walker & Yates, 1978; & Walker, 1979). As funções da hidrogenase são: reciclagem do H_2 evoluído para economia de energia (Dixon, 1972; Smith et al., 1976b), remoção do O_2 do sítio de fixação para proteger a nitrogenase contra a inibição pelo O_2 , prevenir a inibição pelo H_2 da redução do N_2 e fornecer ATP para a nitrogenase. Essas hipóteses levantadas por Dixon (1972) referem-se à capacidade da hidrogenase suportar a fixação de N_2 em organismos aeróbios. E estudos sobre a eficiência da fixação do nitrogênio e metabolismo do hidrogênio associado com a nitrogenase tem sido realizados com as cianobactérias por vários pesquisadores, (Benemann & Weare, 1974a,b; Bothe et al., 1977a,b, 1978; Tel-

or et al., 1977, 1978; Peterson & Burris, 1978; Eisbrenner et al., 1978; Daday et al., 1977) e com sistemas simbióticos fixadores de N_2 (Schubert & Evans, 1976, 1977; Evans et al., 1977; Ruiz-Argueso, 1978; McCrae et al., 1978; Carter et al., 1978). Wilson (1958) verificou a associação entre a hidrogenase e a atividade da nitrogenase. Os nódulos de *Pisum sativum* consomem H_2 suportado pela fosforilação oxidativa e não evoluem H_2 (Phelps & Wilson, 1941; Dixon, 1967, 1968, 1972). Entretanto, tem sido mostrado por outros pesquisadores que os nódulos de soja evoluem H_2 (Hoch et al., 1960; Bergersen, 1963).

Verificou-se na maioria das leguminosas estudadas uma perda de 30-60% da energia fornecida para a nitrogenase na evolução de H_2 (Schubert & Evans, 1976; Evans et al., 1977). A bactéria *Azotobacter chroococcum* parece possuir duas enzimas que atuam no metabolismo de H_2 ; uma é a hidrogenase oxidativa de H_2 cuja atividade aumenta quando a nitrogenase é dereprimida (Hyndman et al., 1953) e a outra é a evolução de H_2 associada com a atividade da nitrogenase (Hoch et al. 1960; Brotonegoro, 1974; Smith et al. 1976b).

A atividade da hidrogenase é diferentemente inibida por substratos (Rivera-Ortiz & Burris, 1975) como já verificado para *A. chroococcum* com o uso de CO , N_2 e C_2H_2 (Smith et al., 1976b). Walker & Yates (1978) observaram evolução de H_2 por essa bactéria em cultura contínua. Recentemente foram caracterizadas duas novas bactérias autotróficas que utilizam H_2 para fixar N_2 em condições microaerofílicas (Berndt et al., 1976; Aragno et al., 1978). Becking (1963) verificou atividade da hidrogenase em uma bactéria muito provavelmente *Azospirillum* utilizando como aceptor de elétrons benzil e metilviologem. Essa atividade também foi verificada quando utilizou o gás D_2 .

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

Foram realizados oito experimentos de crescimento em cultura "batch" com *Azospirillum lipoferum*: 2 preliminares com 1% (p/v) glucose para estabelecer a curva de crescimento, sob as condições experimentais determinada. Nos experimentos restantes foi usado 0,2% (p/v) glucose. Essa concentração diminuiu a fase log sem mudar o padrão inicial da curva de crescimento. Dois experimentos foram realizados para obter células no início da fase log que correspondeu a D.O. = 0,3; um para obter células na metade da fase log que correspondeu a D.O.= 0,9 e um para coletar células no final da fase log e estacionária. Em dois experimentos adicionais as células foram coletadas em vários estágios de crescimento para reconfirmação das determinações. Todas as curvas de crescimento seguiram aproximadamente o mesmo padrão.

3.1.1. CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Em todos os experimentos utilizou-se o mesmo meio líquido sem nitrogênio com a seguinte composição: K_2HPO_4 0,08%; KH_2PO_4 0,04%; NaCl 0,01%; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,001%; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,0002%; ácido nitriloacético (NTA) 0,0056%; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (como quelato) 0,002%; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,02%; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,002%; biotina 0,1 ppm; pyridoxal HCl 0,2 ppm; glucose 0,2% (exceto nos experimentos preliminares onde se usou 1%). O sal de ferro foi quelatizado por aquecimento em 30 ml H_2O com o NTA, adicionando gotas de NaOH 10% até o desenvolvimento de uma forte coloração amarela. As vitaminas biotina e pyridoxal HCl foram dissolvidas também por aquecimento em 100 ml H_2O . Os sais de cálcio e magnésio e a glucose foram esterilizados separadamente. Não foi necessário ajuste de pH porque o pH inicial do meio (6,8 a 7,0) foi mantido e nunca excedeu 7,0 mesmo após toda a glucose ser consumida. Oito litros e meio foram preparados para cada experimento e autoclavados durante 60 minutos a 125°C.

3.1.2. ORGANISMO E INÓCULO

Azospirillum lipoferum Br 17 (ATCC 29709) foi originalmente isolado de raízes de *Zea mays* coletado em Brasília, D.F., Brasil. Essa estirpe foi identificada como *A. lipoferum* segundo Tarrand et al. (1978). Em contraste com *A. brasilense* esta espécie usa glucose como fonte de carbono e necessita de biotina para crescer fixando N_2 . Culturas estoques foram mantidas em meio de batata sólido e semi-sólido, conservados em 5°C. O inóculo correspondeu a 5% do volume total da cultura e foi crescido sem agitação a 37°C por 22 horas, sob ar, no mesmo meio de crescimento suplementado com 1 mM NH_4Cl . A pureza das culturas estoques, inóculo e crescimento foram observadas em cada experimento através de riscagem em meio de batata sólido e observações em microscópio.

3.1.3. CRESCIMENTO EM CULTURA "BATCH"

3.1.3.1. EQUIPAMENTO

As culturas foram crescidas em um recipiente com capacidade de 9 litros contendo 7 litros de meio, e agitadas com uma barra magnética coberta com teflon (Figura 1). A temperatura de crescimento foi controlada automaticamente a 35°C através de um termostato dentro da cultura o qual controlava duas lâmpadas externas de aquecimento infra-vermelho. A cultura foi agitada a uma taxa constante de 400 rpm.

3.1.3.2. INSTRUMENTAÇÃO E CONTROLE DO OXIGÊNIO

A pressão do oxigênio dissolvido equivalente à fase gasosa de 0,002-0,003 atm de oxigênio em equilíbrio com a água foi mantida constante através do ajuste manual do fluxo dos gases em dois rotâmetros: um de marca Gapmeter (England) e o outro DWYER (USA) com capacidade de 20-1200 ml min⁻¹ e 20-240 ml min⁻¹ respectivamente. No início do crescimento os Rotâmetros conduziam uma mistura estéril de O₂ 5% em N₂ e N₂ puro. Com o aumento da densidade de células, aumentou-se a proporção de O₂ na mistura de gases sendo que no final da fase logarítmica o consumo de O₂ foi tão grande que foi necessário aspergir ar para manter a pO₂ acima de zero (0,002 atm). A tensão de O₂ dissolvido foi medida com um eletrodo galvânico Pb/Ag (Borkowsky & Johnson, 1967) estéril imerso na cultura acoplado a um registrador Oxford (Oxford Instruments - England). O eletrodo de oxigênio foi feito em nosso laboratório por H. De-Polli, seguindo o procedimento descrito por Johnson et al. (1964). O eletrodo de oxigênio foi calibrado inicialmente no meio de cultura a 35°C em equilíbrio com N₂ e com mistura N₂ e O₂ de 95:5. A membrana

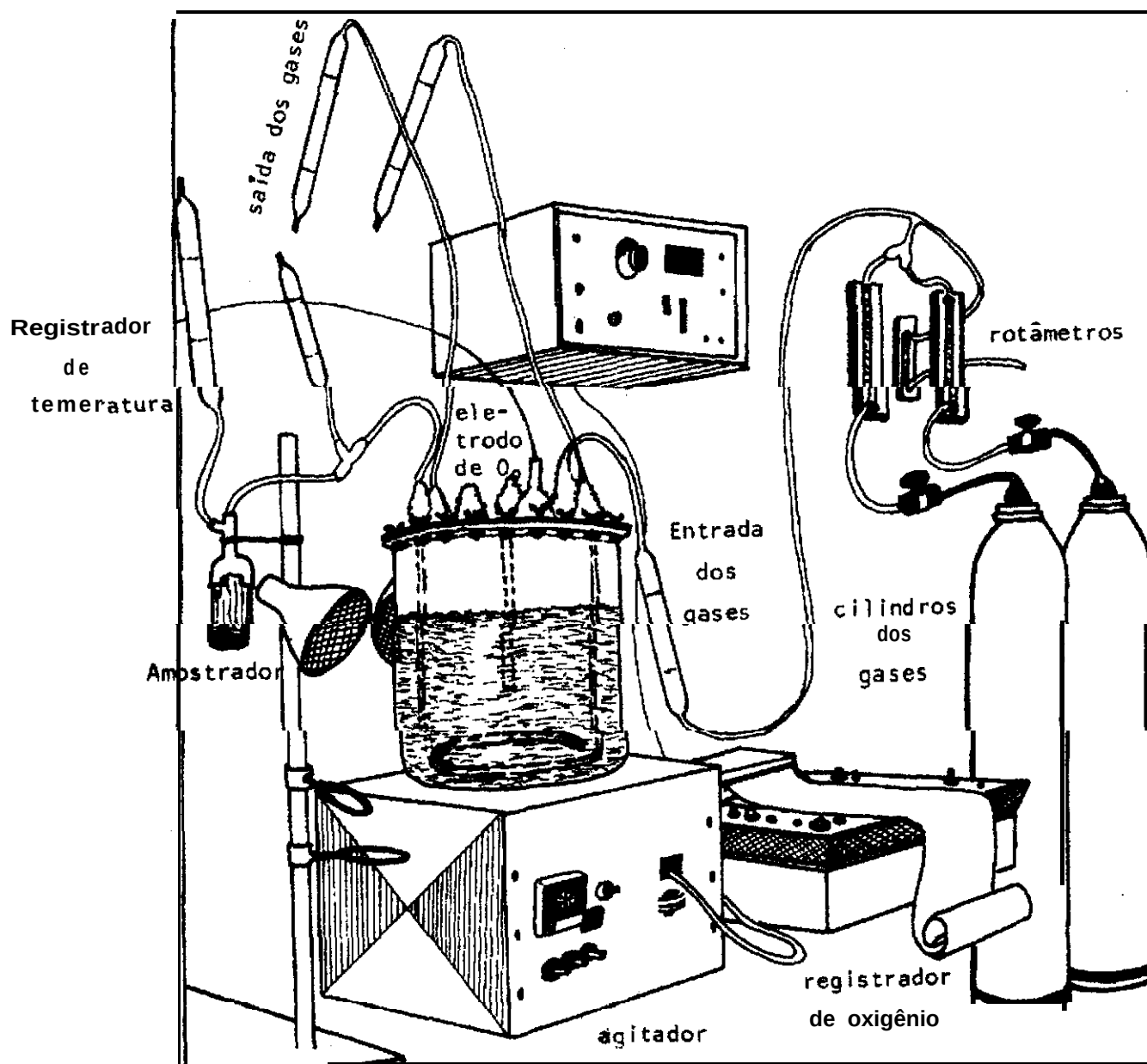


FIGURA 1 - Equipamento e instrumentação para o controle do oxigênio utilizados no crescimento das bactérias em culturas "batch".

de teflon do eletrodo foi trocada para cada experimento para evitar contaminações e conseqüente declínio na sensibilidade.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Durante o crescimento amostras periódicas foram retiradas em frascos McCarty estéreis para as determinações de pH, turbides, peso seco, proteína e N-total nas células; glucose, N-total, amônia e nitrato no sobrenadante. Além disso, grande quantidade de células foi coletada nas fases logarítmica e estacionária de crescimento quando a D.O. atingiu 0,3, 0,9, 1,4, 1,7, 1,6 e 1,5. Estas densidades óticas correspondem aproximadamente a 20, 27, 29, 31:45, 33, 33:15 horas de incubação da cultura (Figura 2). Em experimentos de repetição, as células foram coletadas nas idades aproximadas correspondentes as densidades óticas do 1º experimento.

Com 0,2% glucose no meio a densidade ótica de 1,7 corresponde ao ponto de inflexão da curva de crescimento (final da fase logarítmica - início da fase estacionária). Esse ponto foi determinado baseando-se em experimentos preliminares podendo ser facilmente observado através da queda repentina do consumo de O_2 e conseqüente declínio da turbides da cultura após 30-45 minutos indicando consumo do poli -b- hidroxibutirato. Nesta fase foi necessário reduzir o fluxo de gás e a concentração de O_2 nele, para evitar o aumento do nível da tensão de oxigênio dissolvido e conseqüente inibição do sistema nitrogenase das células fixadoras de N_2 .

As amostras foram retiradas anaerobicamente sob corrente de N_2 e centrifugadas a 1.500 x g durante 20 minutos.

O pellet foi guardado em nitrogênio líquido para medidas da atividade da hidrogenase, evolução de H_2 , redução de acetileno, consumo de O_2 e tolerância ao O_2 .

3.2.1.1. TURBIDEZ

A curva e taxa de crescimento foram determinadas através de medidas da densidade ótica da cultura em um espectrofotômetro Perkin-Elmer Hitachi 200 a 560 nm contra um branco do meio de cultura.

A taxa específica de crescimento (μ) e o tempo de geração (t_d) foram determinados durante a fase log aplicando as equações de Tempest (1970):

$$\mu = 2,3 \frac{\log x_2 - \log x_1}{t_2 - t_1}$$

$$t_d = \frac{0,693}{\mu}$$

onde x_1 e x_2 corresponde a densidade ótica respectivamente no tempo t_1 e t_2 .

3.2.1.2. GLUCOSE NO MEIO DE CULTURA

A glucose no sobrenadante foi determinada após a separação das células do meio de cultura por centrifugação, pelo método de Somogyi-Nelson (Nelson, 1944). Foi utilizada para a curva padrão uma solução contendo $50 \mu g$ glucose ml^{-1} . Inicialmente o sobrenadante foi desproteínizado colocando-se 0,1 ml com

1,5 ml de água destilada, 0,2 ml da solução de hidróxido de bário 0,3 N e 0,2 ml da solução de sulfato de zinco 5%. Permaneceu em repouso por 5 minutos. Após, o material foi centrifugado a 4.000 rpm por 15 minutos. O desproteínizado foi separado com uma pipeta colocando-se em um tubo de ensaio uma alíquota de 1 ml, 1 ml de água destilada e 1 ml do reagente de somogyi. Agitou-se e a amostra foi aquecida por 20 minutos em banho-maria. Após o resfriamento foi adicionado 1 ml do reagente de Nelson e diluído a 10 ml com água destilada. A absorvância da cor azul foi medida em 500 nm.

3.2.1.3. PROTEÍNA

O conteúdo de proteína das células bacterianas e do sobrenadante foi determinado com o reagente Folin fenol ciocalteu's segundo Lowry et al.(1951). A concentração de proteína foi determinada através da comparação da absorvância das amostras com padrões obtidos com soluções de concentração crescente de soro de albumina de boi cristalina.

3.2.1.4. PESO SECO

O peso seco das bactérias foi determinado em alíquotas de 20 ml que foram centrifugadas por 20 minutos a 14.300 x g e lavadas superficialmente sem suspender as células. O pellet depois foi ressuspensionado em água e transferido para pesa-filtros pré-pesados secos usando um mínimo de água destilada e secagem a 105°C até obter peso constante. O material seco foi esfriado na presença de um dessecante e pesado.

3.2.1.5. NITROGÊNIO TOTAL

3.2.1.5.1. N-TOTAL NAS BACTÉRIAS

O nitrogênio total das células foi determinado pelo método micro-kjeldahl (Bremner, 1965). Acrescentou-se ácido sulfúrico concentrado (3 ml) ao pellet. Após 24, horas transferiu-se esta mistura para os frascos kjeldahl de 100 ml e adicionou-se 200 mg do catalizador $K_2SO_4 + HgO$ (10:1). A digestão do material até tornar-se claro durou aproximadamente 2 horas. Quando a digestão foi completada seguiu-se a microdestilação da amônia que foi recebida em ácido bórico 2% contendo vermelho de metila e verde de bromocresol. A amônia foi titulada com H_2SO_4 0,0021 N.

3.2.1.5.2. N-TOTAL NO SOBRENADANTE

amostras de sobrenadante foram digeridas e destiladas usando a mesma metodologia empregada para as células.

3.2.1.6. AMÔNIA

A concentração de amônia no sobrenadante foi determinada colorimetricamente pelo método indofenol (Chancy & Marbock, 1962).

3.2.1.7. NITRATO

Nitrato no sobrenadante foi determinado colorimetricamente pela reação com ácido salicílico (Cataldo et al., 1975).

3.2.1.8. REDUÇÃO DE ACETILENO E CONSUMO DE OXIGÊNIO

Estas determinações foram feitas nas células guardadas em nitrogênio líquido, as quais foram ressuspensas para densidade ótica 1,0 no mesmo meio de crescimento contendo 0,2% de glucose. A taxa máxima da redução de acetileno foi determinada para cada amostra em oito diferentes valores de pO_2 . Para isto três ml da suspensão das células foram injetadas em frascos de 10 ml que tinham sido previamente preenchidos com mistura de $N_2:C_2H_2$ (90:10) sendo o excesso de pressão liberada. Por último o oxigênio foi acrescentado nas pressões parciais previstas. A incubação foi feita em agitador com banho-maria a 37°C. Após 30 e 60 minutos de incubação, a quantidade de etileno formado pela redução do acetileno foi determinada em um cromatógrafo, de gás Perkin-Elmer F-11 com coluna Poropak N a 110°C com N_2 como gás de arraste.

O consumo de oxigênio foi determinado nos mesmos frascos através de medidas da pO_2 , após uma hora de incubação num cromatógrafo a gás portátil 7500 (Carle Instruments, Inc.) com coluna molecular sieve 5 A tendo hélio como gás de arraste. As amostras de gás foram removidas com seringas cheias de N_2 tomando-se cuidado para não contaminar com oxigênio. Foi injetado nos frascos quantidade de N_2 equivalentes às amostras tomadas para as leituras.

3.2.1.9. EVOLUÇÃO DE H_2

A evolução de H_2 foi estimada em várias concentrações de oxigênio pelo mesmo método descrito para a atividade da nitrogenase mas sem acetileno e com nitrogênio substituído por argônio. O H_2 foi medido num cromatógrafo a gás portátil

7.500 (Carle Instruments, Inc.) com coluna molecular sieve 5 A tendo árgônio como gás de arraste.

3.2.2. ATIVIDADE HIDROGENASE

Foi medida manometricamente em um aparelho warburg tipo OE -901 (LABOR MIN Budapest) nas células intactas, com azul de metileno como acceptor de elétrons. No compartimento principal foram adicionados 0,2 ml de EDTA 10 mM; 0,2 ml NaF 500 mM; 0,4 ml de tampão fosfato 200 mM; 0,5 ml de H₂O e 0,5 ml de células. O apêndice lateral tinha 0,1 ml de azul de metileno 100 mM e na parte central da base tinha 0,2 ml NaOH 10% (p/v). A fase gasosa foi H₂ e o banho-maria foi ajustado para 37°C. Foram usadas células, obtidas a partir da centrifugação de 200 ml do meio de cultura em cada fase de crescimento guardadas em nitrogênio líquido e ressuspensas em 2 ml de tampão fosfato 500 mM pH = 8,0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. CRESCIMENTO EM MEIO DE CULTURA SEM NITROGÊNIO

A Figura 2 mostra uma curva típica de crescimento de *Azospirillum lipoferum* (medida pela absorvância) em meio com 0,2% de glucose e com pO_2 em solução mantida entre 0,002-0,003 atm. As culturas cresceram bem utilizando glucose como fonte de carbono e energia, atingindo níveis máximos de absorvância na ordem de 1,7, quando o crescimento parou em virtude do término da glucose do meio. O suprimento de oxigênio foi adaptado a exigência das bactérias através do aumento do fluxo da mistura de gases mantendo-se sempre em solução uma pO_2 0,002-0,003 atm. Após a inoculação do meio de cultura observou-se uma densidade ótica inicial ($E = 560$ nm) de 0,03-0,1, sendo que nesse período de crescimento o consumo de O_2 pelas bactérias foi bem menor que o consumido na fase logarítmica. Verifica-se através da curva que crescimento é exponencial entre 10 e 30 horas (Figura 2). A fase lag destas culturas que continham 0,2% de glucose durou

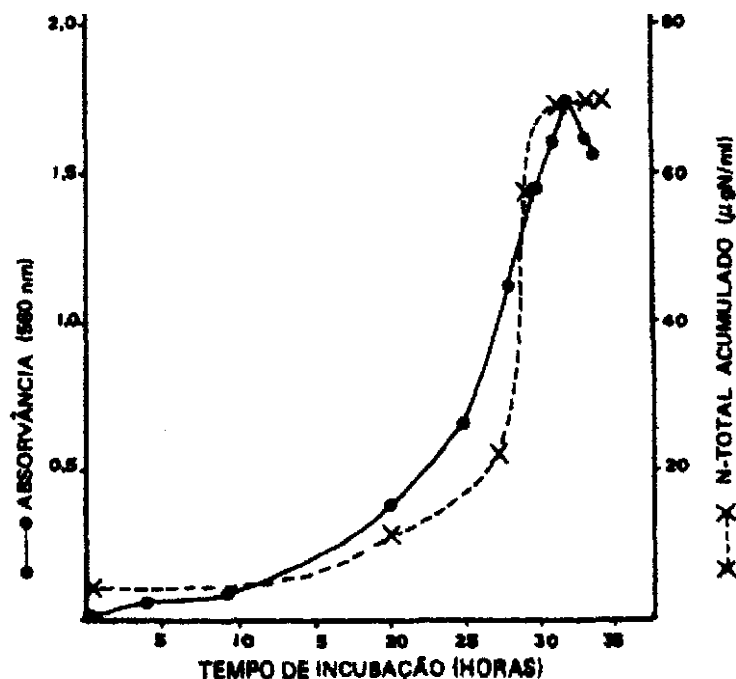


FIGURA 2 - Curva de crescimento e N-total acumulado em cultura "batch" de *Azospirillum lipoferum*. Foi usado meio líquido sem nitrogênio com 0,2% glucose. Sete litros de meio foram inoculados com volume de inóculo equivalente a 5% do volume total crescido com 1 mM NH_4Cl . Incubação a 35°C com pO_2 em solução de 0,002-0,003 atm controlado manualmente de acordo leituras com eletrodo submerso. A fase Lag durou aproximadamente dez horas. O N-total acumulado foi determinado pelo método de micro-kjeldahl.

apenas 10 horas enquanto nos experimentos preliminares com 1% de glucose a fase lag durou aproximadamente 20 horas. Concentrações baixas de glucose parecem portanto favorecer o crescimento inicial. O tempo de geração (td) nas condições citadas foi de 5,3 horas, o qual corresponde a uma taxa relativa de crescimento $\mu = 0,129 \text{ h}^{-1}$ quando calculado a partir das medidas de densidade ótica e $\mu = 0,130 \text{ h}^{-1}$ quando calculado a partir do peso seco. Tempo de geração similar (td = 5,5-7,0 horas) foi encontrado por Burris et al., (1978) e Okon et al., (1977a) mas com pO_2 (0,005-0,007 atm) considerado como ótimo por estes autores. Vargas (1977) encontrou o mesmo tempo de geração utilizando pO_2 mais baixo ($0,001 \pm 0,0005 \text{ atm}$). O pH do meio não se alterou durante o crescimento permanecendo entre 6,8-7,0 mesmo após toda a glucose ser metabolizada, o que está de acordo com as observações nos experimentos de Okori et al. (1976a); Sampaio et al., (1976) e Döbereiner (1977). Esta faixa de pH está dentro da faixa de atividade máxima da nitrogenase pelas células de *Azospirillum* (Day & Döbereiner, 1976) ou extratos obtidos de células (Okon et al., 1977a).

4.2. FIXAÇÃO E EXCREÇÃO DE NITROGÊNIO

O nitrogênio acumulado seguiu o padrão similar da curva de crescimento (Figura 2) apresentando uma taxa relativa de fixação de nitrogênio $mN = 0,21 \text{ h}^{-1}$ e o tempo de duplicação td = 3,3 horas. Isto é mais curto que o tempo de duplicação das bactérias, sugerindo assim a excreção de parte de N_2 fixado (37% por este cálculo). A quantidade total de nitrogênio fixado acumulado foi atingida no início da fase estacionária e correspondeu a cerca de $70 \mu\text{g N ml}^{-1}$ o que corresponde a 13,8% do peso celular acumulado, (Figura 3). Nem todo o nitrogênio fixado durante o crescimento ativo foi assimilado pelas células (Figura 4).

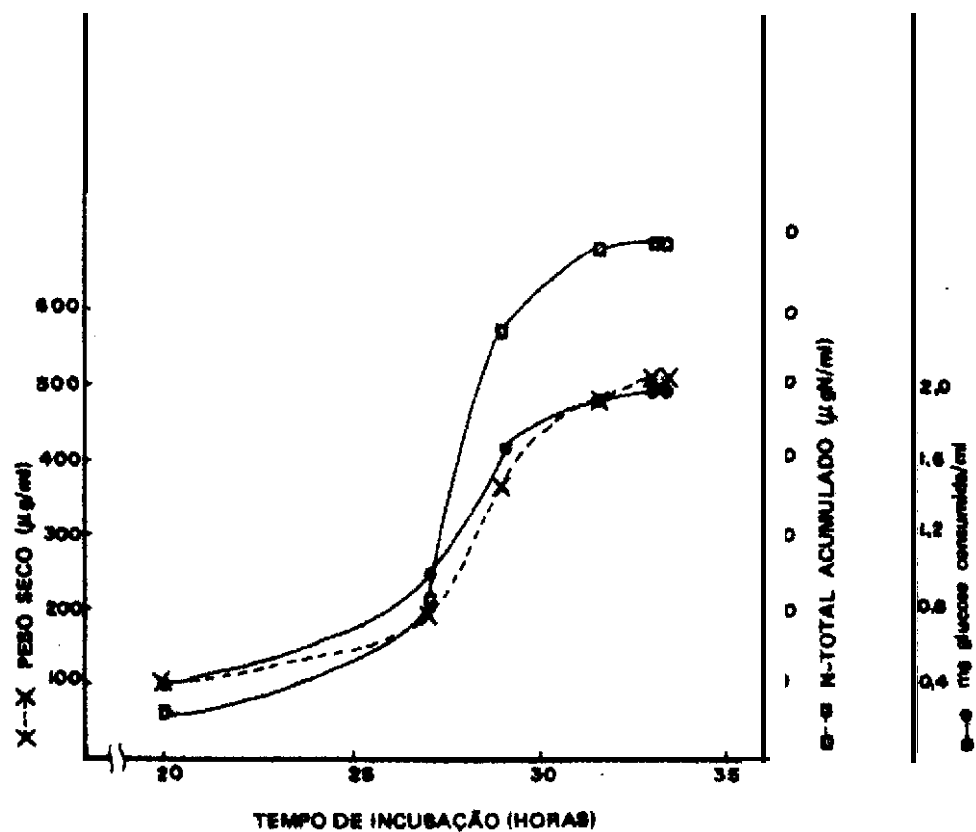


FIGURA 3- Peso seco e N-total acumulado em relação à glucose consumida durante o período de incubação da cultura de *Azospirillum lipoferum*. As condições de cultura são as mesmas citadas na Figura 2.

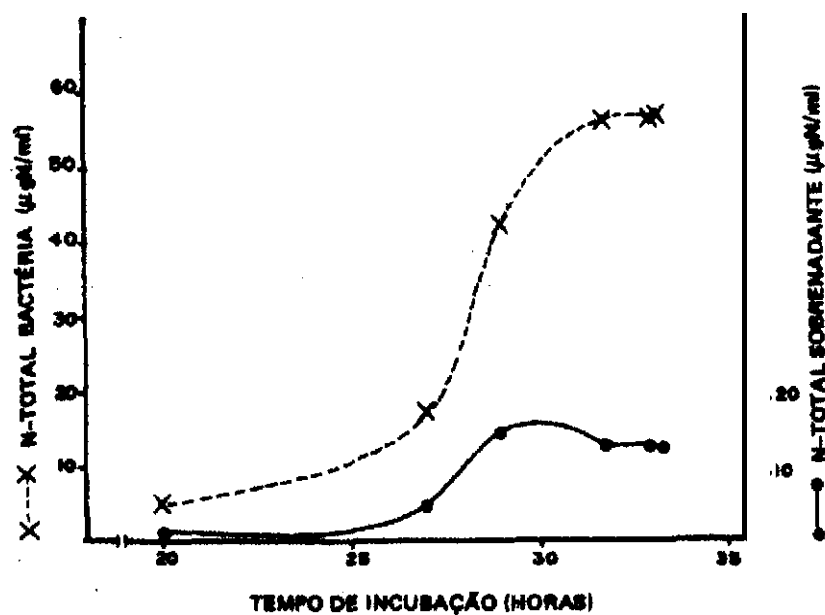


FIGURA 4 - Nitrogênio fixado pela bactéria e nitrogênio excretado ao meio em cultura "batch" de *Azospirillum lipoferum*. Condições de cultura como à da Figura 2.

A percentagem de nitrogênio excretado aumentou até o meio da fase log (29 horas de incubação). Os níveis de amônia encontrados no sobrenadante foram abaixo de $1 \mu\text{g/ml}$ e nenhum nitrato e proteína foram encontrados durante todo o crescimento. O nitrogênio excretado que parece ser de origem orgânica não foi identificado. Elmerich (1978) observou acúmulo de amônia em meio semi-sólido de cultura de *A. brasilense* durante o início do crescimento em condições de fixação de N_2 e verificou que em culturas mais velhas havia assimilação dessa amônia pela bactéria. Esse comportamento pode ser comparado com o das leguminosas que apresentam um sistema eficiente de fixação de nitrogênio. Nestas, os bacteróides nos nódulos excretam o nitrogênio fixado como amônia que é assimilado através de enzimas das plantas (Scott, 1976). Em meio de cultura, Bergersen (1978) e Keister (1975) observaram que o *Rhizobium* reassimila parcialmente o nitrogênio fixado que é excretado ao meio. Em experimentos com 5 estipes diferentes de *Azotobacter*, Brotonegoro (1974) achou excreção de 7-13% do N-total pelas células e somente pequena percentagem desses compostos nitrogenados excretados era amônia. Winogradsky (1949) não observou a liberação de amônia por células jovens de *Azotobacter* quando a fonte de carbono era a glucose mas havia perdas de amônia com a utilização de ácidos orgânicos e consequente alcalinização do meio.

4.3. EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DE NITROGÊNIO

A eficiência da fixação de N_2 do crescimento de *Azospirillum lipoferum* foi expressada como mg N fixado por g glucose consumida como substrato de carbono e energia. Medidas foram feitas nos experimentos pela determinação em vários estágios do crescimento do N-total nas células e N-total no supernadante e do conteúdo de glucose no meio. O aumento da eficiência da fixação de N_2 ocorre no fim da fase logarítmica com o decréscimo da concentração de glucose do meio (Figura 5). Enquanto que no

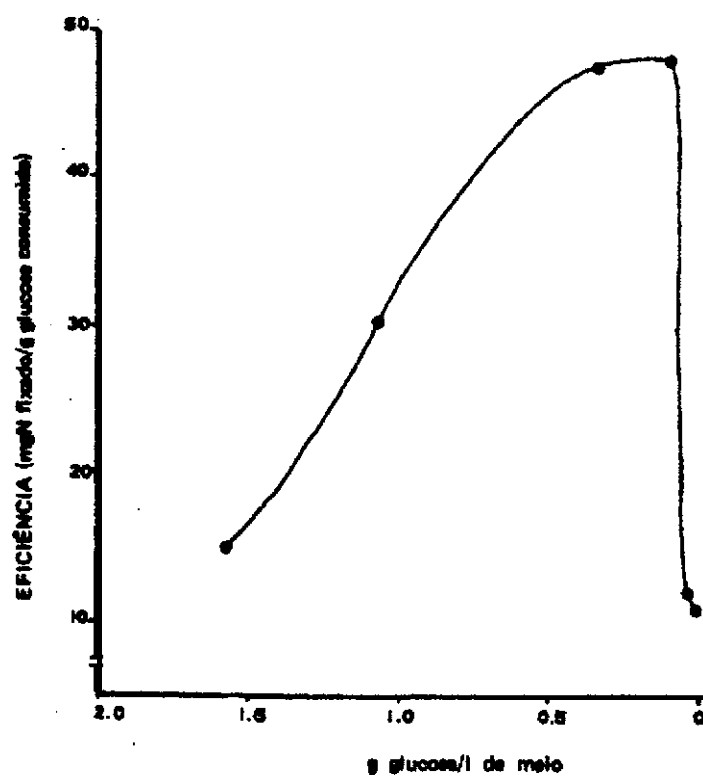
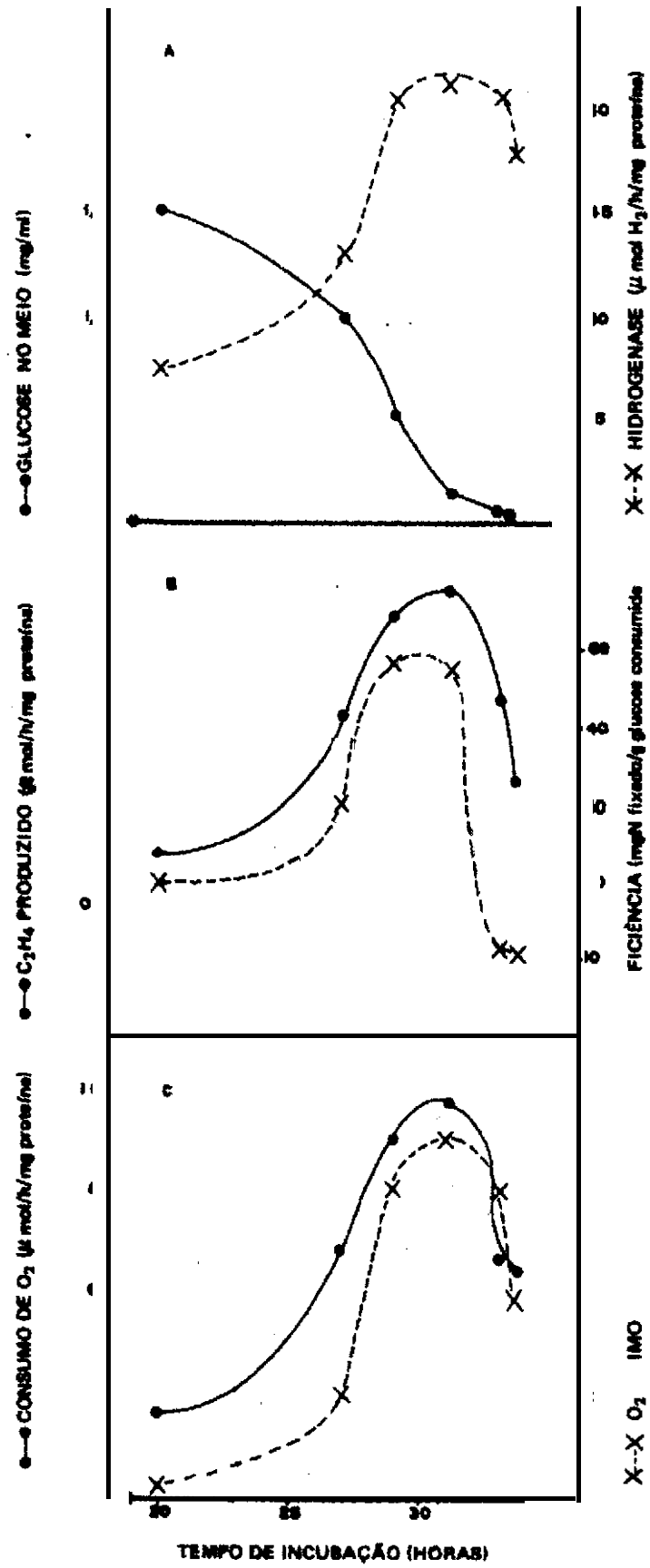


FIGURA 5 - Efeito da concentração da glucose na eficiência da fixação do nitrogênio.

início da fase log a eficiência é da ordem de 20 mg N/g glucose, no fim desta fase a eficiência aumenta para 48 mg/g. A curva da atividade específica da nitrogenase (nmol C_2H_4 /h/mg proteína) acompanha a da eficiência da fixação de N_2 (Figura 6B). Vargas (1977) trabalhando com *A. brasilense* encontrou valores de 26 mg N/g malato em culturas contínua e com pO_2 de 0,005 atm considerada ótima, e sugere que as eficiências mais baixas encontradas quando as condições de O_2 eram sub ou super-ótimas eram devidas ao acúmulo de poli- β -hidroxibutirato. Portanto, a eficiência 5 apresentada pelo *A. Lipoferum* no final da fase log (48 mg N/g glucose) é mais alta que a encontrada por esses pesquisadores e bem próximo da eficiência encontrada por Day & Döbereiner (1976) em cultura em meio semi-sólido que é 50 mg N/g glucose. As prováveis causas dos diferentes valores de eficiência de fixação de nitrogênio encontrados na literatura, são a determinação deste parâmetro em diversos estágios de crescimento bacteriano e principalmente em concentrações diversas das várias fontes de carbono. Como citado no item 4.1., *A. lipoferum* tem um tempo de geração $t_d = 5,3$ horas sob condições de fixação de N_2 na fase log; a taxa de redução de acetileno é de 220 nmoles etileno produzido/min/mg proteína e a eficiência de 28 mg N fixado/g glucose consumida.

A capacidade de fixação de nitrogênio do *A. lipoferum* assemelha-se com as bactérias aeróbicas fixadoras de N_2 de vida livre *Azotobacter* ou *Derxia*. Obteve-se diferentes valores de eficiência para *Azotobacter* de acordo com os substratos utilizados. Com etanol a eficiência foi mais alta mas com glucose foi baixa (Brotonegoro, 1974). Há aumento da eficiência do *Azotobacter* e *Beijerinckia* com a diminuição da concentração da fonte de carbono, do meio. Variações nos valores de eficiência durante o crescimento foram apresentadas para as bactérias *Corynebacterium autotrophicum* (Berndt, 1976) e *Azotobacter chroococcum* (Schmidt-Lorenz & Rippel-Baldes, 1957). Estes pesquisadores encontraram máxima eficiência no início da fase logarítmica

FIGURA 6 - Mudanças fisiológicas durante as fases logarítmicas e estacionária em cultura "batch" de *Azospirillum lipoferrum*. Condições de cultura como citado na Figura 2. A concentração da glucose e N-total na cultura foram medidas em amostras retiradas diretamente da cultura. Para as medidas das atividades da hidrogenase (Figura 6 A) e nitrogenase (Figura 6 B), o consumo de oxigênio e pO_2 ótima para a nitrogenase (Figura 6 C), as células foram coletadas anaerobicamente em diferentes estágios de crescimento, centrifugadas a $1.500 \times g$ e armazenadas em nitrogênio líquido. Antes dos experimentos as células foram resuspendidas a D.O. 1,0 no mesmo meio de cultura utilizado para o crescimento contendo 0,2% de glucose. A reação dos diferentes testes enzimáticos foi iniciada com a injeção das bactérias. As amostras para as medidas da atividade da hidrogenase foram resuspendidas em tampão fosfato 500 mM pH = 8,0. Esses valores são médias de 3 ou 4 experimentos; sendo realizados duas análises em paralelo para cada experimento.

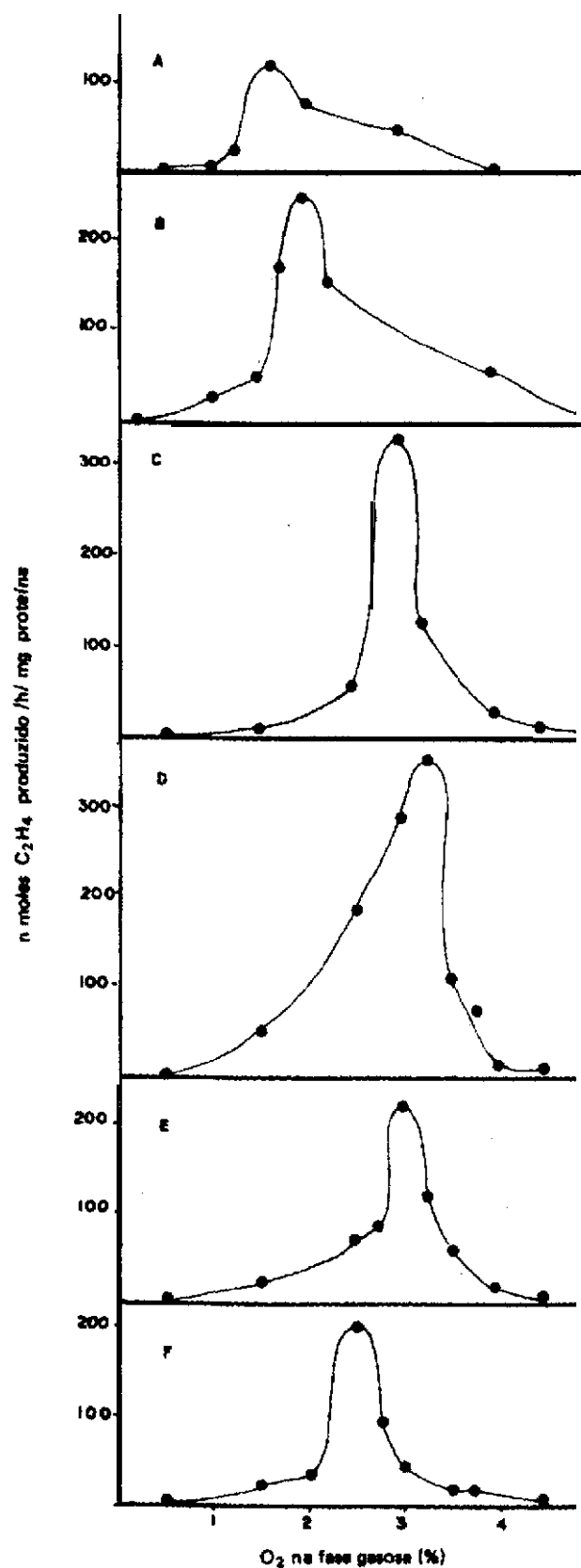


ca. Berndt (1976) relatou alta eficiência (65 mg N/g sucrose) para *C. autotrophicum* em condições heterotróficas. Com células de cultura contínua, Dalton & Postgate (1969) encontraram máxima eficiência da fixação de N_2 com *A. chroococcum* a uma taxa de diluição de $D = 0,20-0,22$ h, enquanto que em taxa mais baixas ou mais altas a eficiência foi menor.

4.4. EFEITO DO OXIGÊNIO NA REDUÇÃO DO ACETILENO

A tolerância da nitrogenase ao oxigênio foi determinada através da técnica da redução de acetileno (Figura 7) com células coletadas em diferentes estágios de crescimento ajustando-se a densidade ótica para 1,0 para evitar a interferência da densidade populacional e observar as diferenças entre os estágios de crescimento. As variações de concentrações de O_2 foram obtidas pela exposição das células a fases gasosas com pO_2 variável com interfaces constantes de gás-líquido e agitação constante. As concentrações de O_2 nas fases gasosas foram empiricamente definidas e portanto não são diretamente comparáveis as medidas das pO_2 no meio de cultura durante o crescimento das bactérias. Os dados da Figura 7 mostram uma série de "bell shaped" curvas como observadas por Dalton & Postgate (1969) e Drozd & Postgate (1970, a,b) com *Azotobacter chroococcum* crescida em cultura contínua. Curvas semelhantes também foram relatadas para as bactérias fixadoras de N_2 *Mycobacterium flavum* (Biggins & Postgate, 1969), *Corynebacterium autotrophicum* (Berndt et al., 1976) e cianobactéria *Anabaena* (Stewart, 1969). As curvas confirmam a extrema sensibilidade da nitrogenase de *A. lipoferum* ao O_2 . Esta sensibilidade representa uma das maiores dificuldades para

FIGURA 7 - Efeito do oxigênio na atividade da nitrogenase (redução de acetileno) de células do *Azospirillum lipoferum* em diferentes estágios de crescimento. As células foram crescidas em pO_2 de 0,002-0,003 atm (Figura 2) após 20 (A), 27 (B), 29 (C); 31:45 (D), 33 (E), 33:15 (F) horas da incubação foram coletadas anaerobicamente, centrifugadas a $1.500 \times g$ e armazenadas em nitrogênio líquido antes dos experimentos as células foram resuspendidas para D.O. 1,0 no mesmo meio de cultura usado para o crescimento contendo 0,2% de glucose. Amostras de três ml foram colocadas em frascos de 10 ml com concentrações variáveis de oxigênio na fase gasosa como já citado. Esses dados são médias de 3 ou 4 experimentos; sendo realizados duas análises em paralelo para cada experimento.



A - células D.O. = 0.3

B- " D.O. = 0.9

C- " D.O. = 1.4

D- " D.O. = 1.7

E- " D.O. = 1.6

F- " D.O. = 1.5

Todas as células foram resuspendidas para D.O. 1,0.

o cultivo deste microorganismo com N_2 como fonte de N e possivelmente é responsável pela variabilidade da atividade da nitrogenase em gramíneas crescidas no campo (Döbereiner, 1977). Comparando as "bell shaped" curvas dos diferentes estágios de crescimento observa-se variação da pO_2 ótimo para o sistema nitrogenase durante o ciclo de crescimento da esquerda (início log) para a direita (fim fase log) indicando o aumento da tolerância ao O_2 quando quase toda a glucose foi consumida. A pO_2 ótima encontrada para a redução de acetileno nas condições do experimento foi de 1,66% O_2 na fase gasosa no início da fase log aumentando para 3,25% no final da mesma fase.

Comparando o N-total fixado (método microkjeldahl) e a redução de acetileno (cromatografia gasosa) baseando-se na relação teórica 3:1 ($C_2H_2:N_2$) (Tabela 1) pode-se observar que parte dos valores do N_2 fixado obtidos pela redução de acetileno estão subestimados. Na quantificação de N fixado pelo método da redução de acetileno, através da conversão teórica da razão 3:1 para $C_2H_2:N_2$, a atividade real da nitrogenase para a redução de N_2 não é considerada. Isso porque concentrações normais de C_2H_2 para testes de redução quando o N_2 é o substrato inibem a produção de H_2 ; além de alguns elétrons serem utilizados para reduzir H^+ a H_2 (Rivera-Ortiz e Burris, 1975).

4.5. CONSUMO DE O_2 PELAS CÉLULAS

O consumo de O_2 foi determinado conjuntamente nos experimentos da atividade da nitrogenase por cromatografia gasosa. Este consumo variou durante o ciclo de crescimento (Figura 6C) e acompanha as taxas de redução de acetileno. A taxa máxima de consumo de O_2 obtida ($Q_{O_2} = 9,6 \text{ umol/h/mg proteína}$) é similar ao Q_{O_2} determinado por Okon et al., (1976 b) que foi na ordem de 6,2 $\text{umol/h/mg proteína}$ para o *A. brasilense* e representa 10-30% de Q_{O_2} encontrado normalmente para *Azotobacter*. Por outro lado as taxas respiratórias do *Azospirillum* spp são similares as apresen-

TABELA 1 - Comparação entre N-total fixado e redução de acetileno baseada na relação teórica $3C_2H_2:1N_2$. O N-total e proteína foram determinadas diretamente nas células. A atividade da nitrogenase (redução acetileno) foi determinada em células guardadas em nitrogênio líquido.

TEMPO DE INCUBAÇÃO DA CULTURA (h)	FASE CRESCIMENTO	D.O. E= 560 nm	AUMENTO DO N-TOTAL NO PERÍODO DO $\mu gN/ml$	PROTEÍNA MÉDIA NO PERÍODO $\mu g/ml$	N-TOTAL (MICRO-KJELDAHL) μmol N FIXADO/h/ mg PROTEÍNA	REDUÇÃO ACETILENO $\times 3$ $\downarrow$ N ₂ FIXADO μmol C ₂ H ₄ /h/mg PROTEÍNA
20	Início log	0,3	6,46	17,97	0,64	0,43
27	Meio log	0,9	15,43	58,40	1,35	0,76
29	Fim log	1,4	35,00	137,76	4,53	0,99
31:45	Fim lcg	1,7	11,92	222,24	1,39	1,05
33	Estacionária	1,6	0,75	251,16	0,67	0,81
33:15	Estacionária	1,5	0,16	278,75	0,08	0,60

tadas pelos bacteróides de *Rhizobium* (Ruiz-Argueso et al., 1979), que também não possui proteção respiratória da nitrogenase.

4.6. CORRELAÇÃO ENTRE HIDROGENASE, NITROGENASE, CONSUMO E TOLERÂNCIA AO O_2

A atividade da hidrogenase das células pode ser comparada com a concentração de glucose no meio (Figura 6 A). observa-se atividade da hidrogenase três vezes maior quando a concentração de glucose se torna limitante no meio. Walker & Yates (1978) observaram a atividade da hidrogenase ("uptake-hydrogenase") em culturas "batch" de *Acetobacter chroococcum* coletadas no final da fase logarítmica e em cultura contínua com fonte de carbono limitada, embora a hidrogenase nesses experimentos não fosse suficiente para reciclar todo o H_2 evoluído pela nitrogenase. Neste trabalho, em experimentos realizados com células de *Azospirillum* também de cultura "batch" não foram detectados tragos de evolução de H_2 em nenhum estágio de crescimento indicando que todo o H_2 foi reciclado mesmo no início da fase logarítmica onde a atividade da hidrogenase era bem mais baixa. O aumento da atividade da hidrogenase em direção ao fim da fase de crescimento pode ser indicação do ajuste ao aumento da atividade da nitrogenase a fim de reciclar o H_2 produzido. As atividades da hidrogenase e nitrogenase seguem padrões similares (Figura 6 A e 6 B); entretanto a atividade da hidrogenase do *Azospirillum* parece ser excessiva para somente atuar na reciclagem do H_2 produzido pela nitrogenase. E é comparável às atividades observadas nas bactérias autotróficas que utilizam hidrogênio para obter energia (Berndt et al., 1976; Aragno & Schlegel, 1978). O aumento da atividade específica da nitrogenase com o aumento da atividade da hidrogenase no final da fase logarítmica é acompanhado pelo aumento da eficiência da fixação N_2 (Figura 6 B). A curva da tolerância ao O_2 (Figura 6C)

segue o mesmo padrão da atividade da hidrogenase (Figura 6 A); indicando que esta enzima atua na remoção do oxigênio do sítio de fixação ou protege a nitrogenase contra o O_2 , como já demonstrado para *Azotobacter* (Walker & Yates, 1978) e para os bacteróides de *Rhizobium* (Ruiz-Arquëso et al., 1979). Desse modo pode-se levantar a hipótese que a hidrogenase atua para aumentar a tolerância da nitrogenase ao O_2 . Os dados apresentados para *A. lipoferum* neste trabalho suportam o ciclo de H_2 proposto para *A. chroococcum* (Walker & Yates, 1978). Quando a glucose ou seus produtos de decomposição tornam-se limitantes no habitat natural mais H_2 parece ser produzido e reciclado o que não ocorre com culturas contínuas de *K. pneumoniae* (Hill et al., 1976 d) com fonte limitada de carbono. O fato do *Azospirillum* apresentar taxa respiratória bem menor em relação ao *Azotobacter* indica substituição parcial da proteção respiratória da nitrogenase através de uma hidrogenase ativa (Figura 6 A) que ao mesmo tempo que recicla o H_2 gera ATP e ainda escoar o O_2 do sítio da nitrogenase. Estes processos podem ser responsáveis pela maior eficiência da fixação de N_2 nestas bactérias.

5. CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, pode-se salientar que:

- a) O nitrogênio fixado pelas células atingiu valor máximo (aproximadamente $70 \mu\text{g N/ml}$) no início da fase estacionária correspondendo a 13,8% do peso celular. O acúmulo do nitrogênio fixado acompanhou a curva de crescimento mas com tempo de duplicação mais curto (3,3 h) que o tempo de geração da bactéria (5,3 h). O nitrogênio restante foi excretado. No início da fase log a eficiência foi de 20 mg N fixado g^{-1} glucose consumida atingindo 48 no final da mesma fase. Do nitrogênio fixado pelas células 25% foi excretado para o meio até o final da fase log permanecendo mais ou menos estável na fase estacionária.

- b) A atividade da hidrogenase foi observada em todos os estágios de crescimento do *A. lipoferrum* e não houve evolução de H_2 . A atividade da "uptake hydrogenase" aumentou em direção ao final da fase log quando a glucose tornou-se limitante no meio. A curva da atividade da nitrogenase e da tolerância ao oxigênio com o tempo de incubação apresentaram comportamento similar ao da hidrogenase indicando que esta enzima atua na remoção do O_2 do sítio de fixação de N_2 protegendo a nitrogenase.
- c) As "bell shaped" curvas demonstraram a extrema sensibilidade da nitrogenase ao O_2 . A concentração de O_2 na fase gasosa tolerada no fim da fase logarítmica foi duas vezes maior que no início. O consumo Máximo de O_2 obtido foi $QO_2 = 9,6 \text{ mmol/h/mg proteína}$ e representa aproximadamente 30% do valor calculado para o *Azotobacter*. Isto indica que a sua taxa respiratória não é suficiente para atuar como mecanismo protetor da nitrogenase contra o O_2 .

6. RESUMO

As mudanças fisiológicas durante o ciclo de Crescimento da bactéria fixadora de N_2 *Azospirillum lipoferum* foram estudadas em cultura "batch" a pH 6,8-7,0 e 35°C usando como fonte de carbono glucose a 0,2%, N_2 como fonte de nitrogênio e pO_2 ótima (0,002-0,003 atm). A taxa de crescimento foi de $\mu=0,13\ h^{-1}$ e o tempo de geração $td= 5,3\ h$. A eficiência da fixação de N_2 , atividade da nitrogenase, consumo e tolerância ao O_2 e atividade da hidrogenase aumentaram até o final da fase logarítmica. A eficiência encontrada foi de 20 mg N/g glucose consumida no início da fase logarítmica e de 48 no final da mesma fase. Cerca de 25% do N-total fixado foi excretado para o meio de cultura. Foi verificada alta atividade da hidrogenase oxidativa não sendo detectada evolução de H_2 em nenhum estágio de crescimento.

7. SUMMARY

Changes in the physiology of nitrogen-fixing *Azospirillum lipoferum* were observed during the whole growth cycle in batch culture at pH 6.8-7.0 and 35°C using glucose (0.2%) as carbon source, N₂ as nitrogen source and optimal pO₂ for nitrogen fixation (0.002-0.003 atm). The relative growth was $\mu = 0.13 \text{ h}^{-1}$ and the doubling time 5.3 hours. Oxygen consumption and tolerance, nitrogenase activity, uptake hydrogenase activity and the efficiency of nitrogen fixation increased toward the end of log phase. The observed efficiency was 20 mg total nitrogen fixed per g glucose consumed at the early log phase and increased to 48 mg N/g at the late log phase. About 25% of the total nitrogen fixed was recovered in the culture supernatant. High uptake hydrogenase activity accompanied maximal rates of acetylene reduction. Hydrogen evolution was not detected at any growth stage.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, K. & SHANMUGAM, K.T. 1977. Energetics of biological nitrogen fixation: determination of the ratio of formation of H_2 to NH_4^+ catalysed by nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae* in vivo. J. Gen. Microbiol. 103: 107-122.
- ARAGNO, M. & SCHLEGEL, H.G. 1978. Physiological characterization of the hydrogen bacterium *Aquaspirillum autotrophicum*. Arch. Microbiol. 116: 221-229.
- BALANDREAU, J. & VILLEM IN, G. 1973. Fixation biologique de l'azote moleculaire en savane de lampto (Basse Cote d'Ivoire) resultats preliminares. Rev. Ecol. Biol. Sol. 10: 25-33.
- BALDANI, V.L.D. & DÖBEREINER, J. 1979. Host plant especificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biol. Biochem. (no prelo).

- BECKING, J.H. 1963. Fixation of molecular nitrogen by an aerobic *Vibrio* or *Spirillum*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 29: 326.
- BELJERINCK, M.W. 1922. *Azotobacter chroococcum* als indikator van de vruchtbaarheid van den grond. *Koninkl. Ned. Akad. Wetenschap., Verslag Gewone Vergader. Afdel. Nat.* 30: 431-438.
- BEIJERINCK, M.W. 1925. Über ein *Spirillum*, Welches freien. Stickstoff binden kann, *Zentralbl. Bakteriol. Parasitkd. Abt. II* 63: 353-359.
- BENEMANN, J.R. & WEARE, N.W. 1974 a. Nitrogen fixation by *Anabaena cylindrica*. III. Hydrogen-supported nitrogenase activity. *Arch. Microbiol.* 101: 401-408.
- BENEMANN, J.R. & WEARE, N.W. 1974b. H₂ evolution by N₂-fixing *Anabaena cylindrica*. *Science* 184: 174.
- BERGERSEN, F.J. 1963. The relationship between hydrogen evolution, hydrogen exchange, nitrogen fixation and applied oxygen tensions in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sic.* 16: 669-680.
- BERGERSEN, F.J. & GIBSON, A.H. 1978. Nitrogen fixation by *Rhizobium* spp. in laboratory culture media. *Basic Life Sciences*, 10: 263-274.
- BERNDT, H., OSTWAL, K.P., LALUCAT, J., SCHUMANN, C., MAYER, F., SCHLEGEL, H.G. 1976. Identification and physiological characterization of the nitrogen fixing bacterium *Corynebacterium autotrophicum* GZ 29. *Arch. Microbiol.* 108: 17-26.

- BIGGINS, D.R. & POSTGATE, J.R. 1969. Nitrogen fixation by cultures and cell-free extracts of *Mycobacterium flavum* 301. J. Gen. Microbiol. 56: 181-193.
- BORKOWSKY, J.D. & JOHNSON, M.J. 1967. Long-lived steam sterilisable membrane probes for dissolved oxygen measurement. Biotech. Bioeng. 9: 635-639.
- BOTHE, H., TENNEGKEIT, J., EISBRENNER, G. & YATES, M.G. 1977a. The hydrogenase-nitrogenase relationship in the blue-green algae *Anabaena cylindrica*. Planta 133: 237-242.
- BOTHE, H., TENNEGKEIT, J. & EISBRENNER, G. 1977b. The utilization of molecular hydrogen by the blue-green algae *Anabaena cylindrica*. Arch. Microbiol. 114: 43-49.
- BOTHE, H., DISTLER, E. & EISBRENNER, G. 1978. Hydrogen metabolism in blue-green algae. Biochemie. In Press.
- BREED, R.S., MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. 1957. Berg y's Manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, U.S.A.
- BREMNER, J.M. 1965. Total nitrogen. In: Methods of soil analysis (C.A. Black, ed.) pp. 1149-1178. Am. Soc. Agron. Madison.
- BROTONEGORO, S. 1974. Nitrogen fixation and nitrogenase activity of *Azotobacter chroococcum*. Thesis, Wageningen p-42.
- BÜLOW, J.F.W. VON & DÖBEREINER, J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72: 2389-2393.

- BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, U.S.A.
- BURRIS, R.H., OKON, Y. & ALBRECHT, S.L. 1976. Properties and reactions of *Spirillum lipoferum*. Intern. Symp. Environmental Role Of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria, Uppsala, Suécia.
- BURRIS, R.H., ALBRECHT, S.L. & OKON, Y. 1978. Physiology and Biochemistry of *Spirillum lipoferum*. Basic Life Sciences 10:303-315.
- CARTER, K.R., JENNINGS, N.T., HANUS, J. & EVANS, H.J. 1978. H₂ evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. Can. J. Microbiol. 24: 307-311.
- CATALDO, D.A., HAROON, M., SCHRADER, L.E., YOUNGS, V.L. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun. Soil. Sci. Plant Anal-6: 71-80.
- CHANCY, A.L., MARBOCK, E.P. 1962. Stimulation of NH₄ by indophenol reaction. Clin. Chem. 8: 130-132.
- DADAY, A., PLATZ, R.A. & SMITH, G.D. 1977. Anaerobic and aerobic hydrogen gas formation by the blue-green algae *Anabaena cylindrica*. Appl. and Environ. Microbiol. 34: 478-483.
- DALTON, H. & POSTGATE, J.R. 1969. Growth and physiology of *Azotobacter chroococcum* in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 56: 307-319.

- DAY, J.M. & DÖBEREINER, J. 1976. Physiological aspects of N_2 -fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. Soil. Biol. Biochem. 8: 45-50.
- DAY, J.M., NEVES, M.C.P. & DÖBEREINER, J. 1975. Nitrogen fixation on the roots of tropical forage grasses. Soil. Biol. Biochem. 7: 107-112.
- DIXON, R.O.D. 1967. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. Ann. Bot. N.S. 31: 179-188.
- DIXON, R.O.D. 1968. Hydrogenase in pea root nodules bacteroids. Arch. Microbiol. 62: 272-283,
- DIXON, R.O.D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Arch. Microbiol. 85:193-201.
- DÖBEREINER, J. 1977. Physiological aspects of N_2 fixation in grass-bacteria associations. In: Recent developments in nitrogen fixation. Proc. Second Intern. Symp. Salamanca 1976. (Newton, W., Postgate, J-R., Rodriguez-Barrueco, C. ed.) Academic Press Inc. London.
- DÖBEREINER, J. 1978. Influence of environmental factors on the occurrence of *Spirillum lipoferum* in soils and roots. Environmental Role of Nitrogen-fixing blue green algae and asymbiotic bacteria. Ecol. Bull (stockholm) 26: 343-352.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. 1973a. Dinitrogen fixation in the rhizosphere of tropical grasses. IBP conference "Nitrogen Fixation and the Biosphere", Edinburgh (Ed. W.D.P. Stewart), Vol. 1, in Press, Cambridge University Press. Published 1975.

- DÖBEREINER, J., DAY, J.M. & DART, P.J. 1973b. Fixação de nitrogênio na rizosfera de *Paspalum notatum*, e da cana de açúcar. Pesq-Agropec. 8: 153-157.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. 1974. Associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com raízes de gramíneas. Reunião Latino Americana do Trigo. Porto Alegre, 21-28 Outubro, 1974.
- DÖBEREINER, J. & DAY, J.M. 1975. Associative symbioses in tropical grasses: Characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites, p. 518-538. In Newton, W.E. & Nyman, C.J. (ed.) 1st Inter. Symp. Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman.
- DÖBEREINER, J., DAY, J.W. & BÜLOW, J.F.W. VON. 1975. Associations of nitrogen-fixing bacteria with roots of forage grass and grain species. Proceedings of the 2nd International Winter wheat conference (Zagreb), Univ. Nebraska Agric. Exp. Stn. pp. 221-237.
- DÖBEREINER, J., MARRIEL, I.E. & NERY, M. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum*. Beijerinck. Can. J. Microbiol. 22: 1464-1473.
- DROZD, J. & POSTGATE, J.R. 1970a. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 63: 63-73.
- DROZD, J. & POSTGATE, J.R. 1970b. Interference by oxygen in the acetylene-reduction test for aerobic nitrogen-fixing bacteria. J. Gen. Microbiol. 60: 427-429.

- EISBRBNNER, G., DISTLER, E., FLOENER, L. & BOTHE, H. 1978. The occurrence of hydrogenase in blue-green algae. Arch. Microbiol. Submitted.
- ELNERICH, C., GAUTHIER, D., HOUMARD, J. 1978. Regulation of nitrogenase biosynthesis in *Azospirillum brasilense*. In: Proc. Stebbins-Kettering Intern. Symp. Nitrogen Fixation, Wisconsin, p. 1.
- EVANS, H.J., RUIZ-ARGÜESO, T., JENNINGS, N.T. & HANUS, J. 1977. Energy coupling efficiency of symbiotic nitrogen fixation. In A. Hollaender (ed.), Genetic Engineering for Nitrogen Fixation pp. 333-354.
- EVANS, H.J., RUIZ-ARGÜESO, T. & RUSSEL, S.A. 1978. Relationship between hydrogen metabolism and nitrogen fixation in legumes. Basic Life Sciences 10: 209-222.
- HARDY, R.W.F. & KNIGHT, E. Jr. 1968, The biochemistry and postulated mechanisms of nitrogen fixation. In: Reinhold, L.: Progress in Phytochemistry, pp. 407-489. New York, Wiley, 1968.
- HATCH, M.D. & SLACK, C.R, 1970. Photosynthetic CO₂-fixation pathways. Annual Review of plant physiology. 21: 141-162.
- HILL, S., DROZD, J.W. & POSTGATE, J.R. 1972. Environmental effects on the growth of nitrogen fixing bacteria. J. Appl. Chem. Biotechnol. 22: 541-558.
- HILL, S. 1976a. Report for period 21.11.75 to 20.05.76. Programme for International Cooperation in Training and Basic Research on Nitrogen Fixation in the Tropics.

- HILL, S. 1976b. Influence of atmospheric oxygen concentration on acetylene reduction and efficiency of nitrogen fixation in intact *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 93: 335-345.
- HILL, S. 1976c. The apparent ATP requirement for nitrogen fixation in growing *Klebsiella pneumoniae*. J. Gen. Microbiol. 95: 297-312.
- HINE, P.W. & LEES, H. 1976. The growth of nitrogen-fixation *Azotobacter chroococcum* in continuous culture under intense aeration. Can. J. Microbiol. 22: 611-618.
- HOCH, G.E., LITTLE, H.N; & BURRIS, R.H. 1957. Hydrogen evolution from soybean root nodules, Nature 179: 430-431.
- HOCH, G.E., SCHNEIDER, K.C. & BURRIS, R.H. 1960. Hydrogen evolution and exchange and conversion of N_2O into N_2 by soya bean root nodules. Biochim. Biophys. Acta 37: 273-279.
- HYNDMAN, L.A., BURRIS, R.H. & WILSON, P.W. 1953. Properties of hydrogenase from *Azotobacter vinelandii*. J. Bacteriol. 65: 522-531.
- JENSEN, H.L. 1953. *Azotobacter* as a crop inoculant. In: The growth of nitrogen-fixing *Azotobacter chroococum* in continuous culture under intense aeration. Hine, P.W. & Lees, H. Can. J. Microbiol. 22: 611-618.
- JOHNSON, M.J., BORKOWSKY, J. & ENGBLOM, C. 1964. Steam sterilizable probes for dissolved oxygen measurement. Biotech. Bioeng. 6: 457-468.

- KEISTER, D.L. 1975. Acetylene reduction by pure cultures of *Rhizobium*. J. Bact. 123: 1265-1268.
- KRIEG, N.R. 1976. Biology of the chemoheterotrophic spirilla. Bacteriol. Rev. 40: 55-115.
- KRIEG, N.R. & TARRAND, J.J. 1978. Taxonomy of the root-associated *nitrogen-fixing bacterium Spirillum lipoferum*. Basic Life Sciences, 10: 317-333.
- KUMARI, L.M., KAVIMANDAN, S.K. & SUBBA-RAO, N.S. 1976. Occurrence of nitrogen fixing *Spirillum* in roots of rice, sorghum, maize, and other plants. Indian J. Exp. Biol. 19: 638-639.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, Q.L., RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- MAGALHÃES, F.M.M., PATRIQUIN, D.G. & DÖBEREINER, J. 1979. Infection of field grown maize with *Azospirillum* spp. Rev. Bras. Biol-39(3) (In Press).
- MCCRAE, R.E., HANUS, J. & EVANS, H.J. 1978. Properties of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 384-390.
- MULDER, E.G. & BROTONEGORO. 1974. Free living nitrogen-fixing bacteria. In The Biology of Nitrogen Fixation, Chapter 3. Edited by A. Quispel. North-Holland Publishing Company, Amsterdam. pp. 37-85.
- NELSON, N. 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. Biol. Chem. 153: 375-380.

- NELSON, L.M. & KNOWLES, R. 1978. Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation e denitrification by *Azospirillum brasiliense* in continous culture. Can J. Microbiol. (In Press).
- NEVES, M.C.P., NERY, M. & DAY, J.M. 1976. Efeito da temperatura na fixação de nitrogênio de estirpes de *Spirillum* isoladas de *Digitaria* e milho. XV Congr. Brasil. Cien. Solo, Campinas.
- NEYRA, C.A. & BERKUM, P. VAN. 1977. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol. 23: 306-310.
- NEYRA, C.A. & DÖBEREINER, J. 1977. Nitrogen fixation in grasses. Adv. Agron. 29: 1-38.
- NEYRA, C.A., DÖBEREINER, J., LALANDE, R. & KNOWLES, R. 1977. Denitrification by N₂-fixing *Spirillum lipoferum*. Can. J. Microbiol. 23: 300-305.
- OKON, Y., ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1976a. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 125: 1248-1254.
- OKON, Y., ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1976b. Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. J. Bacteriol. 128:592-597.
- OKON, Y., HOUCHINS, J.P., ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.H. 1977a. The growth of *Spirillum lipoferum* at constant pressures of oxygen and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. J. Gen. Microbiol. 98: 87-93.

- OKON, Y., ALBRECHT, S.L. & BURRIS, R.B. 1977b. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Appl. Environ. Microbiol. 33: 85-88.
- PETERSON, R.B. & BURRIS, R.H. 1978. Hydrogen metabolism in isolate heterocysts of *Anabaena* 7120. Arch. Microbiol. 116: 125-132.
- PHELPS, A.G. & WILSON, P.W. 1941. The occurrence of hydrogenase in nitrogen fixing organisms. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 47: 473-476.
- POSTGATE, J. 1971a. Relevant aspects of the physiological chemistry of nitrogen fixation. Symp. Soc. Gen. Microbiol. 21: 287-307.
- POSTGATE, J.R. 1971b. Fixation by free-living microbes: Physiology In the chemistry and biochemistry of nitrogen fixation (Postgate, J.R. (ed.)) pp. 161-190, Plenum Press, London.
- POSTGATE, J.R. 1974. Pre requisits for biological nitrogen fixation in free-living heterotrophic bacteria. In the biology of nitrogen fixation (Quispel, A. ed) pp. 661-686, North Holland publishing Co., Amsterdam-New York.
- RINAUDO, G., BALANDREAU, J. & DOMMERGUES, Y. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. In: Nitrogen Fixation in Natural and Agricultural Habits. Plant Soil Spec. 471-479.
- RIVERA-ORTIS, J.M. & BURRIS, R.H. 1975. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. J. Bacteriol. 123: 537-545.

- RUIZ-ARGÜESO, T., HANUS, J. & EVANS, H.J. 1978. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *Rhizobium leguminosarum*. Arch. Microbiol. 116: 113-118.
- RUIZ-ARGÜESO, T., EMERICH, D.W. & EVANS, H.L. 1979. Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. J. Bacteriol. 137: 824-829.
- SAMPAIO, M.J.A., VASCONCELOS, L. & DÖBREINER, J. 1978. Characterization of three groups within *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria. 26: 364-365.
- SCHMIDT-LORENZ, W., RIPPEL-BALDES, A. 1997. Wirkung des Sauerstoff-Partialdrucks auf Wachstum und Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum* Beij. Arch. Mikrobiol. 28: 45-68.
- SCHRÖSDER, M. 1932. Die assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitkd. Abt.II 85: 177-212.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. 1976. Hydrogen evolution: A major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 73: 1207-1211.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. 1977. The relationship of hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In W.E. Newton, J.R. Postgate and C. Rodrigues-Barrueco (eds.) Recent developments in Nitrogen Fixation, pp. 469-487. Academic Press, London.

- SCOTT, D.B., FARNDEN, K.J.F. & ROBERTSON, J.G. 1976. Ammonia assimilation in lupin nodules. *Nature* 263: 703-705.
- SMITH, R.L., SCHANK, S.C., BOUTON, J.H. & QUESENBERRY, K.H. 1976a. Yield increases of tropical grasses after inoculation with *Spirillum lipoferum*. Intern. Symp. Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria, Uppsala, Suécia.
- SMITH, L.A., HILL, S. & YATES, M.G. 1976b. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature*. 262: 209-210.
- STEWART, W.D.P. 1969. Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living micro-organisms. *Proc. Roy. Soc. B* 172: 367-388.
- STEWART, W.D.P. 1976. Nitrogen fixing algal-plant symbiosis Intern. Symp. Environmental Role of Nitrogen-fixing Blue-green Algae and Asymbiotic Bacteria, Uppsala; Suécia.
- TARRAND, J.J. & KRIEG, N.R. 1977. Taxonomic studies of *Spirillum lipoferum*. Am. Soc. Microbiol. 77th Annual Meeting. Abstr.
- TARRAND, J.J., KRIEG, N.R. & DÖBEREINER, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum*. gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microb.* 24: 967-980.
- TEL-OR, E., LUIJK, L.W. & PACICER, L. 1977. An inducible hydrogenase in cyanobacteria enhances N₂ fixation. *FEBS. Lett.* 78: 49-53.

- TEL-OR, E., LUIJK, L.W. & PACKER, L. 1978. Hydrogenase in N_2 -fixing cyanobacteria. Arch. Biochem. Biophys, 185: 185-194.
- TEMPEST, D.W. 1970. The continuous cultivation of micro-organisms. I. Theory of the chemostat. In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. ed. Methods in Microbiology, Academic Press, 2: 259-276.
- TYLER, E.M., MILAM, J.M. & ZUBERER, D.A. 1978. Taxonomy of the diazotroph of tropical grasses called *Spirillum lipoferum*. Basic Life Sciences. 10: 349-350.
- VARGAS, M.A.T. 1977. Effect of oxygen on N_2 fixation by *Spirillum lipoferum*. Th. M.S., Univ. of Wisconsin.
- WALKER, C.C. & YATES, M.G. 1978. The hydrogen cycle in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum*. Biochimie. 60: 225-231.
- WILSON, P.W. 1958. Asymbiotic nitrogen fixation. In: W. Ruhland (ed.). Encyclopedia of plant physiology pp. 9-47, Springer-Verlag, Berlin.
- WINOGRADSKY, S. 1949. Microbiologie du Sol Masson et Cie E'diteurs. 861. p.
- YATES, M.G. 1970. Control of respiration and nitrogen fixation by oxygen and adenine nucleotides in N_2 -grown *Azotobacter chroococcum*. J. Gen. Microbiol. 60: 393-401.
- YATES, M.G. 1977. Physiological aspects of nitrogen fixation. In: Recent developments in nitrogen fixation (Newton, W., Postgate, J.R. and Rodriguez-Barrueco, C., eds.) pp. 219-270, Acad. Press, London.

- YATES, M.G.k & JONES,C.W. 1974. Respiration and nitrogen fixation in *Azotobacter*. Adv. Microbiol. Physiol., 11: 97-135.
- YATES, M.G. & WALKER, C.C. 1979. Hydrogenase activity and hydrogen evolution by nitrogenase in nitrogen-fixing *Azotobacter chroococcum* under different nutrient limitations. In: Proc. Steenbock-Kettering International Symposium on Nitrogen Fixation. In Press.
- YOSHINARI, T. & KNOWLES, R. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem. Biophys. Res. Comm. 69: 705-710.