

Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas

Ana Paula Guimarães

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO-2010**

Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas

Ana Paula Guimarães

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Orientador: Dr. Arnaldo Rocha Façanha
Co-orientador: Dr. Robert Michael Boddey

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA / UENF 053/2010

Guimarães, Ana Paula

Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas / Ana Paula Guimarães. – 2010.

86 f. : il.

Orientador: Arnaldo Rocha Façanha

Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2010.

Bibliografia: f. 72-86.

1. *Bradyrhizobium spp.* 2. Bactérias endofíticas 3. Bombas de prótons I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 571.2

Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ^{15}N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas

Ana Paula Guimarães

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal”.

Aprovada em 24 de março de 2010.

Comissão Examinadora:

Dr. Segundo Urquiaga - Embrapa Agrobiologia

Dra. Anna Okorokova Façanha – UENF

Dr. Robert Michael Boddey - Embrapa Agrobiologia

Dr. Arnaldo Rocha Façanha – Orientador – UENF

Dedicatória

Aos meus amados pais, Mário e Alcina e à Tia Maria, pela dedicação, educação, oportunidades, incentivo, apoio e amor com que fui criada;

*Aos meus irmãos André e Rebeca por seu amor e amizade.
Por tudo o que fizeram por mim, este trabalho é dedicado a vocês.*

Agradecimentos

A Deus, por conseguir mais essa realização, pelas experiências que vem me permitindo passar e por ter sempre abençoado o meu caminho.

A minha família que sempre esteve presente e que sempre me apoiou.

Aos pesquisadores Arnaldo R. Façanha, Robert M. Boddey, Bruno J. R. Alves e Segundo Urquiaga pelo apoio, confiança, paciência, amizade e, sobretudo, pelo exemplo de competência profissional e comprometimento com a pesquisa. As sugestões e atenção de vocês sempre fizeram diferença.

A Dra Anna O. Façanha pela participação na banca e preciosas sugestões para a conclusão do trabalho.

A UENF e ao curso de Pós Graduação em Produção Vegetal pela oportunidade de realização do curso, pela infraestrutura fornecida e pela concessão da bolsa.

Aos professores da UENF Ricardo Bressan-Smith, Eliemar Compostrini, Jurandi G. de Oliveira e Lev A. Okorokov por terem cedido seus laboratórios para o trabalho. Aos funcionários Mauricio, Gerusa, Geovana e Beatriz pelo seu grande carinho, alegria e disposição em sempre ajudar.

Aos alunos do LMGV e do CBB, pelo convívio e aprendizado durante este tempo.

As amigas Crizinha e Yasca com quem morei em Campos e a tantos outros que me receberam em suas casas pelo companheirismo, carinho e compreensão com que fui tratada durante todo este período.

Aos professores, funcionários e alunos do departamento de bioquímica da UFPR, pela grande contribuição ao trabalho, pela atenção e carinho com que receberam: Dr Fábio Pedrosa, Dr Emanuel Maltempi, Dr Luciano Huergo, Dra Giovanna, Dra Luiza, Valter de Baura e Roseli Prado, muito obrigada.

Aos colegas do laboratório de nutrição mineral da UFRRJ pelo auxílio nas preparações de frações microssomais.

A Embrapa Agrobiologia e aos funcionários Ernane, Rosinaldo, Selmo, Roberto Andrade, Altiberto, Serginho, Aurélio, Roberto Carlos, Mazinho, Carlinhos, Amarildo, Claudinho, Luis Carlos, Lúcio, Wilson, Jorge, Carmelita e João Andrade pelo alegre convívio e ajuda indispensáveis, meus sinceros agradecimentos.

Ao Roberto Grégio pelo grande empenho na construção da nossa “Glove Box” e pela amizade.

Ao Geraldo Baeta por sua disposição em sempre ajudar e humor que deixa nossos dias mais alegres.

Aos pesquisadores do laboratório de Gramíneas e Genética e Bioquímica por me receberam em seus laboratórios para realização de parte do trabalho.

Aos guardas da portaria por ligarem o “shaker” de madrugada quando faltava luz.

Aos amigos Patrícia, Cláudia e Ednaldo pelo incentivo.

Aos novos e velhos colegas dos laboratórios de Gramíneas, Genética e Bioquímica e Ciclagem de Nutrientes: Marivaine, Dani, Joilson, Lia, Gabi, Erineudo, Sandy, Danilo, Germam, Ricardo, Patty, Esdras, Paulo, Leona, Péricles, Helma, Carlos, Juliano, Rafael Fiusa, Fernando, Sandra, Débora, Ana Carolina, Caroline, Seleno, Anderson, Elisa e Natália, pelo convívio e ajuda.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

1. RESUMO GERAL	xi
2. ABSTRACT	xiii
3. INTRODUÇÃO GERAL	1
4. REVISÃO DE LITERATURA	8
4.1 Importância da FBN na cultura da soja e na rotação de culturas.....	8
4.2 Métodos para quantificação da FBN.....	10
4.3 Mecanismo de redução de N ₂	13
4.3.1 Hidrogênio	15
4.3.2 Sensibilidade da nitrogenase ao O ₂	16
4.4 Metabolismo da FBN.....	20
4.4.1 Amônia	21
4.5 Regulação da fixação de N ₂	22
4.5.1 Inibição da FBN em meio livre de N por organismos fixadores de N ₂	22
4.5.2 Regulação da fixação de N ₂ em simbiose com plantas	23
4.6 Purificação da Nitrogenase	25
4.7 Bombas de Prótons.....	25
5. CAPÍTULO 1- Estudo do fracionamento isotópico no processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) para o aprimoramento da técnica de quantificação da FBN por abundância natural de ¹⁵N	29
5.1 INTRODUÇÃO	34
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
5.2.1 Ensaio com bactérias endofíticas	36
5.2.2 Atividade de Redução de Acetileno (ARA)	37
5.2.3 Quantificação de Proteína Total	38
5.2.4 Avaliação do fracionamento isotópico durante o processo da FBN de bactérias diazotróficas.	38
5.2.5 Ensaio com extratos bruto e purificado de nitrogenase de nódulos de soja para avaliação do fracionamento isotópico de N ₂ durante o processo de FBN.	39
5.2.6 Determinação da Atividade da Nitrogenase	39
5.2.7 Preparo do extrato bruto (livre de células) de <i>Azospirillum brasilense</i> (FP 2).....	40

5.2.8	Preparo do extrato bruto (livre de células) de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e de <i>B. elkanii</i>	40
5.2.9	Preparação dos bacteróides.....	41
5.2.10	Preparação dos bacteróides e dos extratos livre de célula (extrato bruto)	41
5.2.11	Purificação por coluna DEAE celulose.	42
5.2.12	Atividade de Redução de Acetileno (ARA).	42
5.2.13	Quantificação de Proteína Total.	43
5.2.14	Fracionamento isotópico durante o processo da FBN.	43
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.3.1	Atividade da nitrogenase em bactérias diazotróficas.....	44
5.3.2	Abundância natural de ¹⁵ N em células intactas de bactérias endofíticas durante o processo da FBN.....	45
5.3.3	Fracionamento isotópico em extratos da nitrogenase	48
5.3.4	Regulação da nitrogenase de <i>Azospirillum brasilense</i> (FP 2)	49
5.4	CONCLUSÃO	52
6.	CAPÍTULO 2- Influência das bombas de H⁺ sobre a eficiência energética da FBN em plantas de soja inoculadas com <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i>.....	53
6.1	INTRODUÇÃO	56
6.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	58
6.2.1	Isolamento de vesículas de mitocôndria, plasmalema e tonoplasto	59
6.2.2	Dosagem de proteína	59
6.2.3	Determinação da atividade da F-ATPase.....	59
6.2.4	Determinação das atividades da P - H ⁺ -ATPase, V - H ⁺ ATPase e H ⁺ -PPase	60
6.2.5	Monitoramento do gradiente de prótons H ⁺ -ATPase, da H ⁺ - V-ATPase e H ⁺ -PPase	61
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.3.1	Produção de matéria fresca.....	62
6.3.2	Efeito da inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> sobre a atividade da F-ATPase	63
6.3.3	Efeito da inoculação com estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e	

<i>B. elkani</i> sobre a atividade da P-ATPas, V-ATPase e V-PPase	65
6.4 CONSIDERAÇÃO FINAL	70
6.5 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

Índice de tabelas

Tabela 1 – Relação das estirpes e meios de cultura utilizados.....	36
Tabela 2 - Abundância natural de ^{15}N (‰) em peletes e pelete mais sobrenadante de bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum com 48 horas de crescimento.....	46
Tabela 3 - Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em pelete de diferentes bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum e com adição de fosfato com 48 horas de crescimento.	47
Tabela 4 - Abundância natural de ^{15}N (‰) em pelete de diferentes bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum com 48 horas de crescimento.....	48
Tabela 5: Característica das estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , utilizadas no experimento.	58
Tabela 6 - Peso fresco de nódulo de soja cv BRS 133 inoculado com estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> colhidos entre o estágio de crescimento v3/v4.....	62
Tabela 7 – Atividade hidrolítica da F-ATPase em fração mitocondrial de raízes e nódulos de plantas de soja cv BRS 133 colhidas entre o estágio de crescimento v3/v4, inoculadas com as quatro estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> recomendadas para soja no Brasil ou sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$)	64
Tabela 8 - Atividade específica da hidrólise de ATP mediada pela P-ATPase, sensível a vanadato; V-ATPase, sensível a bafilomicina; e H^+ -PPase estimulada a KCl de microssomas de raízes e nódulos de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (BR 29 e BR 96) e <i>B. japonicum</i> (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$).	66

Índice de Figuras

Figura	1:FONTE:
	http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nfix3 14
Figura 2: Atividade da nitrogenase (ARA) das estirpes padrões <i>Azospirillum brasilense</i> (CD, SP 7, SP 245), <i>Azospirillum amazonense</i> (CBamc e Y2), <i>Azospirillum lipoferum</i> (BR 17) e <i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Z 67 e Z94) em meio de cultivo.	44
Figura 3: Teste de concentração de fator de ativação da nitrogenase (Fat). Ensaio da ARA com extrato bruto de <i>A. brasilense</i> estirpe FP 2. Cada μL de Fat corresponde a $0,0866 \mu\text{g mL}^{-1}$	49
Figura 4 Acúmulo gradual da atividade da nitrogenase. ARA com extrato purificado de <i>Azospirillum brasilense</i> estirpe FP 2.	49
Figura 5: Ensaio de lise celular com French Press e N líquido. ARA com extrato bruto de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , estirpe 29 W (BR 29/SEMIA 5019) 30 min após incubação.	50
Figura 6: Atividade enzimática da enzima nitrogenase. ARA da mistura do extrato purificado de <i>B. elkanii</i> (BR29/SEMIA 5019) e de <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5080), lisadas com N líquido.	50
Figura 7: Cinética temporal da hidrólise de ATP mediada pela F-ATPase mitocondrial de raízes (A) e nódulos (B) de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (BR 29 e BR 96) e <i>B. japonicum</i> (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$).	64
Figura 8: Cinética temporal da hidrólise de ATP mediada pela P-ATPase de microsomas de raízes (A) e nódulos (B) de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com <i>Bradyrhizobium elkanii</i> (BR 29 e BR 96) e <i>B. japonicum</i> (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$).	65

Figura 9: Formação de gradiente de H^+ em fração microsomal pela P-ATPase (A e C) e V-ATPase (B e D) por variação em fluorescência de ACMA sobre a energização de microsomas de raiz (A e B) e microsomas de nódulo enriquecidos com membrana peribacteriana (C e D). Após a formação do gradiente de H^+ , concanamicina ou NH_4Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência inicial.68

Figura 10: Velocidade inicial do gradiente de prótons gerados pela P-ATPase (A) e V-ATPase (B) de vesículas isoladas de raiz e nódulos de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre o estágio v3/v4 inoculadas com *B. elkanii* (BR 29) e *B. japonicum* (BR 85)69

1. RESUMO GERAL

GUIMARÃES, Ana Paula; Eng^a Agrônoma, D.Sc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro de 2010; Bases bioquímicas do fracionamento isotópico de ¹⁵N na fixação biológica de nitrogênio e da eficiência energética do processo em diferentes estirpes de bactérias diazotróficas. Orientador: Dr. Arnaldo Rocha Façanha. Co-orientação: Dr. Robert Michael Bodley.

O objetivo geral deste trabalho foi investigar as bases científicas de uma das principais fontes de erro associadas à técnica de abundância natural de ¹⁵N para a quantificação da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Isso provem fato que as estirpes de de *Bradyrhizobium spp.* promovem diferentes graus de fracionamento do isótopo de N durante o processo de fixação de N₂, que pode estar relacionado à modulação da eficiência enegética das bombas de prótons de simbiossomas formados por diferentes estirpes. Os experimentos foram realizados para avaliar fracionamento do isótopo ¹⁵N durante BNF por diferentes bactérias endofíticas isoladas de gramíneas. Posteriormente, os nódulos de soja foram preparados para a extração e purificação de nitrogenase para os testes de redução de acetileno e abundância de ¹⁵δN. Dois experimentos foram conduzidos para investigar a relação de H⁺-ATPase com a FBN. As plantas de soja foram adubadas com nitrogênio ou com inoculação de uma estirpe de *Bradyrhizobium japonicum* ou *B. elkanii*. Os resultados em extratos de células intactas de diferentes bactérias endofíticas indicaram que não houve diferença no fracionamento isotópico de N entre estirpes da mesma espécie. O valor médio para *Herbaspirillum seropedicae* foi -2,45 ‰ e de *Azospirillum lipoferum*, -0,45 ‰. Verificou-se que dos extractos de nitrogenase preparados a partir de nódulos procedimento usando o PVP sem lavar e usar N₂ líquido para lisar os nódulos foi superior ao método convencional à medida que a atividade da nitrogenase foi maior no extrato bruto. O experimento sobre a atividade hidrolítica das ATPases da preparação dos microssomas de raízes e nódulos enriquecidos com a membrana peribacteriana contribuiu significativamente para aumentar a atividade

dessas bombas comparado ao tratamento que recebeu adubação nitrogenada. O monitoramento do gradiente de prótons mostrou que houve um maior acoplamento destas bombas nas plantas inoculadas com *B. japonicum* que com *B. elkanii*. O primeiro também apresentou a maior estimulação da H⁺-PPase utilizando PPi de forma mais eficiente como fonte de energia.

2. ABSTRACT

GUIMARÃES, Ana Paula; Agronomist, PhD; Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro; March 2010; Biochemical basis for ^{15}N isotopic fractionation of in biological nitrogen fixation and the energetic efficiency of the process in different strain of diazotrophic bacteria. Supervisor: Dr. Arnaldo Rocha Façanha; Co-supervisor: Dr. Robert Michael Boddey.

The general objective of this study was to investigate the scientific basis of one of the principal sources of error associated with the use of the ^{15}N natural abundance technique for the quantification of biological nitrogen fixation (BNF). This error arises from the fact that *Bradyrhizobium* strains promote different degrees of N isotope fractionation during the process of N_2 fixation which may be related to the modulation of the energy efficiency of the proton pumps of symbiosomes formed by the different strains. Experiments were performed to evaluate ^{15}N isotope fractionation during BNF by different endophytic bacteria isolated from grasses. Subsequently, soybean nodules were prepared for the extraction and purification of nitrogenase for assays of acetylene reduction and $\delta^{15}\text{N}$ abundance. Two experiment were conducted to investigate the relationship of H^+ -ATPase with BNF. The soybean plants were fertilized with nitrogen or inoculated with either a strain of *Bradyrhizobium japonicum* or of *B. elkanii*. The results on extracts of intact cells of the different endophytic bacteria indicated that there were no difference in N isotope fractionation between strains of the same species. The mean value for *Herbaspirillum seropedicae* was -2.45‰ and for *Azospirillum lipoferum*, -0.45‰ . It was found that for extracts of nitrogenase prepared from the nodules the procedure using PVP without washing and using liquid N_2 to lyse the nodules was superior to the conventional method in that the nitrogenase activity was higher in the crude extract. The experiment on the hydrolytic activity of the ATPases of the preparations of the microsomes of the roots and nodules enriched with the peribacteroid membrane contributed significantly to increase the activity of these pumps compared to the treatment which received N fertilizer. The monitoring of the proton gradient showed that there was a greater coupling of these pumps in

the plants inoculated with *B. japonicum* than with *B. elkanii*. The former also showed the highest stimulation of H⁺-PPase utilizing PPI as the most efficient energy source.

3. INTRODUÇÃO GERAL

A importância do processo da fixação biológica de nitrogênio (FBN) na produção agrícola do Brasil tem sido evidenciada principalmente nos avanços obtidos na cultura da soja (*Glycine max*, L.), onde tal processo tem sido melhor estudado e onde tem apresentado os melhores resultados. Estudos conduzidos na região Sul e no Cerrado mostram que no mínimo 75 % do N necessário à cultura é derivado da FBN (Alves et al., 2002, 2006). Aproximadamente, 80 % do N na parte aérea dessa cultura é retirado do campo na forma de grãos. Assim, se não fosse a grande contribuição da FBN seriam necessários enormes investimentos em adubos nitrogenados para repor o N extraído, de modo contrário as reservas N do solo, contidas na matéria orgânica do solo, seriam esgotadas em poucos anos. Como a quantidade de N da FBN é aproximadamente igual à exportada nos grãos, uma produção de ~60 milhões de toneladas (Tg) de soja, colhida em 2009, é equivalente a uma contribuição de N fixado do ar de 3,9 Tg.

Atualmente, a maioria da área plantada com soja é conduzida na forma de rotação com outras culturas e manejada sob sistema de plantio direto. Na região sul, as culturas de inverno plantadas após a soja são, entre outras, trigo (*Triticum aestivum*) e aveia branca (*Avena sativa*), e menos frequentemente adubos verdes como aveia preta (*Avena strigosa*), nabo forrageiro (*Raphanus raphanistrum*), ervilhaca (*Vicia spp.*) e tremoço (*Lupinus spp.*). Nessa região, uma prática comum é a de substituir a soja a cada um ou dois anos por milho (*Zea mays*) ou, às vezes, girassol (*Helianthus annuus*). Na região dos Cerrados a soja é normalmente seguida por uma cultura de milho (safrinha), milheto (*Pennisetum americanum*) ou sorgo (*Sorghum vulgare*). Estes sistemas de rotação ou sequências de culturas, incluindo soja, ocupam hoje aproximadamente 30 Mha, mais da metade da área sob culturas anuais, e a sustentabilidade desses sistemas vem sendo estudada através de estudos da quantificação do balanço de nutrientes tanto na região Sul (Alves et al., 2002; Zotarelli, 2005) como na região do Cerrado (Jantalia, 2005; Jantalia et al, 2006). Estudos feitos em experimentos

de longo prazo (Jantalia et al., 2003; Sisti et al., 2004; Diekow et al., 2005; Boddey et al., 2010) mostram que o N é o nutriente que mais controla os estoques de matéria orgânica do solo (MOS) em sistemas de plantio direto. Por exemplo, quando as quantidades de N exportado do sistema agrícola na forma de grãos são maiores do que o ingresso de N por FBN e/ou N fertilizante, a tendência é o solo perder MOS e, portanto, em longo prazo, a fertilidade do solo e as reservas de nutrientes diminuirão, em outras palavras – o sistema perde sua sustentabilidade.

A principal forma de reposição do N nesses sistemas é a FBN realizada pela simbiose entre o rizóbio (*Bradyrhizobium*) e a soja. A quantificação desta contribuição da FBN com exatidão é o maior desafio para avaliar o balanço do N nesses sistemas e, portanto sua sustentabilidade. Há mais de 20 anos pesquisadores da EMBRAPA vêm estudando técnicas para quantificar as contribuições da FBN às leguminosas, gramíneas e aos cereais (Boddey, 1987; Boddey et al., 1995, 2000; Alves et al., 1999). Hoje, existem somente duas técnicas consideradas confiáveis para quantificar a contribuição da FBN às leguminosas no campo: a técnica de ureídos e a da abundância natural de ^{15}N (Peoples et al., 2002). Porém, ambas as técnicas apresentam algumas desvantagens (Alves et al., 1999; Boddey et al., 2000) e parte da proposta desta pesquisa destina-se à investigação das bases científicas de uma das potenciais fontes de erro, associadas à técnica da abundância natural de ^{15}N .

O N mineral do solo é geralmente um pouco mais enriquecido em ^{15}N em comparação com a abundância deste isótopo no N_2 atmosférico. Em estudos que utilizam esta técnica, a abundância isotópica é expressa em unidades de delta (δ) ^{15}N onde:

$$\delta^{15}\text{N} = 1000 \cdot \left(\frac{\text{Átomos } \% \text{ }^{15}\text{N} \text{ da amostra} - \text{Átomos } \% \text{ }^{15}\text{N} \text{ do } \text{N}_2 \text{ do ar}}{\text{Átomos } \% \text{ }^{15}\text{N} \text{ do } \text{N}_2 \text{ do ar}} \right)$$

Nesse caso, a abundância do N_2 do ar é 0,0 partes por mil (‰). Plantas que não são capazes de obter N do ar *via* FBN (chamadas “plantas referência”), e acumulam N somente derivado do solo, normalmente apresentam tecidos com sinal positivo em $\delta^{15}\text{N}$, enquanto que plantas que dependem somente da FBN têm um sinal isotópico próximo a 0.0 ‰. Para avaliar a contribuição da FBN em leguminosas no campo é necessário medir a abundância de ^{15}N em plantas referência ($\delta^{15}\text{N}_{\text{pr}}$) e a abundância da leguminosa que se deseja estudar

($\delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}$). A proporção de N na leguminosa derivado do ar, via FBN (%N_{dda}), é calculada utilizando-se a fórmula proposta por Shearer e Kohl (1986):

$$\%N_{\text{dda}} = (\delta^{15}\text{N}_{\text{pr}} - \delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}) / (\delta^{15}\text{N}_{\text{pr}} - 'B')$$

Onde 'B' é a abundância isotópica de ^{15}N da leguminosa quando a planta é totalmente dependente da FBN.

Como é muito difícil no campo recuperar 100 % das raízes, os valores de $\delta^{15}\text{N}_{\text{pr}}$, $\delta^{15}\text{N}_{\text{leg}}$ e 'B' são normalmente determinados somente na parte aérea das plantas. Dessa forma, quase sempre se encontra um valor de 'B' da parte aérea ('B_{pa}') negativo (Boddey et al., 2000). Como os nódulos são quase sempre bastante positivos em $\delta^{15}\text{N}$ (tipicamente +8 a +12 ‰) e as raízes também podem ser um pouco enriquecidas em ^{15}N , vários autores concluíram que quando a planta inteira (parte aérea, raízes e nódulos) é avaliada para a determinação do valor de 'B', este se torna muito perto do valor do ar, ou seja, zero deltas (0 ‰). Entretanto, em um estudo recente com soja e outras leguminosas encontrou-se que todos os valores de 'B' determinados em função das plantas inteiras foram negativos (Okito et al., 2004). Este resultado foi confirmado em outro estudo da mesma equipe (Guimarães, 2005), onde foram comparadas duas estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e 5080) e duas de *B. elkanii* (SEMIA 587 e 5019). Os valores de 'B' das duas estirpes de *B. japonicum* foram significativamente maiores do que aqueles das duas estirpes de *B. elkanii*. Essas 4 estirpes são as únicas licenciadas para serem utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil, o que se torna um problema para a quantificação da FBN em soja em condições de campo. O valor de 'B' tem um peso muito grande no cálculo da %N quando a proporção de N derivado da FBN é alta, que no caso da soja, em campos de produtores, é uma realidade.

A mais provável explicação para que as plantas de soja, totalmente dependentes da FBN, mostrem menor abundância natural de ^{15}N em relação ao N_2 do ar, é a de que existe uma discriminação isotópica contra o isótopo ^{15}N durante o processo da FBN no nódulo. Para estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam soja, não existem avaliações diretas desse processo com as bactérias, principalmente porque é quase impossível crescê-las sob condições de FBN na ausência da planta (*ex planta*). Uma possibilidade é extrair a nitrogenase dos nódulos, que se mantida em condições anaeróbias poderia ser usada para avaliar a magnitude do fracionamento isotópico do N_2 durante o processo da FBN, o que

até agora nunca foi feito. O único relato na literatura sobre o estudo do fracionamento isotópico com extratos de nitrogenase é recente, e foi feito com a enzima extraída da bactéria *Azotobacter vinelandii* (Sra et al., 2004).

Outro fator importante é a regulação da FBN, um mecanismo complexo que ocorre em resposta a disponibilidade de fontes de nitrogênio combinado e a concentração de oxigênio presente (Buchanan-Wollaston et al., 1981), além da fixação de N_2 não ser uma reação favorável energeticamente.

Todas essas reações de troca de metabólitos entre as duas partes simbióticas (bacteróide e a planta) são realizadas através da membrana peribacteriana (MP), uma membrana de origem da planta que cerca os bacteróides fixadores de N dentro dos nódulos. (Whitehead and Day, 1997).

A troca metabólica essencial entre o bacteróide e a planta é a redução de carbono para o bacteróide e a redução de N para a planta que é fundamental para realização do processo de FBN.

As carboxilases (malato e succinato) são as maiores fontes de carbono para os bacteróides e o amônio é a forma que o N fixado é fornecido para a planta. (Ou Yang et al., 1990; Day and Copeland 1991; Vance and Heichel 1991; Day et al. 1995; Streeter 1995; Whitehead et al. 1995). Adicionalmente à troca C/N muitos outros metabólitos e ions também devem atravessar a MP. (Udvardi and Day 1997). O transporte de Fe da planta para o bacteróide também parece ser essencial, e algumas formas de minerais ou nitrogênio orgânico podem ser fornecidas pela planta para o crescimento da população microbiana antes do início da fixação de N_2 , tendo sido demonstrada a participação de uma H^+ -ATPase tipo P em tais trocas que ocorrem através da MP em nódulos de soja e de trevoço (Blumwald et al., 1985).

De fato, a atividade ATPásica foi uma das primeiras características bioquímicas atribuídas à MP (Robertson et al. 1978; Verma et al. 1978). Posteriormente tal atividade foi relacionada com a energização da PM por uma bomba de H^+ do tipo P, semelhante a H^+ -ATPase presente na membrana plasmática das células vegetais (Blumwald et al., 1985; Bassarab et al., 1986; Udvardi & Day, 1989). A atividade destas bombas apresenta dependência por Mg^{+2} , pH ótimo ligeiramente ácido, sensibilidade (ao menos parcialmente) ao inibidor ortovanadato e sendo estimulada pelos cátions K^+ e NH_4^+ . Estudos com simbiossomas intactos têm mostrado que as bombas de prótons formam um

potencial de membrana (positivo no interior) e um gradiente de pH (mais ácido no interior do simbiossomo). Isto estabelece um gradiente eletroquímico o qual energiza o transporte de outros íons através da MP e da membrana do bacteróide (Udvardi et al., 1991; Day et al., 1995; Tyerman et al., 1995; Corzo et al., 1997).

Ferodova et al. (1999) estudando H⁺-ATPases tipo P e tipo V na membrana peribacteriana da cultivar de soja *stevens* inoculada com *B. japonicum*, encontraram que as P- ATPases estavam distribuídas em volta da periferia das células não infectadas no córtex do nódulo e no parenquima do nódulo. Marcação na zona central do nódulo mostrou células infectadas e não infectadas, havendo confirmação da imunolocalização na membrana peribacteriana usando antisoro contra P- ATPases. A mesma técnica não detectou V- ATPases na membrana peribacteriana, sugerindo que as H⁺-ATPases presentes nas membranas peribacterianas de soja são enzimas do tipo P- ATPase e em analogia à enzima da membrana plasmática da planta, especula-se que esta também exerça um importante papel de regulação de troca de nutrientes entre a planta e o bacteróide.

Das estirpes recomendadas no Brasil, *B. elkanii* e *B. japonicum* possuem metabolismos diferenciados, o que se reflete em diferenças na eficiência do processo de FBN, uma vez que as estirpes *B. elkanii* precisam produzir o dobro de nódulos para alcançar o mesmo percentual de FBN que as estirpes *B. japonicum* (Dobereiner et al., 1970).

Uma das diferenças metabólicas mais marcantes entre elas reside na presença ou não da enzima hidrogenase. Concomitante com o processo de FBN, a reação catalizada pela nitrogenase libera H₂, com desperdício de elétrons e ATP que podem ser reutilizados para redução de N₂ na presença da enzima hidrogenase. Esta enzima está presente na maioria das bactérias do grupo I (GTI) e ausente no grupo II (GTII), grupos a que pertencem as estirpes *B. japonicum* e *B. elkanii*, respectivamente (Evans et al., 1987).

A produção de H₂ durante a redução de N₂ foi demonstrada por Bulen et al. (1966), e representa cerca de 25 a 35% do fluxo de elétrons advindo da reação catalisada pela nitrogenase (Hungria et al., 1989). A inter-relação entre a utilização dos carboidratos, a geração de ATP, a evolução de H₂ como subproduto da reação da nitrogenase, se complementa com a reciclagem deste H₂ graças à presença da hidrogenase (Evans et al., 1982).

Evans et al. (1985), trabalhando com soja, comparando estirpes PJ 18 Hup⁺ (Hydrogen uptake) e Hup⁻ (Hydrogen uptake negative), demonstraram que a estirpe Hup⁻ produziu um consistente incremento no conteúdo de N total na semente de 8,6%, nas folhas de 27% e de 8% na planta inteira (em casa de vegetação), com diferenças estatisticamente significativas. Neves et al. (1985), verificaram se havia alguma relação entre a eficiência das estirpes em relação a Hup, e a eficiência *sensu* Döbereiner (alta relação de N fixado por g massa seca de nódulo). Os resultados mostraram que todas as três estirpes do Grupo I avaliadas foram Hup⁺ (eficientes pelos dois critérios) e as 3 estirpes do Grupo II foram Hup⁻ (ineficientes pelos dois critérios). Estes dados sugerem que as estirpes Hup⁻ apresentam um comprometimento energético significativamente maior para conseguir alcançar a mesma porcentagem de FBN.

O exato custo da fixação de N₂ pela simbiose leguminosa-rizóbio em termos de moléculas de ATP ainda é um dado controverso. Desde que a transferência de cada elétron da Fe-proteína para a MoFe-proteína requer a hidrólise de duas moléculas de ATP, isto significa que um mínimo de 16 moléculas de ATP são requeridas por molécula de N₂ reduzida. Na prática, os custos são extremamente altos devido à ineficiência da atividade da nitrogenase e por causa de todo custo auxiliar para o desenvolvimento e manutenção do nódulo, além do custo de assimilação e transporte de NH₄⁺. A estimativa na literatura varia amplamente, mas uma estimativa média indica custos acima de 28 moles ATP mol⁻¹ N (N₂) (Saari and Ludden, 1986), excluindo-se todos os custos auxiliares. Assim, até 33% do fotossintato da planta pode ser requerido, quando o custo total da fixação simbiótica de N₂ e do transporte de NH₄⁺ é considerado (Minchin et al., 1981). Embora significante esses custos podem não ser muito maiores que os custos requeridos durante a assimilação do nitrato (Pate and Layzell, 1990).

Seja no processo de captação de nitrato ou nas trocas de íons e metabólitos que ocorrem na MP a importância das H⁺-ATPases na energização do transporte iônico é preponderante. Deste modo, parece inevitável que flutuações de eficiência na atividade destas enzimas devam influir no balanço energético do processo de FBN como um todo. A presente tese apresenta evidências iniciais sobre a regulação da atividade das bombas de prótons relacionada com a modulação da eficiência energética da FBN, observadas entre as diferentes estirpes de *Bradyrhizobium spp.* recomendadas para a soja no

Brasil. Também investigou as bases científicas de uma das principais fontes de erro associadas à técnica da quantificação da FBN pela abundância natural de ^{15}N , referente ao fenômeno de discriminação isotópica do isótopo ^{15}N durante o processo da FBN nos nódulos.

4. REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, o sistema de plantio direto passou a ser adotado em maior escala pelos agricultores, principalmente a partir do início da década de 90. Este sistema de manejo do solo e planta é uma das alternativas disponíveis para o cultivo de grãos e visa reduzir os impactos negativos da movimentação do solo, tais como erosão e perda de matéria orgânica. Ressalta-se que o plantio direto é uma das práticas mais eficientes para conservação do solo (Mielniczuk et al., 1996).

A rotação de culturas utilizando-se diversas espécies é uma das práticas recomendadas para a exploração racional de solos agrícolas. Esta prática de cultivo mantém altos rendimentos conservando melhor a fertilidade e a capacidade produtiva dos solos (Urquiaga & Zapata, 2000). Dentro desse contexto, a FBN é um fenômeno importante por constituir uma fonte renovável de N para os sistemas agrícolas sustentáveis, especialmente na cultura da soja, onde se dispensa a adubação nitrogenada.

Em sistemas agrícolas, onde se emprega a soja na rotação de culturas, o incremento de N do solo vai ser dependente das cultivares usadas, das estirpes de *Bradyrhizobium* e da quantidade de N exportada nos grãos, dentre outros fatores, determinando, também, o potencial de elevação dos níveis de matéria orgânica do solo.

4.1 Importância da FBN na cultura da soja e na rotação de culturas

A cada ano, a cultura da soja vem ocupando maiores áreas no Brasil, a alta produtividade, associada ao elevado teor protéico dos grãos (cerca de 40%), tornam a cultura da soja extremamente exigente em nitrogênio, sendo esta enorme demanda de N atendida principalmente pelo processo de fixação biológica de nitrogênio.

Estimativas da fixação biológica de nitrogênio para lavouras de soja, amostradas na região do Noroeste Paranaense, variaram de 60 a 99,8 % do N

total acumulado pelas mesmas (Macedo, 2003). Altas contribuições da FBN para a cultura da soja também foram detectadas por Alves et al., (1999) e Zotarelli et al., (2000), em estudos utilizando a técnica de abundância natural de ^{15}N .

Entretanto, o produtor deve ainda prover os requerimentos para o pleno funcionamento do sistema simbiótico, que se refere ao manejo do solo, inoculantes, plantio, adubação, e etc, adequando a sistematização do manejo à plenitude da FBN, principalmente sob o aspecto físico, ambiental, nutricional e biológico (Wani et al., 1995).

Hungria & Vargas (2000), evidenciam que além da adoção do sistema de plantio direto, outras práticas alternativas de manejo, de caráter conservacionista, podem ser adotadas como: o plantio intercalado, o cultivo múltiplo, a rotação de culturas e o uso de culturas de cobertura (também abordado por Amado et al., 2001), que favoreceriam a microbiota do solo e a FBN, incrementando a produção.

No conjunto de medidas necessárias para que a FBN seja eficiente, a inoculação das sementes é uma das mais importantes, tanto em áreas de primeiro ano de plantio de soja ou há muito tempo sem o uso desta cultura (Oliveira et al., 1991), como em áreas de cultivo freqüente. Nessas últimas, a reinoculação pode proporcionar incrementos médios da ordem de 4 a 5% no rendimento da cultura (Nishi et al., 1995).

A elevada contribuição da FBN para a cultura da soja possibilita que as culturas sucessoras possam se beneficiar do processo. Após a colheita, os resíduos deixados sobre o solo se decompõem e tornam-se fontes de N relevante para incrementar a produção de espécies não leguminosas, plantada em sucessão (Alves et al., 2002). Por outro lado, o benefício do sistema como um todo depende da magnitude da contribuição da FBN para a soja, que deve ser suficiente para suprir o N exportado nos grãos da própria cultura da soja, e o N requerido para incrementar a produção da cultura sucessora. Dentro desta idéia, Peoples et al., (1995) destacam que frente aos níveis de contribuição da FBN para a cultura da soja, registrada na Austrália, os altos índices de colheita de N, característicos da cultura, impedem que significativas quantidades de N derivadas da FBN estejam disponíveis para outras culturas. Em muitos casos, especialmente no sistema de plantio convencional, o balanço de N do sistema solo-planta pode se tornar negativo, ao redor de 25 kg N ha^{-1} (Alves et al., 2002).

Alves et al., (2002) demonstraram que a mineralização dos resíduos da soja, de baixa relação C:N garantiu maior produtividade da cultura do trigo, mas significou uma maior retirada de N do solo, uma vez que todo o N derivado da FBN na cultura da soja havia sido exportado nos grãos. O N que existia nos resíduos da cultura da soja pertencia ao próprio solo e por proporcionar maior rendimento de grãos de trigo, também resultou em maior exportação de N do solo. Dessa forma, quando se avalia o balanço de N para a cultura da soja dentro de um sistema de rotação, a quantidade de N derivada da FBN deveria ser suficiente para compensar todo o N exportado nos seus grãos, e também o incremento de N dos grãos da cultura sucessora.

4.2 Métodos para quantificação da FBN-----

Para a estimativa da contribuição da FBN em leguminosas existem diferentes métodos, destacando-se a diferença de N-total, o balanço de nitrogênio no sistema solo-planta, a redução de acetileno, a abundância relativa de ureídeos e as técnicas isotópicas baseadas no uso do ^{15}N (Boddey, 1987). As técnicas baseadas no uso de isótopos de nitrogênio mostram-se bastante eficientes no estudo da fixação biológica de nitrogênio em sistemas agrícolas (Peoples et al., 1997). Estes métodos são capazes de distinguir o nitrogênio que a planta assimilou do ar (N_2) e daquele proveniente do solo. O uso de ^{15}N baseia-se no fato que na natureza existem dois isótopos estáveis do nitrogênio, o de massa 14 e o de massa 15. No ar, são encontrados na proporção de 99,6337 % : 0,3663 % de átomos de ^{14}N : ^{15}N , respectivamente, sendo a proporção de ^{15}N denominada abundância natural de ^{15}N (Junk & Svec, 1958).

Uma das técnicas isotópicas mais adequadas para produzir resultados confiáveis em condição de campo é baseada na diluição isotópica de ^{15}N (Boddey & Urquiaga, 1992). A diluição isotópica de ^{15}N produz estimativas indiretas, sendo necessário cultivar a planta fixadora de N_2 e uma planta referência, não fixadoras de N_2 , em um solo onde o N mineral apresenta uma marcação com ^{15}N acima da abundância natural. Plantas que obtenham, além do N do solo, o N atmosférico (não marcado), sofrem uma diluição no seu enriquecimento em ^{15}N . Quanto maior a diluição, maior a quantidade de N atmosférico incorporado e, por conseguinte, maior a contribuição da FBN.

A premissa básica dessa técnica diz que a leguminosa e a planta

referência devem absorver nitrogênio do solo com a mesma marcação com ^{15}N . Para satisfazer essa condição é necessário que a marcação de ^{15}N do solo seja constante em profundidade e no tempo, ou que a planta fixadora e referência tenham marchas de absorção de nitrogênio do solo idênticas (Boddey, 1987). A planta referência não deve fixar nenhum nitrogênio, ou a quantidade de nitrogênio fixado deve ser desprezível em relação à quantidade fixada pela planta leguminosa, devendo ter um crescimento simultâneo com a planta fixadora, assim ela servirá como um indicador do enriquecimento de ^{15}N disponível no solo (Peoples et al., 1989; Boddey et al., 1995).

A quantificação da FBN pelo método da abundância natural ^{15}N ou $\delta^{15}\text{N}$, foi desenvolvida a partir da constatação de que ocorre pequeno enriquecimento de ^{15}N no solo em comparação ao N_2 do ar. A partir do enriquecimento natural do solo em ^{15}N , pode-se então distinguir a proporção entre o N fixado e o N do solo presente no tecido vegetal (Shearer & Kohl, 1986).

Como o enriquecimento natural de ^{15}N no N disponível do solo é pequeno, normalmente a diferença está na 3ª casa decimal da porcentagem de átomos de ^{15}N em excesso, convencionou-se usar a unidade de delta (δ), que seria o excesso em ^{15}N relacionado à abundância natural de um padrão (ar), multiplicado por mil. Assim, uma unidade delta equivale a 0,0003663 átomos % de ^{15}N em excesso. As plantas que fixam 100% do N teriam 0,0 átomos % de ^{15}N em excesso, ou 0 delta. Por outro lado, as espécies não fixadoras, crescendo no mesmo solo, teriam valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais elevados e próximos aos do solo, uma vez que o N necessário para o seu desenvolvimento é derivado do solo. Esta técnica, como todas as outras utilizadas na determinação da contribuição da FBN para as plantas, também apresenta limitações, que podem ser contornadas selecionando-se espécies-referência, com desenvolvimento radicular e demanda de N semelhantes à planta avaliada (Boddey, 1987).

Além das dificuldades descritas acima, é importante considerar também os valores de fracionamento isotópico que parecem ocorrer durante as transformações do nitrogênio no sistema solo-planta, tornando-se necessário à determinação do valor ' B ', que é a marcação natural de ^{15}N da planta leguminosa crescida com total dependência da FBN (Shearer & Kohl, 1986). Alguns autores têm levantado a hipótese de que o fracionamento pode não existir no processo de FBN (Unkovich & Pate, 2000) e outros acreditam que o fracionamento isotópico

depende da espécie cultivada, das estirpes das bactérias diazotróficas envolvidas, e do estágio e condições de crescimento (Peoples et al., 1989). Para a determinação do valor 'B' geralmente é avaliada a abundância natural de ^{15}N ($\delta^{15}\text{N}$) do N fixado pela leguminosa, inoculada com uma estirpe de rizóbio, e cultivada em um meio livre de nitrogênio. No entanto, os valores de 'B' encontrados nessas condições apresentam-se diferentes dos obtidos no campo, onde diferentes estirpes de rizóbio, água do substrato e a nutrição da planta têm influência (Okito et al., 2004).

Estudos têm demonstrado diferenças em abundância de ^{15}N em partes das plantas que podem ser influenciadas pelas estirpes e pelas variedades das plantas (Steele et al., 1983; Bergersen et al., 1988; Yoneyama et al., 1986). Acredita-se que ocorra um fracionamento isotópico do ^{15}N na planta, uma vez que o ^{15}N por ser mais pesado tende a ser encontrado em maior proporção nos nódulos e nas raízes quando comparados com as proporções encontradas na parte aérea. No entanto, em muitos estudos onde se quantifica a FBN, devido à dificuldade de se recuperar as raízes, essa quantificação é feita utilizando apenas a parte aérea da planta onde a abundância de ^{15}N é menor, superestimando desta forma a FBN. Bergersen et al. (1988), estudando a cultivar de soja Lincoln inoculada com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CB 1809, encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ iguais a -0,51 na planta inteira, -1,15 na parte aérea, e +10,0 nos nódulos.

Em um estudo recente com mucuna (*Mucuna pruriens*), crotalária (*Crotalaria juncea*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e soja, encontrou-se que todos os valores de 'B' determinados em função das plantas inteiras foram negativos. No caso da soja, o valor de 'B' da soja inoculada com a estirpe CPAC 7 (SEMIA 5080) de *Bradyrhizobium japonicum* foi significativamente maior do que o valor de 'B' para a estirpe 29 W (SEMIA 5019) de *B. elkanii* (Okito et al., 2004).

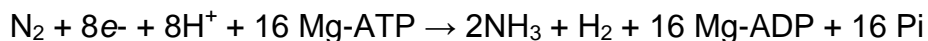
Valores negativos de $\delta^{15}\text{N}$ são comumente observados na parte aérea de muitas espécies leguminosas quando o seu crescimento é inteiramente dependente da fixação de N_2 indicando uma distribuição diferenciada na planta do ^{15}N durante o processo de fixação de N_2 (Unkovich & Pate, 2000). Mesmo com os problemas voltados para a real estimativa do valor de 'B', Shearer & Kohl (1986) destacam como vantagem deste método o fato de não haver necessidade de adição de N marcado, evitando os problemas de inibição da fixação de N_2 e de estabilidade da marcação ao longo do tempo. O uso da técnica de abundância

natural de ^{15}N com os devidos cuidados descritos acima, normalmente apresenta altas correlações com a técnica de diluição isotópica de ^{15}N , por isso, é atualmente, a técnica mais difundida e aceita para fins de quantificação da contribuição da FBN para as plantas (Peoples et al., 1989).

4.3 Mecanismo de redução de N_2 ----- -----

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada um dos principais processos responsáveis pela vida na terra. A grande oferta de N_2 atmosférico (79%), nos sistemas naturais, só se torna disponível aos seres vivos através de gasto energético. A quebra da ligação tripla da molécula de nitrogênio e formação de amônia é realizada em uma reação química comandada pela enzima nitrogenase, utilizando energia obtida de carboidratos e armazenada sob a forma de ATP (Neves et al., 1985).

Considerando a nitrogenase clássica como padrão (dependente de Mo) o processo de fixação de N_2 para a forma combinada tem grande custo energético e ocorre como é mostrado na equação abaixo:



Reação da Nitrogenase

Para reduzir a molécula de N_2 , a atividade da nitrogenase se inicia com aquisição de elétron por uma Fe-proteína de um forte doador de elétron. Em todos os organismos fixadores de N_2 estudados, este doador de elétron específico da nitrogenase, parece pertencer a um ou dois grupos de proteínas: ferredoxinas e flavodoxinas, capazes de transferir um e dois elétrons, respectivamente.

Então, a atividade da nitrogenase é integrada com o metabolismo celular normal por desviar redutores equivalentes – elétrons – da ferredoxina ou flavodoxina doadora de elétron para a Fe-proteína. Estes elétrons são transferidos um por vez da Fe-proteína para a FeMo-proteína. A Fe-proteína, em adição ao cluster da proteína Fe–sulfúrica, teria duas moléculas de MgATP associada à ela. A redução da Fe-proteína (carreando um elétron para ser doado) une a MoFe-proteína. Existe um sitio de ligação obrigatório em cada metade do tetrâmero da MoFe-proteína, e acredita-se que esses dois sítios funcionam independentemente. Em seguida um elétron é transferido da Fe-proteína para a

MoFe-proteína com concomitante hidrólise de ambos os sítios ATP para ADP. Finalmente os dois componentes da nitrogenase são dissociados.

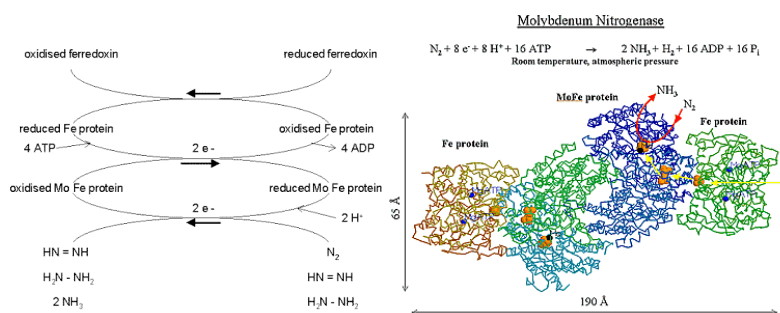


Figura 1: FONTE: <http://www.biology.ed.ac.uk/research/groups/jdeacon/microbes/nfix3>.

A provável via de transferência de prótons tem sido identificada, mas a evolução de hidrogênio observada resulta da proporção desses elétrons e prótons desperdiçados antes de preferivelmente serem utilizados na redução de N_2 . A evolução de H_2 parece ser uma parte essencial do mecanismo de redução de N_2 embora seu papel ainda precise ser determinado. O resultado final é a redução do N_2 a NH_3 . Porque a reação inteira requer oito elétrons e esses são transferidos um de cada vez da Fe proteína para a MoFe-proteína, é sabido que um número de enzimas intermediárias são formadas durante a reação. Sendo que a exata natureza dos intermediários da reação de redução de N_2 ainda não é totalmente conhecida.

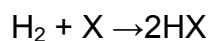
Bortels observou, em 1932, que a fixação de nitrogênio pode ocorrer na ausência de molibdênio (Mo), mas até o início da década de 80 pesquisadores acreditavam que *Azotobacter vinelandii* e outros microrganismos fixadores de nitrogênio continham uma única nitrogenase, a nitrogenase dependente de Mo. Entretanto, com os estudos conduzidos por Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) foi estabelecido que existem diferentes isoformas da nitrogenase, codificadas por genes independentes, classificadas como: nitrogenase 1 (clássica ou dependente de Mo), nitrogenase 2 (dependente de Vanádio) e nitrogenase 3 (dependente de Fe) (Evans & Burris, 1992; Teixeira, 1997). A nitrogenase 1, só é expressa em meio contendo Mo e é a que se encontra presente em todos os microrganismos diazotróficos estudados até o momento. A nitrogenase dependente de vanádio (V) é um complexo enzimático contendo V na composição do co-fator. Este co-fator só é sintetizado quando V está presente em meio livre

de N e na ausência de Mo. A nitrogenase dependente de ferro (Fe) não contém nem Mo nem V e é induzida apenas na presença de Fe, sob condições de deficiência de Mo e V (Bishop & Premakumar, 1992; Davis et al., 1996). Desde então, a existência de nitrogenases alternativas deixou de ser um dogma e já foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (citados por Zinoni et al., 1993). Uma diferença em relação à temperatura para redução de N₂ também foi observada para as três enzimas. Enquanto a Mo nitrogenase é mais eficiente para reduzir N₂ a 30 °C a 5 °C a V nitrogenase é seis vezes mais eficiente que a Mo nitrogenase (Eady, 1996).

4.3.1 Hidrogênio

A evolução do H₂ é avaliada geralmente usando o coeficiente de alocação de elétron que é definido como segue: CAE = elétrons usados na fixação de N₂/fluxo total de elétrons pela nitrogenase. Em muitos organismos, o H₂ pode ser oxidado por uma enzima conhecida por hidrogenase. Esta reação não é associada sempre com a fixação de N₂, mas o interesse aqui deriva especificamente para a possibilidade do papel da hidrogenase em recapturar o H₂ que é inevitavelmente emitido pela nitrogenase durante o processo de redução de N₂.

A reação total simplificada carregada pela hidrogenase é como se segue:



Onde X é um aceptor de elétrons, geralmente O₂. Esta reação é realizada pela divisão do H₂ em prótons e elétrons, os quais são passados à cadeia respiratória até chegarem ao aceptor final de elétrons, que em organismos aeróbicos é o O₂ (Evans et al., 1987). Os prótons por sua vez formam o gradiente quimiosmótico criado pela cadeia respiratória e dissipado pelas F-ATPases (ATP sintases) para gerar ATP.

Embora hidrogenases também possam ocorrer em organismos fixadores de N₂ de vida livre, o maior interesse tem se concentrado no seu possível papel

em aumentar a eficiência de fixação de N_2 na simbiose entre estirpes de *Bradyrhizobium* e leguminosas. As estirpes que expressam esta “reciclagem”, pela presença da hidrogenase, o H_2 evoluído pela nitrogenase é recapturado dentro do nódulo. Podendo a hidrogenase contribuir para o incremento da eficiência simbiótica de várias maneiras:

A atividade da hidrogenase produz uma fonte redutora que pode ser usada metabolicamente na geração de ATP, e assim pode aumentar a eficiência energética do processo. Devido à oxidação H_2 ser acoplada ao consumo de O_2 pelo menos em organismos aeróbicos como *Rhizobium*, isto ajudaria a controlar a pressão parcial de O_2 abaixo do nível de dano para a nitrogenase. O H_2 pode atuar como um forte inibidor da redução de N_2 pela nitrogenase, e assim a atividade da hidrogenase pode ajudar a conservar uma alta eficiência de redução de N_2 por remover um potencial inibidor de redução de N_2 .

Tem havido vários debates sobre a possibilidade da atividade da hidrogenase poder em prática conferir um benefício significativo para leguminosas crescidas no campo. Acréscimos, decréscimos ou falta de efeito da atividade da hidrogenase em campo têm sido quantificados, e se as vantagens são observadas parece depender se a atividade da nitrogenase é restrita por H_2 , inibida por O_2 ou por limitação de carboidrato. A presença de hidrogenase é dispersa entre rizóbios embora isso pareça ser mais comum em estirpes de *Bradyrhizobium* que em *Rhizobium*. A hidrogenase também foi encontrada em *Azorhizobium caulinodans* estirpe ORS571. Em pelo menos algumas estirpes de *Bradyrhizobium* a expressão da hidrogenase é controlada por toda a planta (van Berkum, 1990).

4.3.2 Sensibilidade da nitrogenase ao O_2

A nitrogenase é altamente sensível ao O_2 , onde ambos componentes da enzima tornam-se irreversivelmente inativos quando expostos à concentração de O_2 atmosférico, envolvendo um mecanismo de sensibilidade ainda não conhecido. Assim, a proteção da nitrogenase ao dano causado por O_2 é um aspecto muito importante da fixação de N_2 , e uma variedade de mecanismos foram evolutivamente desenvolvidos por diferentes organismos fixadores de N_2 .

Uma das soluções desenvolvida durante a evolução de anaeróbicos

obrigatórios como o *Clostridium pasteurianum*, permitiu que estes evitassem completamente o problema. Similarmente, muitos anaeróbicos facultativos, como *Klebsiella pneumoniae*, desenvolveram um sistema de controle gênico da nitrogenase que restringe sua expressão a condições de tensão de O₂ muito baixas. A concentração ótima de O₂ para a fixação de N₂ em *K. pneumoniae* seria de 0,03 μmol em comparação com a concentração de 225 μmol, encontrada na água saturada de O₂ atmosférico.

A condição ótima para atividade da nitrogenase em um organismo aeróbico combina exatamente com o suprimento de O₂ que supre a exigência respiratória. Se a provisão de O₂ for insuficiente, a respiração e conseqüentemente muitas outras reações metabólicas, incluindo a atividade da nitrogenase, podem ser reduzidas ou mesmo inativadas. Por outro lado, se a tensão de O₂ aumenta acima da razão do consumo respiratório, o O₂ excedente pode ser danoso à atividade da nitrogenase.

Uma maneira simples para possibilitar experimentalmente que microorganismos aeróbios enfrentem tal dilema seria mantê-los fixando N₂ somente em condições microaeróbicas, quando a pO₂ é bem abaixo da concentração atmosférica. A microaerobiose pode ser conseguida de vários modos diferentes, mas quase todos necessitam de uma barreira física que restrinja a difusão do O₂ em combinação com o consumo respiratório do O₂. Alguns organismos como, *Azospirillum brasiliense* usam uma estratégia comportamental de migração para regiões de intrínseca baixa pO₂, um fenômeno que resulta na característica formação de película observada quando crescidas em meio de cultura. Outros organismos mostram um comportamento diferente, agregando-se para formar estruturas como colônias, no centro das quais a pO₂ é baixa. Tal comportamento é visto em um número de cianobactérias unicelulares, e caracteristicamente nas enormes colônias de *Dermia gummosa*.

A outra estratégia para obter condições microaeróbicas e para restringir a nitrogenase a células especializadas que têm uma parede com a permeabilidade muito baixa ao O₂, são as vesículas formadas por *Frankia* e os heterocistos ou filamentos de cianobactérias. Cianobactérias produzem O₂ durante a fotossíntese, e usam diferentes estratégias para separação espacial e/ou temporal dos processos de fotossíntese e de fixação de N₂. A separação espacial ocorre entre as unidades celulares que compõem os filamentos das colônias de

cianobactérias. Células em intervalos regulares ao longo do filamento diferenciam-se em heterocistos. Estas são células na qual a fotossíntese cessa – o fotossistema II (PSII) permanece inativo – permitindo então elevados níveis de atividades da nitrogenase sem o problema da inibição provocada por O₂. Heterocistos são células diferenciadas definitivamente, elas não podem se dividir nem se desdiferenciar – neste aspecto elas são possivelmente análogas aos bacteróides de rizóbios.

Existem também espécies fixadoras de N₂ dentre a maior parte de filamentosos sem heterocistos, sendo elas quase um gênero unicelular de cianobactéria. Nessas espécies existe uma separação temporal da fotossíntese e da fixação de N₂. Em *Gloeocapsa* isto foi mostrado, parecendo estar relacionado a ciclos de luz e escuro, a fotossíntese ocorrendo em ciclo de luz e atividade de nitrogenase no escuro (Mullineax et al., 1981).

Em outras cianobactérias unicelulares, *Synechococcus* sp., culturas de célula sincronizadas foram usadas para mostrar que a fotossíntese e a atividade da nitrogenase eram de fato separadas em duas fases de ciclo da célula. O máximo de evolução de O₂, e conseqüentemente a fotossíntese, ocorreu somente antes da divisão celular e isto declinou depois alcançando um valor mínimo na metade do ciclo celular. Padrões de atividade da nitrogenase foram exatamente o inverso disto, alcançando um máximo quando a fotossíntese estava em um mínimo e vice-versa. Esta separação temporal foi mantida para pelo menos um ciclo de divisão da célula em luz contínua. Isto mostraria mais tarde que, para *Synechococcus*, a nitrogenase é sintetizada novamente em cada ciclo de atividade.

A fixação de N₂ em associação simbiótica é um processo bem-sucedido graças aos mecanismos que previnem o problema de inibição promovida por O₂. O controle fisiológico do O₂ em nódulos de leguminosas tem sido particularmente bem estudado e compreende dois principais componentes. Um dos componentes corresponde a uma barreira física regulável para a difusão do O₂ no córtex do nódulo. A existência de uma barreira foi deduzida, inicialmente, por observações sobre aumentos da concentração externa de O₂ em até 100 % sem que fosse observado qualquer decréscimo significativo na atividade da nitrogenase ou incremento na respiração do nódulo. Evidências diretas sobre tal barreira foram posteriormente obtidas por quantificação da concentração de O₂ nos nódulos

usando microeletrodos seletivos ao O_2 (Witty et al., 1987). Esta barreira parece ser localizada fora da zona infectada do nódulo, possivelmente após o limite das finas paredes das células as quais são muito turgidas e não possibilitam a formação de espaços para a contenção do gás. Assim, a resistência de difusão desta barreira parece ser modulada, pelo menos em parte, por uma rápida resposta osmótica a estímulos ambientais que induzem flutuações na turgência celular ou carreiam água para dentro do espaço intercelular. Um segundo componente de proteção de O_2 em nódulos de leguminosas trata-se da presença da leghemoglobina nas células infectadas, a qual liga moléculas de O_2 provendo o suprimento adequado à respiração, enquanto o torna indisponível para inibir a nitrogenase. Outros mecanismos propostos envolvem respostas transientes sensíveis à concentração externa de O_2 da região infectada do nódulo, incluindo a respiração mitocondrial e oclusões de glicoproteínas (Minchin, 1997).

Outros organismos são capazes de fixar N_2 em concentração de O_2 perto da pressão parcial atmosférica. *Azotobacter* é o mais estudado e tem três sistemas de proteção (Kennedy & Toukdarian, 1987). Um é conhecido como proteção respiratória, o que significa que as culturas de *Azotobacter* podem adaptar sua taxa de respiração a pO_2 externa. Isto é realizado pelo uso de uma cadeia respiratória bifurcada com diferentes canais gerando diferentes quantidades de ATP. Quando a pO_2 é alta, mas o requerimento por ATP é baixo a *Azotobacter* pode desviar o seu fluxo de elétrons ao longo de uma via respiratória levando geração mínima de ATP, assim queimando-se O_2 rapidamente sem sobrecarregar-se com ATP. De modo inverso, se o pO_2 diminui, a *Azotobacter* pode incrementar sua eficiência respiratória – gerando mais ATP por elétron transferido – pelo simples uso de uma diferente via respiratória (Hill, 1992).

Azotobacter tem, além disso, um meio temporário para distanciar o O_2 de chegar até a nitrogenase, às vezes mencionado como “proteção conformacional”. Isto é mediado pelo baixo peso molecular da proteína Fe-S que se liga ao complexo inteiro da nitrogenase e por meio disso protege-a do dano causado pelo O_2 . Neste processo, a nitrogenase é temporariamente inativada (Schering et al., 1983). Presume-se que este mecanismo é usado pela *Azotobacter* para proteger a nitrogenase depois de uma súbita modificação na pO_2 externa, enquanto o organismo tem o tempo para adaptar o seu sistema respiratório.

O terceiro mecanismo para proteção da nitrogenase foi denominado

“autoproteção”, diretamente mediado pela ação de uma Fe-proteína para reduzir o O_2 para H_2O_2 , com posterior conversão a H_2O pela superóxido dismutase. Isto ocorre quando a proporção molar da Fe-proteína reduzida (carregamento de elétron) para O_2 é igual a quatro ou maior. Mas outra forma de proteção metabólica está na compreensão da atividade hidrogenase que recaptura H_2 gerado pela nitrogenase, e neste processo, utiliza o O_2 .

4.4 Metabolismo da FBN-----

Uma vez que a amônia foi incorporada em glutamato e glutamina, estes dois aminoácidos servem como doadores de nitrogênio (doadores de amina e amida, respectivamente) para a síntese de todos os outros componentes nitrogenados, incluindo outros aminoácidos, ácidos nucleicos e metabólitos secundários, e é claro, utilizado diretamente em síntese de proteína. A razão relativa das diferentes vias metabólicas do nitrogênio depende das necessidades dos organismos.

Em muitos procariotos, exceto *Frankia* e algumas cianobactérias, todo metabolismo realiza-se naturalmente na mesma célula, e assim esses compostos podem ser usados diretamente. Em associação simbiótica com plantas superiores, a situação é bastante diferente. Primeiramente, pelo menos em caso da simbiose leguminosa–rizóbio, a atividade GS bacteriana é reprimida e amônia é exportada para o citoplasma da célula hospedeira para assimilação pela planta pela GS e GOGAT. Segundo, o N provavelmente estaria em excesso no nódulo (uma fonte) e seria necessário em outra parte na planta. Assim o transporte do produto de fixação de N_2 também deve ser conduzido.

Leguminosas podem ser agrupadas em três classes, dependendo da forma em que o N fixado biologicamente é exportado do nódulo: as que produzem aminoácidos, ou amida ou as que produzem ureídos. Os exportadores de amida transportam este N como também asparagina (ASN) ou glutamina (GLN), ao passo que exportadores de ureídos transportam alantoína (ALN) e ácido alantoico (ALC).

A síntese de ureídos é complexa, baseada na síntese e catabolismo parcial de purinas (Atkins & Smith, 2000). Em essência, a glutamina derivada da atividade da GS é translocada para dentro dos plastídios de células infectadas, e a metade do N recém-fixado termina em monofosfato de inosina. Isto é convertido em monofosfato xantina, dele para xantina nos plastídios, e para ácido úrico no

citoplasma. Todos esses passos realizam-se em células infectadas e o ácido úrico é então transferido para uma célula adjacente não infectada, onde a síntese final dos ureídeos, alantoina e ácido alantoico, ocorre no peroxissomos e retículo endoplasmático, respectivamente. Nódulos de leguminosas produtoras de ureídeos têm aproximadamente um número igual de células infectadas e não infectadas.

A forma que o N fixado é transportado em plantas inoculadas também varia com o tipo de planta hospedeira (Schuber, 1986). Na maioria das plantas inoculadas, isso parece ser na forma de amidas, predominantemente asparagina, mas em espécies de *Alnus* citrulina (tecnicamente como o ureídeo é um acil derivado da uréia, mas também um aminoácido e uma amida) é transportada.

Entre espécies de *Casuarina*, não foi detectado citrulina em *C. cunninghamia* (Wheeler & Bond, 1970), enquanto em *C. equisetifolia* foi encontrada citrulina e pareceu ser a forma dominante que o N é transportado no xilema (Walsh et al., 1984). Citrulina foi detectada em nódulos de três espécies de *Casuarina*, mas esta presença não foi relatada para transporte de N fixado (Sellstedt & Atkins, 1991). A enzimologia e a localização física das enzimas de assimilação de nitrogênio não foram tão bem realizadas em nódulos infectados.

Houve algumas especulações sobre as vantagens relativas da planta transportar N como amida ou como ureídeos e isto depende da razão relativa de N:C dos dois tipos de componentes de transporte, e sobre diferentes solubilidades. Em alantoina e ácido alantoico a razão N:C é 1:1, enquanto em asparagina e glutamina é 1:2 e 2:5, respectivamente.

Assim, ureídeos constituem um meio mais eficiente de transporte de N em termos de uso de C, mas quando em geral custos de síntese e subsequente reassimilação são considerados parece haver uma pequena diferença em custo de energia entre os componentes dos dois tipos de transporte (Sprent & Sprent, 1990). Existe também diferença em solubilidade, ureídeos menos solúveis do que amidas em solução, mas isto não parece ser um presente problema para plantas que exportam ureídeos crescendo em altas temperaturas (Hungria & Neves, 1987).

4.4.1 Amônia

A GS cumpre dois papéis. O primeiro é assimilar amônia e assim fornecer N incorporado a esqueletos de carbono para o metabolismo geral. O segundo resultado por observação é que a amônia livre é tóxica, e assim a ação da GS

também pode ser vista como um mecanismo de desintoxicação. Em plantas, onde N é muitas vezes, um fator limitante, o íon NH_4^+ potencialmente tóxico é seqüestrado na forma de componentes de estoque não tóxicos, os quais podem ser posteriormente mobilizados para provisão de N. Em situações de estresse nutricional, o N requerido é geralmente liberado pela quebra catabólica do componente estocado seguido pela reassimilação de amônia então liberada.

4.5 Regulação da fixação de N_2

Como foi visto, há vários problemas potenciais com a fixação de N_2 . Um é o custo de energia de redução do N_2 . O outro é a sensibilidade da enzima ao oxigênio. Assim, como poderia ser antecipado, todos os organismos capazes de fixar N_2 parecem ter sistemas que regulam o acesso e constante atividade da fixação de N_2 .

4.5.1 Inibição da FBN em meio livre de N por organismos fixadores de N_2

Como discutido acima, ao menos 16 moléculas de ATP são necessárias para reduzir uma molécula de N_2 . Os resultados são geralmente substâncias como amida e glutamato. Assim, se o nitrogênio é fornecido nesta ou alguma outra forma combinada, a fixação de N_2 poderia gerar um desperdício de ATP, e não é surpreendente que todo organismo fixador de N_2 de vida livre estudado até agora pareça não mostrar a atividade nitrogenase se nitrogênio combinado suficiente estiver disponível para a célula.

A regulação em resposta ao N combinado tem sido estudada extensivamente em *K. pneumoniae*. Isto tem demonstrado que o sinal que indica a disponibilidade intracelular do N combinado é a razão entre glutamina e 2-oxoglutarato. Se for baixo, isto indica uma baixa concentração celular de NH_4^+ (para a via GS/GOGAT de assimilação de amônia), e ligações, por um complexo cascata de regulação genética, para síntese de uma série de enzimas envolvidas no metabolismo do nitrogênio. A outra enzima do metabolismo do nitrogênio que é regulada desta maneira é a nitrogenase. Isto significa que a nitrogenase é somente sintetizada se o nitrogênio for suficientemente limitante para permitir a fixação de N_2 . Deve ser observado que a deficiência do N combinado não é o único fator que regula a indução da atividade da nitrogenase em *K. pneumoniae*. Um sistema de controle genético também existe para impedir a síntese da

nitrogenase à alta concentração de O₂.

Outra forma de regulação da atividade da nitrogenase que tem sido identificada em alguns organismos fixadores de N₂ de vida livre é a inativação temporária da enzima por modificação co-valente em resposta à disponibilidade de amônia. Isto é, mediado por duas enzimas, uma das quais, Fe-proteína ADP-ribosil transferase (DRAT), que modifica co-valentemente a Fe-proteína por adição de uma molécula de ADP na presença de amônio. Esta é a inativação temporária da nitrogenase. Quando a concentração de amônio diminui, a ADP-ribosilação é revertida em uma segunda enzima chamada dinitrogenase redutase ativando a glicohidrolase (DRAG) e a atividade da nitrogenase é restaurada.

Este fenomeno foi originalmente observado em *Rhodospirillum rubrum* e foi desde então encontrado em outros organismos, incluindo *Rhodospirillum capsulatus*, *Azospirillum* spp. e muito provavelmente *Azorhizobium caulinodans* (Roberts et al., 1990). Contudo, ele não é nenhum meio universal entre fixadores de N₂, e não são encontrados em *Azotobacter* spp. ou em *K. pneumoniae*.

4.5.2 Regulação da fixação de N₂ em simbiose com plantas

No caso de simbiose com leguminosas, a regulação da fixação de N₂ em resposta ao N fixado disponível é mediada pela leguminosa hospedeira e não pelo simbiote bacteriano. Sabia-se há muito tempo que a grande concentração do nitrato inibiria o desenvolvimento dos nódulos radiculares (Fred & Graul, 1916). Entretanto, a significância exata disto não é inteiramente conhecida, como o diferente requerimento de energia de assimilação de nitrato e da fixação de N₂ mais os custos associados.

O efeito do nitrato sobre um número de estágios do processo de nodulação tem sido examinado, e todos, os genes da indução de nodulação de rizóbio através do desenvolvimento de pelos radiculares, penetração e formação de canal de infecção, são inibidos para uma maior ou menor extensão pela presença do nitrato (Carrol & Mathew, 1990). O resultado final é que o número de nódulos formados na raiz da leguminosa é reduzido, a principal conseqüência para completa supressão da nodulação ocorrerá se a concentração de nitrato exceder certo valor limite. Isto pode variar para diferentes espécies, mas varia de 2-20 mM (Harper & Gibson, 1984).

Em concentração intermediária o efeito pode ser manifestado nos nódulos

que se desenvolvem menores, tal que a massa de nódulo por planta é reduzida enquanto o número total de nódulos permanece quase inalterado (Streeter, 1988). Isto poderia ser apontado como sem ou com baixa concentração de nitrato (1-2 mM), que atualmente promove a nodulação por assegurar, rápido crescimento da planta e desenvolvimento de um sistema radicular saudável capaz de nodular muito bem. Isto é denominado efeito inicial.

O terceiro efeito do nitrato é a atual inibição da atividade de fixação nos nódulos. Isto tem sido demonstrado em casa de vegetação e em plantas crescidas no campo. Muitos desses resultados foram obtidos usando ARA para quantificar a atividade da nitrogenase, e desde então, tem sido mostrado que o próprio acetileno induz maiores modificações na atividade da nitrogenase no nódulo (Streeter, 1985; Minchin et al., 1989). No entanto o fenômeno de inibição da fixação de N_2 por nitrato é real e parece ocorrer em três estágios. No primeiro estágio o nitrato fica alocado no citoplasma das células do nódulo e o decréscimo imediato na atividade da nitrogenase é devido a um aumento na barreira de resistência de O_2 . Isto então é seguido por uma redução no metabolismo do carbono. Irreversivelmente segue a senescência de nódulo, possivelmente estimulado por efeitos tóxicos do nitrito sobre a nitrogenase e a leghemoglobina.

Um fenômeno que está certamente relacionado ao acima mencionado é a autorregulação. Isto significa que o sistema radicular da leguminosa desenvolve somente certo número de nódulos ativos e novas infecções não ocorrem. Parece que os primeiros eventos de infecção na raiz produzem um sinal que é transmitido para a parte aérea e a parte aérea produz de volta um sinal igual que é transmitido para todas as raízes, e assim favorece o desenvolvimento dos nódulos. Entretanto, esta autorregulação deve ser sentida pela atividade de fixação de N_2 dos nódulos, se então os nódulos são induzidos por uma estirpe ineficaz de rizóbio, novos nódulos continuam sendo formados até que as exigências de nitrogênio da planta sejam alcançadas.

Parson et al. (1993) sugerem que, além disso, a regulação do crescimento e atividade do nódulo é provocada pela concentração reduzida de componentes nitrogenados no floema. O mecanismo de *feedback* é apoiado por uma ordem direta e uma evidência indireta, e efeitos do nitrato sobre a nodulação e fixação de N_2 descritas acima, podem ser mediados por um sinal da parte aérea. O mecanismo de *feedback* de N fornece uma explicação distinta de como a planta

pode regular o grau da infecção e a atividade da fixação de N_2 em nódulos, que provavelmente também se estende para simbioses com rizóbios e simbioses com *Parasponia* e *Gunnera*.

4.6 Purificação da Nitrogenase

Durante a década de 60 a preparação de extratos de células livres contendo nitrogenase ativa e de nódulos de leguminosas era dificultada pelo fato da enzima ser excepcionalmente lábil (Bond 1967). Já no final da década de 60 iniciou-se as primeiras experiências bem-sucedidas com extratos de células de bactérias fixadoras de nitrogênio e rápidos avanços na compreensão no processo de fixação biológica de nitrogênio e extração desse material foram alcançados (Klucas et al., 1968)

Diversos autores concluíram que todas as preparações dos bacteróides e dos extratos livres de célula de nitrogenase deviam ser executadas de forma a minimizar seu contato com O_2 . Assim, as soluções utilizadas nesse tipo de extração passaram a ser borbulhadas com argônio purificado e mantidas em frascos selados com tampas de borracha, transferidas sempre em uma “glove box” saturada com gás N_2 , H_2 ou Argônio e com auxílio de seringas (Klucas et al., 1968; Evans et al., 1972; Israel et al., 1974).

4.7 Bombas de Prótons

Células vegetais com grande fluxo de prótons através da membrana plasmática compartilham importantes características comuns. Com relação à estrutura, possuem uma elevada área de superfície para aumentar a interface de absorção, podendo exibir muitas protusões ou invaginações e um grande número de mitocôndrias, encarregadas de aumentar o suprimento de ATP para viabilizar o transporte ativo. Biofisicamente, apresentam uma elevada diferença no potencial de membrana, variando entre -150 mV a -200 mV, mantendo a face interna negativa e o exterior ácido, onde o pH apoplástico se mantém entre 4 ou 5. Assim através da membrana plasmática, observa-se um gradiente com dois componentes um de carga elétrica ($\Delta\psi$) e outro químico (ΔpH), chamado gradiente de potencial eletroquímico (Sondergaard et al., 2004).

A principal bomba iônica em plantas e fungos é a H^+ -ATPase de membrana plasmática, mas as Ca^{2+} -ATPases, também encontradas nesses organismos, são

outros membros da mesma classe de bombas conhecidas como P-ATPases, as quais são fosforiladas como parte do ciclo catalítico que hidrolisa ATP. Em decorrência desta etapa de fosforilação, as P-ATPases são fortemente inibidas por ortovanadato (HVO_4^{2-}), um análogo do fosfato (HPO_4^{2-}) que compete com o fosfato do ATP pela ligação ao ácido aspártico do sítio de fosforilação da enzima. Isto ocorre porque o ortovanadato é muito parecido com a estrutura transicional do fosfato no momento da hidrólise. Devido a essa característica, foi possível o estudo de diversos processos fisiológicos em que as P-ATPases estavam envolvidas, já que sua atividade pôde ser isolada de outras atividades ATPásicas, com o uso deste inibidor que é específico para as ATPases tipo P.

Essas H^+ -ATPases são codificadas por uma família multigênica composta de até 12 diferentes isoformas, algumas com expressões específicas em tecidos da planta, como na raiz, na semente, nos órgãos florais ou nas células do floema. E como outras enzimas, as ATPases de membrana plasmática são reguladas pela concentração de substrato (ATP), pH, temperatura entre outros fatores. Também podem ser moduladas por sinais ambientais ou fisiológicos, específicos como: luz, hormônios, substâncias húmicas, ataque de patógenos, interações simbióticas, entre outros fatores bióticos e abióticos (Ramos et al., 2009).

A regulação das H^+ -ATPases é mediada por um domínio auto-inibitório localizado na extremidade C-terminal da cadeia polipeptídica (face citosólica), que atua na regulação da atividade hidrolítica desta proteína. Esta regulação pode ser resultado da ação das quinases ou fosfatases que podem adicionar ou remover grupos fosfatos nos resíduos de serina ou treonina presentes no domínio auto-inibitório da enzima.

A fosforilação destes resíduos e a ligação da proteína regulatória 14-3-3, resulta na ativação da enzima. Este complexo P-ATPases-14-3-3 pode ser observado em plantas tratadas com fusicosina, uma toxina produzida pelo fungo *Fusicoccum amygdali*. A fusicosina liga-se ao complexo P-ATPases-14-3-3 e o estabiliza, ativando irreversivelmente a enzima (Kanczewska et al., 2005).

As bombas de prótons contribuem de maneira crucial para a manutenção de diversos processos fisiológicos nas plantas. Existem evidências de sua participação no controle do ciclo celular, balanço osmótico e expansão celular, via acidificação da parede celular induzida por auxinas (Kalampanayl & Wimmers, 2001). A P-ATPase é uma glicoproteína transmembranar com importantes

funções no desenvolvimento da célula vegetal. É uma bomba eletrogênica que hidrolisa ATP para gerar um movimento de H^+ em direção ao apoplasto. O gradiente de prótons atua como uma força motriz para viabilizar o transporte ativo de íons e outros metabólitos, por meio de sistemas secundários de transporte que realizam o co-transporte de íons H^+ acoplado ao transporte de substâncias para dentro e fora da célula (Hu-Cheng et al., 2003).

A V-ATPase é encontrada em todos os vacúolos vegetais, bem como em células animais e fúngicas (Shiratake et al., 1997). Já a V-PPase tem sido encontrada em plantas, algas, algumas espécies de bactéria fototróficas notavelmente a *Rhodospirillum rubrum* (Drozdowicz e Rea, 2001), protozoários e arqueobactérias (Choura & Rebaï, 2005), nos vegetais A V-PPase é encontrada nas membranas do vacúolo e do Golgi, seu substrato é o complexo Mg^{2+} -PPi, mas não tem sido relatado na literatura a presença dessas bombas de prótons nos bacteróides de nódulos de soja, tremoço ou ervilha (Ferodova et al., 1999; Bassarab et al., 1986; Domigan et al., 1988; Szafran & Haaker, 1995).

Os bacteróides fixadores de N_2 presentes em nódulos de leguminosas são envolvidos por uma membrana de origem da planta, a membrana peribacteriana (MPB). Esta protege o bacteróide e controla o movimento de metabólitos entre os simbiossomo, a planta e o bacteróide (Whitehead & Day, 1997). Em MPBs isoladas de nódulos de soja foram encontradas H^+ -ATPases que parecem ser bombas reversíveis capazes de gerar gradientes eletro($\Delta\Psi$) químicos(ΔpH) através da MPB, coordenando e facilitando o movimento de malato e amônio entre a planta e o bacteróide (Day et al., 1995).

A MPB e o seu bacteróide, em conjunto compõem o simbiossomo, que é a unidade básica de fixação de N_2 da célula infectada do nódulo (Roth et al., 1988). A troca metabólica essencial entre o bacteróide e a planta é o carbono reduzido para o bacteróide para fixação de N para planta. Em adição à troca carbono/nitrogênio muitos outros metabólitos e íons também atravessam a MPB (Udvardi & Day, 1997). A principal característica da MPB é sua energização por uma bomba de prótons que hidroliza ATP (uma H^+ -ATPase), sendo esta uma das primeiras enzimas a ser detectada atividade na MPB (Robertson et al., 1978). Estudos bioquímicos realizados com tremoço (Domigan et al. 1988), soja (Udvardi & Day, 1989) e ervilha (Szafran & Haaker, 1995), indicam que esta H^+ -ATPase é provavelmente do tipo P, sendo dependente de Mg^{2+} , com um pH ótimo

levemente ácido (6,3-6,5), e parcialmente inibida por vanadato e estimulada por K^+ e NH_4^+ . Szafran & Haaker (1995), também mostraram que, em simbiossomas intactos, estas H^+ -ATPases formam um potencial de membrana (positivo no interior) e um gradiente de pH mais ácido no interior do simbiossomo. Assim a energização da MPB possui potencial para afetar profundamente o movimento de íons e metabólitos através de sua membrana, e conseqüentemente todo o processo da FBN.

Resultados encontrados por Ferodova et al. (1999), confirmam a atividade da P-ATPase em isolados de simbiossomas e da MPB. Utilizando microscopia eletrônica, H^+ -ATPases tipo P foram detectadas na MPB de bacteróides recém-formados das raízes da soja, nas membranas plasmáticas ao longo da periferia de células não infectadas no córtex e no parênquima dos nódulos. Concluiu-se também que na MPB não haveria ATPases tipo V, como indica o estudo realizado por Ou Yang & Day, em 1992.

**5. CAPITULO 1- ESTUDO DO FRACIONAMENTO ISOTÓPICO NO
PROCESSO DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) PARA O
APRIMORAMENTO DA TÉCNICA DE QUANTIFICAÇÃO DA FBN POR
ABUNDÂNCIA NATURAL DE ^{15}N**

Resumo

O objetivo deste estudo foi investigar fracionamento isotópico de ^{15}N pela enzima nitrogenase que é uma das principais fontes de erro associada à técnica da quantificação da fixação biológica de nitrogênio (FBN), pelo método de abundância natural de ^{15}N . O experimento foi iniciado com extratos de células intactas de *Azospirillum brasilense* (Sp7, Sp245 e CD), *A. amazonense* (CBamc e Y2), *A. lipoferum* (BR17) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z67 e Z94) na Embrapa Agrobiologia. Essas bactérias foram incubadas em meio de cultivo específico comum e com adição de tampão fosfato até a formação de película característica, analisadas para atividade de redução de acetileno (ARA) e $\delta^{15}\text{N}$. Na Universidade Federal do Paraná (UFPR), posteriormente foi preparado extrato bruto e purificado de nitrogenase de *A. brasilense* (FP2) e extratos de nódulos de soja inoculados com as estirpes SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* e SEMIA 5019 de *B. elkanii* o qual também foi analisado para ARA e $\delta^{15}\text{N}$. As análises de ARA das células intactas de *Azospirillum spp.* e *Herbaspirillum seropedicae* mostraram atividade da nitrogenase não havendo diferença sobre altas concentrações de tampão fosfato, enquanto os resultados de $\delta^{15}\text{N}$ mostraram que há fracionamento isotópico de ^{15}N no processo de FBN, restando avaliar a ordem de grandeza que este fenômeno ocorre. Nos ensaios realizados com extrato bruto e purificado de FP2, a concentração de $0,06928 \text{ ng ml}^{-1}$ do fator de ativação (DraG) proporcionou maior atividade da nitrogenase em ambos os extratos, entretanto o EP ficou ativo por mais tempo alcançando maior ARA. Com EB e EP da nitrogenase extraída dos nódulos foi testada a extração com polivinilpirrolidone (PVP), lavado ou não com HCl, e a substituição da “French press” pela maceração dos nódulos com N_2 líquido como mecanismo de lise celular. No EB da nitrogenase extraída dos nódulos, tanto o PVP quanto os métodos de lise celular foram satisfatórios. O tempo máximo de atividade da enzima purificada foi alcançado aos 30 minutos. A adaptação da técnica agilizou a extração e purificação da enzima, diminuindo etapas de centrifugação e contato com o O_2 . Mas ainda há necessidade de aumentar a atividade enzimática para conseguir

uma quantidade de N_2 reduzido que seja o suficiente para os ensaios que avaliam a discriminação isotópica de ^{15}N .

Abstrat

The objective of this study was to investigate the isotopic fractionation of ^{15}N by the enzyme nitrogenase which is one of the principal sources of error associated with the use of the ^{15}N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation (BNF). The study was initiated with extracts of intact cells of *Azospirillum brasilense* (Sp7, Sp245, and Cd), *A. amazonense* (CBamC and Y2), *A. lipoferum* (Br17) and *Herbaspirillum seropedicae* (Z67 and Z94) at Embrapa Agrobiologia. These bacteria were incubated in the specific culture media enriched with phosphate buffer, until the formation of the characteristic pellicle, and then analysed for acetylene reduction activity (ARA) and ^{15}N abundance ($\delta^{15}\text{N}$). In Federal University of Paraná the next stage of the study crude and purified extracts of nitrogenase of *A. brasilense* (FP2) and crude extracts of nodules of soybean inoculated with the strains SEMIA 5080 of *Bradyrhizobium japonicum* and SEMIA 5019 of *B. elkanii* were prepared, and the extracts were also analysed for ARA and $\delta^{15}\text{N}$. The study on the intact cells of *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae* showed that there was no significant influence of high concentrations of phosphate buffer on ARA but there was a significant isotope fractionation during the process of BNF. However, the task still remains to quantify this with precision. In the experiments with the crude and purified extracts of *A. brasilense* FP2, the concentration of $0.06928 \text{ ng ml}^{-1}$ of the activation factor (DraG) resulted in the highest nitrogenase activity in both extracts, but the purified extract was activated for a longer time reaching a higher ARA. The effects of the use of polyvinylpyrrolidone (PVP), to extract nitrogenase from the nodules was examined with the addition, or not of HCl. The substitution of the maceration of nodules with a French press by liquid N_2 , to lyse the cells was also tested. In the crude nodule extract, both the PVP and the different methods of cell lysis were found to be satisfactory. The maximum time of activity of the purified enzyme was 30 minutes. The adaptation of the technique facilitated the extraction and purification of the enzyme diminishing the number of stages of centrifugation and the consequential contact with O_2 . However, there is still a need to increase further the enzyme

activity if a sufficient quantity of N_2 is to be used for experiments to evaluate the ^{15}N -isotope fractionation during the biological reduction of N_2 .

5.1 INTRODUÇÃO

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é considerada um dos principais processos responsáveis pela vida na terra. A grande oferta de N₂ atmosférico (79%), nos sistemas naturais, só se torna disponível aos seres vivos através de uma reação química realizada pela enzima nitrogenase (Neves et al., 1992).

Em relação à simbiose soja-bactéria diazotrófica, apesar da grande contribuição da FBN para esta cultura, grande parte do N fixado é removido do campo durante a colheita dos grãos (Alves et al., 2006).

Diversas pesquisas realizadas em sistemas de plantio direto com rotações de culturas, que neles a soja esta incluída, mostram que esta é a forma que mais contribui para reposição de N neste sistema de cultivo, mas a quantificação exata da contribuição da FBN ainda é um desafio para avaliar o balanço de N e a sustentabilidade destes sistemas.

Esta dificuldade pode estar relacionada aos diferentes valores de $\delta^{15}\text{N}$ encontrados nas plantas de soja, em função das variedades e estirpes utilizadas, provavelmente devido à discriminação isotópica de ¹⁵N que ocorre durante a redução de N₂ pela enzima nitrogenase.

Até o início da década de 80 pesquisadores acreditavam que *Azotobacter vinelandii* e outros microrganismos fixadores de nitrogênio continham uma única nitrogenase, a qual era dependente de Mo, mas Bortels 1932 observou que a fixação de nitrogênio pode ocorrer na ausência de Mo.

Posteriormente, com os estudos conduzidos por Bishop et al. (1980) e Robson et al. (1986) foi estabelecido que existiam sistemas alternativos de isoformas de nitrogenase geneticamente independentes, sendo eles dependentes de Mo, V ou Fe (Evans & Burris, 1992, Teixeira, 1997).

Desde então as nitrogenases dependentes de V e Fe foram identificadas em diversos grupos de microrganismos diazotróficos, tais como: *Anabaena variabilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Methanosarcina barkeri* e *Clostridium pasteurianum* (citados por Zinoni et al., 1993).

Foi visto também que neste mesmo sítio de redução da nitrogenase ocorre a discriminação isotópica de ^{15}N , que parece variar de acordo com o co-fator ativo na enzima. Estes estudos iniciaram com uma cultura de bactéria de vida livre. Mais recentemente foi realizado um estudo sobre o efeito kie (*kinetic isotope effect*) utilizando ^{15}N , com nitrogenase de *Azotobacter vinelandii*. Sra et al. (2004) sugerem que o sítio inicial de ligação do N_2 à enzima pré-reduzida é reversível. Se fosse irreversível todo N_2 ligado ao centro de reação seria reduzido.

A falta de dados experimentais que abordam a reação coordenada (a partir de redução química obrigatória do N_2) torna impossível avaliar os diferentes modelos para os mecanismos enzimáticos, assim como o fracionamento isotópico pelas diferentes estirpes de bactérias durante o processo de redução de N_2 .

Deste modo, tornou-se necessário a realização de estudos com bactérias diazotróficas para investigar as fontes de erro associadas à técnica da quantificação da FBN pelo método da abundância natural de ^{15}N , referente ao fenômeno de discriminação isotópica do isótopo ^{15}N durante o processo da FBN.

Esses estudos iniciaram-se com bactérias endofíticas e posteriormente com associativas. Estes novos dados experimentais devem facilitar a avaliação futura da contribuição da FBN, e elucidar as diferenças durante a redução N_2 nas nitrogenases de várias bactérias.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Ensaio com bactérias endofíticas

Para a avaliação do fracionamento isotópico durante o processo da FBN de bactérias de vida livre fixadoras de N₂, os experimentos foram conduzidos no laboratório de gramíneas, na Embrapa Agrobiologia.

Inicialmente, as estirpes padrões de bactérias endofíticas de cada gênero estavam liofilizadas (Tabela 1). Na reativação dessas bactérias, as mesmas foram inoculadas, com o auxílio da alça de platina para meio DYGS líquido e em seguida incubado a 30 °C, por período de 24 horas sob agitação constante de 150 rpm.

Tabela 1 – Relação das estirpes e meios de cultura utilizados.

Bactérias	Meios de Cultura
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	NFB*
Z 67	
Z 94	
<i>Azospirillum brasilense</i>	JNFB*
SP 7	
SP 245	
CD	
<i>Azospirillum amazonense</i>	LGI*
CBamc	
Y 2	
<i>Azospirillum lipoferum</i>	NFB*
BR 17	

* Dobereiner et al., 1995.

Após 24 horas de cultivo foi retirada uma alíquota do líquido e estriada em uma placa de Petri contendo meio DYGS sólido, a qual foi incubada em estufa sob temperatura de 30 °C por um período de 48 horas. Então, foi feita verificação da pureza das culturas.

Posteriormente, as colônias individuais obtidas das placas de Petri foram

coletadas e reinoculadas em meio DYGS líquido, permanecendo sob temperatura de 30°C por 24 horas com agitação constante a 150 rpm (Döbereiner et al., 1995). Uma alíquota deste material foi utilizada como pré-inóculo e outra alíquota para preparação de um novo estoque em glicerol 50%, devido à necessidade de se manter a cultura pura e viável para o trabalho. Para cada uma das estirpes, 2 ml da cultura de bactérias foi transferida para um microtubo e procedeu-se uma centrifugação a 8.000 rpm por 15 minutos. Ao precipitado foram adicionados 500 µL de glicerol 50%, estéril, e estes estocados em freezer - 20°C. Deve-se destacar que esta metodologia foi adaptada para esta pesquisa.

5.2.2 Atividade de Redução de Acetileno (ARA)

A atividade da nitrogenase foi avaliada através da atividade de redução de acetileno (Boddey et al., 1990), utilizando cinco frascos de vidro (volume de 250 ml) contendo 100 ml de meio semi-sólido específico para cada estirpe (Tabela 1). Estes frascos foram inoculados com 1000 µl de bactérias previamente cultivadas em meio DYGS líquido com D.O._{600nm} ~1,0 e incubados de 24 a 56 horas sob temperatura de 30°C. Após a formação da película os frascos foram fechados com rolhas de borracha perfurável do tipo *Suba-seal* e foi injetado o equivalente a 10% do volume, da capacidade do frasco, com acetileno e incubados por 1 hora a 30°C. Posteriormente, 0,5 ml da fase gasosa do frasco foi retirada e injetada no cromatógrafo de gás com ionização de chama, Perkin Elmer Auto System II, utilizando uma coluna Poropak N de 150 cm a 70°C, para análise do teor de etileno, gás indicador da atividade da nitrogenase.

Após leitura de ARA, as amostras foram submetidas ao agitador de mesa até a completa homogeneização da película com o meio de cultura. Uma alíquota de 300 µl de cada amostra foi coletada e congelada para posterior determinação de proteína total pelo método de Bradford.

O restante das células foi dividido em duas alíquotas: uma que foi imediatamente congelada e outra que o pelete foi colhido por centrifugação a 6000 rpm por 10 min, seguido de congelamento para análise da abundância natural de ¹⁵N ($\delta^{15}\text{N}$).

Como controle para ARA foram utilizadas amostras de meio de cultivo semi-sólido específico com inoculação do pré-inóculo autoclavado, submetido ao mesmo tratamento.

5.2.3 Quantificação de Proteína Total

Para determinação de proteína total foi utilizada uma alíquota de 20 μL de amostra, 30 μl de água destilada estéril e 50 μL de NaOH 1M, para lisar as células, posteriormente aqueceu-se por 5 minutos a 100°C para extração das proteínas totais e desnaturação do ágar. Em seguida, foram adicionados 900 μL do reagente de Bradford, contendo uma mistura de 111 mg de coomanssie blue G-90 diluído em 100mL de etanol 95%, após acrescenta-se 100mL de ácido fosfórico 85% e completa-se o volume com água para 1 L.

Os tubos foram agitados no vortex e incubados por 5 minutos à temperatura ambiente, após incubação foi feita a leitura de absorvância a 595 nm em espectrofotômetro (Bradford et al., 1976). Como controle, foram utilizadas as mesmas amostras de meio de cultivo, submetidas ao mesmo tratamento descrito no item anterior.

A concentração de proteínas foi determinada usando a curva padrão obtida pelos valores de absorvância das quantidades conhecidas de BSA nas seguintes concentrações: 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.2.4 Avaliação do fracionamento isotópico durante o processo da FBN de bactérias diazotróficas.

Assim, após o processo de FBN, verificado com a ARA, quantificou-se pelo método da abundância natural ^{15}N ou $\delta^{15}\text{N}$ o enriquecimento natural em ^{15}N das amostras.

Para isso, as amostras com as bactérias foram congeladas, liofilizadas. Em seguida foram pesadas alíquotas contendo aproximadamente 35 μg de N, analisadas para abundância natural de ^{15}N , utilizando um analisador automático de C e N (Carlo Erba EA 1108), acoplado a um espectrômetro de massa (Finnigan MAT, Bremen, Alemanha), no laboratório de Ecologia Isotópica CENA/USP, conforme descrito em Ramos et al. (2001). Amostras de meio de cultura com adição da proteína BSA (albumina de soro bovino), foram utilizadas para verificar a marcação inicial de $\delta^{15}\text{N}$, uma vez que precisa de uma quantidade mínima de N para a análise no espectrômetro de massa que não era alcançada com a adição do pré-inóculo.

5.2.5 Ensaio com extratos bruto e purificado de nitrogenase de nódulos de soja para avaliação do fracionamento isotópico de N_2 durante o processo de FBN.

Este estudo foi desenvolvido na Embrapa Agrobiologia, Seropédica – R.J. e no Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, onde foram realizados primeiro alguns ensaios da atividade de nitrogenase de bactérias endofíticas e posteriormente da nitrogenase de estirpes de rizóbio de soja, CPAC 7 (SEMIA 5080 *Bradyrhizobium japonicum*) e 29 W (SEMIA 5019 *B. elkanii*) extraídas de nódulos da cultura. Assim, o objetivo deste trabalho foi de verificar e comparar a discriminação isotópica de ^{15}N em extratos de nitrogenase livre de célula e purificado, durante o processo de FBN.

5.2.6 Determinação da Atividade da Nitrogenase

Inicialmente os testes de ARA foram realizados com *A. brasilense*, estirpe FP2 cultivada a 30°C em meio NFbHP (HP - alto fósforo) sólido para constatar a pureza da cultura (Machado et al., 1991).

O pré-inoculo foi cultivado a 30°C em agitador rotatório a 120 rpm em meio NFbHP contendo antibióticos adequados e NH_4Cl 20mM como fonte de nitrogênio por um período de 24 a 30h até que a densidade óptica a 600nm ($D.O_{600}$), lida em absorbância, fosse igual ou maior que 1,5. Em seguida, uma alíquota de 20µL desta cultura inicial foi transferida para um frasco erlenmeyer de 2 litros com 500 ml de meio NFbHP e 5 mM de NH_4Cl e incubadas a 30 °C sob agitação de 120 rpm durante 18 horas. Após este período os frascos foram vedados com rolhas de borracha perfurável (Suba-Seal) e então injetado acetileno (10% do volume da fase gasosa do frasco), e mantidos nas mesmas condições por 1 hora e logo uma amostra de 0,5 ml da fase gasosa foi coletada para análise do etileno formado, por cromatografia. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso equipado com uma coluna de Porapak N e detector de ionização de chama. A temperatura da coluna foi mantida em 120°C e do detector em 200°C, utilizando nitrogênio como gás de arraste.

5.2.7 Preparo do extrato bruto (livre de células) de *Azospirillum brasilense* (FP 2)

Constatando-se que as células estavam fixando N₂, elas foram coletadas sob fluxo de argônio por centrifugação e ressuspendidas em tampão de extração. As células foram rompidas em uma French Press e o extrato livre de células coletado, este que pode ser congelado em N-líquido ou prontamente utilizado. Todas essas etapas de manuseio das células foram sob fluxo de argônio para evitar a inativação da nitrogenase.

Para verificar se a nitrogenase estava ativa, procedeu-se o teste de ARA com diferentes concentrações de fator de ativação (Fat), ou dinitrogenase ADP-ribosil glicosilase (DraG), que é uma enzima que ativa a Fe proteína (dinitrogenase redutase), através da remoção de um grupo ADP-ribosil. A proteína Fe é inativada por ADP-ribosilação, por amônia ou anaerobiose, através da ação da enzima DraT (dinitrogenase redutase ADP-ribosil transferase).

5.2.8 Preparo do extrato bruto (livre de células) de *Bradyrhizobium japonicum* e de *B. elkanii*.

Condução do Experimento: Foram instalados 2 experimentos na área experimental da Embrapa Agrobiologia, Seropédica, RJ, de janeiro a junho de 2008. Foram utilizados 400 vasos plásticos em cada experimento, no primeiro, cada vaso foi preenchido com areia e vermiculita na proporção de 1:2 e a adubação foi com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950). No segundo experimento os vasos foram preenchidos com terra coletada no campo experimental da Embrapa Agrobiologia (Terraço), de um solo classificado como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico, na profundidade de 0 a 20 cm, que de acordo com Embrapa (1979), apresentava as seguintes características químicas: pH em H₂O, 5,7; Al, 0,0 cmol_c dm⁻³, Ca, 2,2 cmol_c dm⁻³; Mg, 0,8 cmol_c dm⁻³; P e K, 5,7 e 170 mg dm⁻³, respectivamente. Dois dias antes do plantio a adubação do solo foi feita com aplicação de 114,5 mg P₂O₅ kg terra⁻¹, 24 mg K₂O kg terra⁻¹ e 30 mg FTE kg terra⁻¹. Este solo foi utilizado em experimentos anteriores que comprovaram que não contém estirpes capazes de nodular soja (Okito et al., 2004; Guimarães et al., 2008).

Nestes experimentos utilizaram-se sementes de soja cultivar BRS 133, previamente esterilizadas em etanol 70 %, por 3 min, seguido por 2 min em

hipoclorito de sódio e depois lavada 10 vezes com água estéril. Metade dos vasos de cada experimento foi inoculado com estirpe *B. japonicum* e a outra metade com *B. elkanii*, utilizando inoculante turfoso.

Na fase de floração as plantas de soja foram colhidas e os nódulos removidos, congelados em N líquido e armazenados em freezer a -70 °C, para a preparação dos extratos.

5.2.9 Preparação dos bacteróides

Todas as preparações dos bacteróides e dos extratos livres de célula foram executadas de forma a minimizar seu contato com O₂. As soluções foram borbulhadas com argônio purificado e mantido em frascos selados com tampas de borracha, transferidas com auxílio de seringas e por uso de uma “glove box” saturada com gás N₂ e/ou argônio (Klucas et al., 1968; Evans et al., 1972; Israel et al., 1974).

5.2.10 Preparação dos bacteróides e dos extratos livre de célula (extrato bruto)

Todo este procedimento de maceração dos nódulos foi realizado em uma “glove box”. Onde se utilizou para 150 g de nódulo fresco ou congelado, 50 g de PVP, 300 mg de ditonito e 400 ml de tampão ascorbato.

O macerado é filtrado por quatro camadas da gaze e a porção líquida é transferida para tubos de centrifuga de 50 ml que foram vedados e centrifugados por 10 minutos a 5000 g. Descarta-se o sobrenadante, os bacteróides são ressuspensos em tampão pH: 8,0.

Novamente os bacteróides foram coletados por centrifugação a 5000 g por 10 minutos e o fluido sobrenadante é descartado.

Os bacteróides foram ressuspensos em 20 ml de tampão, pH: 8,5 e a suspensão é transferida para um “aminco french press” onde as células são rompidas através de uma pressão de 16.000 psi. As células rompidas são coletadas em tubos de centrífuga mantidos continuamente sob uma corrente de N₂ gás, vedados com tampas com adaptadores de borrachas e centrifugados a 40.000 g por 30 min.

O sobrenadante líquido foi coletado (extrato bruto) e pode ser utilizado imediatamente ou congelado em N líquido para posterior utilização.

Quando congelado para posterior uso, o extrato bruto foi transferido para tubos de polietileno preenchido com nitrogênio líquido e estocados com N₂ líquido (Klucas et al., 1968; Evans et al., 1972; Israel et al., 1974).

Com o objetivo de diminuir o contato da enzima com O₂ foi realizado um teste onde os nódulos de soja foram macerados com N líquido, substituindo assim a “french press” como mecanismo de lise celular e reduzindo as etapas de centrifugação para uma.

Durante todo este processo os nódulos foram mantidos sob uma corrente de gás argônio.

5.2.11 Purificação por coluna DEAE celulose.

Foi utilizada uma coluna DEAE celulose equilibrada em HCl 0,5 M, lavado com água, em seguida com KOH 0,5 M e lavado com água novamente, como recomendado pelo fabricante. A coluna DEAE celulose DE-32(2,5 * 13) foi lavada 3 vezes com tampão de extração (equilíbrio), essa preparação foi feita anexado a um aparato de eluição anaeróbico e mantido resfriado.

A nitrogenase (extrato livre de células), foi colocada sobre a coluna com o auxílio de uma seringa e incubada por 30 min em banho de gelo. A eluição da proteína é iniciada com uma série de soluções salinas tratadas com Na₂S₂O₄, das quais todo O₂ foi removido antes de sua utilização.

Primeiro a coluna é eluída com tampão de equilíbrio, contendo 50 mM de NaCl por 3 vezes, com volume igual a dez vezes o da coluna. A segunda eluição com 500 mM de NaCl remove juntas as duas frações da nitrogenase, que são coletadas sob fluxo de argônio e utilizadas para ensaio de ARA imediatamente ou congeladas em nitrogênio líquido.

5.2.12 Atividade de Redução de Acetileno (ARA).

A atividade do extrato bruto e purificado de nitrogenase foi realizada em frascos de 10mL tipo ampicilina contendo 900 µl de mistura de reação (EVANS et al, 1972) acrescido 100 µl de proteína e avaliada pelo método de redução de acetileno (Boddey et al., 1990), como descrito acima.

5.2.13 Quantificação de Proteína Total.

Para determinação de proteína total foi utilizado o método de Bradford (1976).

5.2.14 Fracionamento isotópico durante o processo da FBN.

Tendo como objetivo comparar o fracionamento isotópico do N₂ no processo de FBN por *B. elkanii* (SEMIA 5019) e por *B. japonicum* (SEMIA 5080), que poderão influenciar na quantificação da FBN utilizando esta técnica isotópica, as análises das amostras de extratos bruto e purificado da nitrogenase ainda estão em fase de preparação.

O atraso nas análises de delta ¹⁵N deveu-se principalmente ao grande tempo necessário empregado nos processos de cultivo das plantas para obtenção dos nódulos e à própria demora inerente aos processos de preparação de amostras e desenvolvimento dos protocolos mencionados acima.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio de ARA foram testadas estirpes de *Azospirillum brasilense* (SP 7, SP 245 e CD), *Azospirillum amazonense* (CBamc e Y 2), *Azospirillum lipoferum* (BR 17) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z 67 e Z 94).

5.3.1 Atividade da nitrogenase em bactérias diazotróficas

Durante o ensaio de redução de acetileno, as estirpes testadas formaram película característica de bactérias diazotróficas e mostraram atividade da nitrogenase sob condições microaerófilas. A Figura 2 mostra que houve grande variabilidade na quantidade de etileno produzido pelos diferentes isolados, apesar de não existir diferença quando essa mesma estirpe foi cultivada com e sem alta concentração de fósforo no meio de cultura, exceto para a estirpe Z 94.

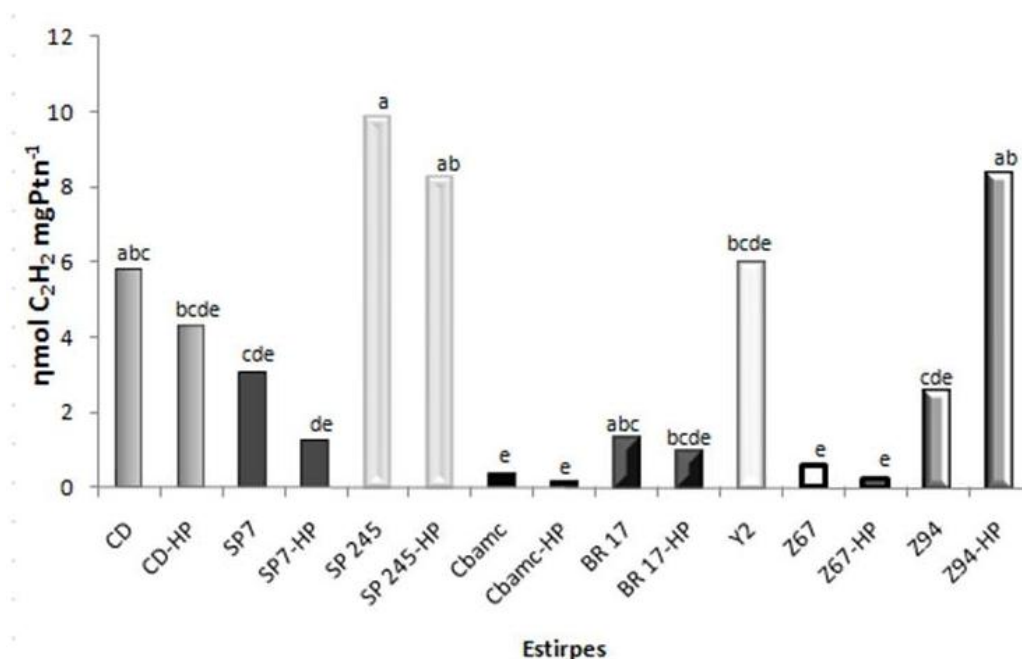


Figura 2: Atividade da nitrogenase (ARA) das estirpes padrões *Azospirillum brasilense* (CD, SP 7, SP 245), *Azospirillum amazonense* (CBamc e Y2), *Azospirillum lipoferum* (BR 17) e *Herbaspirillum seropedicae* (Z 67 e Z94) em meio de cultivo.

Valores médios de 5 repetições. Médias com mesma letra minúscula indicam que não houve diferença significativa na ARA entre as estirpes. ($p < 0,05$ teste t, Student).

Apesar da redução de acetileno ter sido avaliada com intervalo de doze horas após as primeiras 24 horas, essa grande variação pode ter ocorrido devido

ao fato de não conseguir ter feito a análise quando a atividade da nitrogenase era máxima ou a outros fatores externos.

Diversos autores também encontraram grande variabilidade na atividade da nitrogenase entre bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* isoladas de arroz (Rodrigues et al., 2003), *Azospirillum spp.* (Radwan et al., 2005) e *Burkholderia* isoladas de cana-de-açúcar (Perin, 2007).

O método de redução do acetileno vem sendo amplamente utilizado como uma técnica indireta para mensurar a atividade da nitrogenase em amostras naturais, organismos isolados, extratos de células ou tecidos vegetais (Staal et al., 2001). A técnica de ARA foi desenvolvida por Stewart et al. (1967) e Hardy et al. (1968), tornando-se uma técnica popular por apresentar baixo custo, boa sensibilidade e um rápido tempo de resposta.

Esta técnica determina teoricamente a quantidade de N que o organismo ou o sistema estaria fixando do ar, entretanto, muitos fatores interferem nos resultados desta análise incluindo a temperatura, quantidade de oxigênio, concentração de acetileno, difusão de gás por longos períodos de incubação, limite de detecção do cromatógrafo utilizado (Fay, 1992; Zuckermann et al., 1997; Staal et al., 2001), entre outros como o estado fisiológico dos organismos fixadores de nitrogênio. Por isso, apesar de ser considerada por muitos autores uma análise quantitativa, optou-se neste estudo por atribuir um caráter qualitativo a esta análise, não tendo como objetivo quantificar com exatidão a taxa de fixação biológica de nitrogênio das bactérias em estudo, mas sim comprovar a presença da nitrogenase ativa.

5.3.2 Abundância natural de ^{15}N em células intactas de bactérias endofíticas durante o processo da FBN

Os dados apresentados aqui mostram a magnitude da discriminação isotópica contra o ^{15}N em amostras de pelete e pelete mais sobrenadante de células intactas de *Azospirillum brasilense* e *Herbaspirillum seropedice*.

Os valores de $\delta^{15}\text{N}$ não apresentaram diferença entre si, indicando que durante seu crescimento os exudados transportados através da célula não interferiram no valor de discriminação isotópica durante o processo de redução de N_2 (Tabela 2).

Tabela 2 - Abundância natural de ^{15}N (‰) em peletes e pelete mais sobrenadante de bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum com 48 horas de crescimento.

	Pelete	Pelete e Sobrenadante
Bactérias	$\delta^{15}\text{N}(\text{‰})$	
<i>Azospirillum brasilense</i> (CD)	-2,092	-2,327
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (Z67)	-2,446	-2,071
CV (%)	7,13 ^{ns}	

Valores médios de 3 repetições. ^{ns}Médias não significativas entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Nessa primeira fase da pesquisa já foi possível constatar o fenômeno de discriminação isotópica de ^{15}N em células intactas de bactérias diazotróficas de acordo com (Delwiche & Steyn, 1970; Attridge & Rowell, 1997; Karl et al., 1997; Rowell et al., 1998) ao contrário do encontrado por outros autores também estudando culturas de células intactas (Hoering & Ford, 1960; Macko et al., 1987; Minagawa & Wada 1986). A partir desta constatação começou-se a analisar somente os peletes das culturas intactas. Testou-se também se havia diferença entre o $\delta^{15}\text{N}$ das estirpes crescidas em meio de cultivo comum ou com alto fósforo, que tem função tamponante permitindo que a bactéria permaneça reduzindo N_2 por mais tempo (Tabela 3). As estirpes crescidas nos meio de cultura com ou sem alto fósforo não apresentaram diferença significativa entre os valores de fracionamento isotópico, apesar das estirpes Z67 e Z94 apresentarem valores um pouco mais negativos.

Tabela 3 - Abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) em pelete de diferentes bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum e com adição de fosfato com 48 horas de crescimento.

	Meio de cultivo comum	Meio de cultivo alto P
	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)	
<i>Azospirillum brasilense</i>		
CD	-2,092	-1,553
SP 7	-1,742	-1,969
SP 245	-1,693	-1,948
Média	-1,8423	-1,8233
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Z 67	-2,446	-2,666
Z 94	-2,452	-1,921
Média	-2,449	-2,294
CV (%)	9,17 ^{ns}	

Valores médios de 3 repetições. ^{ns}Médias não significativas entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Quando avaliaram os valores de $\delta^{15}\text{N}$ dos peletes de células intactas crescidas somente em meio de cultivo comum, as estirpes de *Azospirillum brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense* e *Herbaspirillum seropedice* foram mais negativas em relação ao $\delta^{15}\text{N}$ atmosférico (Tabela 4).

As estirpes de *H. seropedicae* foram as que apresentaram valores de $\delta^{15}\text{N}$ mais negativos em comparação com o $\delta^{15}\text{N}$ atmosférico, enquanto as demais estirpes alcançaram valores menos negativos variando entre -0399 ‰ e -2,092 para as estirpes CBamc e CD, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Abundância natural de ^{15}N (‰) em pelete de diferentes bactérias diazotróficas cultivadas em meio de cultura comum com 48 horas de crescimento.

Bactérias	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
<i>Azospirillum brasilense</i>	
CD	-2,092 c
SP 7	-1,742 c
SP 245	-1,693 bc
<i>Azospirillum lipoferum</i>	
CBamc	-0,399 a
BR 17	-0,497 ab
<i>Azospirillum amazonense</i>	
Y2	-1,791 c
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	
Z 67	-2,446 c
Z 94	-2,452 c
CV (%)	8,27

Valores médios de 3 repetições. Médias seguidas por mesma letra maiúscula na coluna e minúsculas na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student..

Entre as estirpes de *Azospirillum brasilense* a discriminação contra o ^{15}N do ar foi maior na CD em comparação às estirpes SP7 e SP245. Essa diferença de delta $\delta^{15}\text{N}$ encontrada pode ser característico das estirpes ou ter ocorrido devido ao tipo de nitrogenase (Fe-Mo Ptn), dependente de Mo ou devido à atividade de uma outra nitrogenase dependente de Ferro ou Vanádio, ativa neste sistema apesar de todos os nutrientes estarem em quantidades adequadas no meio de cultura (Rowell et al., 1998).

Outros valores foram encontrados para culturas de *Azotobacter vinelandii* como: -3,9 ‰ e -0,74 ‰ (Delwiche e Steyn, 1970; Rowell et al., 1998), e -0,38 ‰ para cianobacteria *Trichodesmium* (Karl et al., 1997). Dessa forma, os dados da pesquisa são especialmente relevantes, pois demonstram variações no fracionamento isotópico no processo de FBN entre os diazotrófos analisados e estas variações influenciarão na estimativa da FBN.

5.3.3 Fracionamento isotópico em extratos da nitrogenase

Visando estabelecer condições adequadas para o ensaio de quantificação da discriminação isotópica de N_2 , foi realizado alguns testes com extrato bruto e

purificado de nitrogenase de *Azospirillum brasilense*, *B. elkanii* e *B. japonicum*.

5.3.4 Regulação da nitrogenase de *Azospirillum brasilense* (FP 2)

O Fat regula a ativação da Fe-proteína, responsável por doar elétrons a Fe-Mo-proteína responsável pela redução de N_2 a NH_3^+ . A (Figura 3) mostrou o bom funcionamento da metodologia de preparação do extrato bruto e também que a maior concentração de Fat no sistema de reação, (concentração final de $0,06928 \text{ ng mL}^{-1}$), utilizada com extratos de FP 2 alcançou as maiores quantidades de C_2H_4 produzido por mg ptn^{-1} , avaliada por um período de 1 hora.

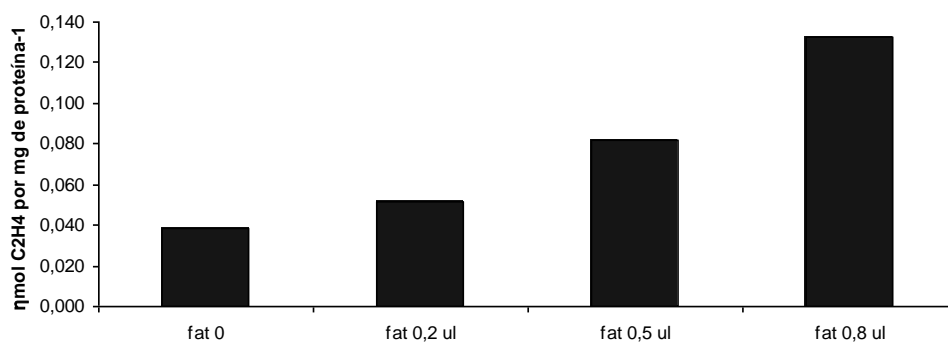


Figura 3: Teste de concentração de fator de ativação da nitrogenase (Fat). Ensaio da ARA com extrato bruto de *A. brasilense* estirpe FP 2. Cada μL de Fat corresponde a $0,0866 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Para testar a metodologia de purificação da nitrogenase (Figura 4), utilizou-se $0,8 \mu\text{L}$ de Fat na concentração de $0,0866 \mu\text{g mL}^{-1}$ determinada no ensaio anterior em diferentes períodos de tempo com a finalidade de checar o tempo de vida útil da enzima. Observa-se que a enzima purificada alcançou maior atividade por mg de ptn^{-1} , assim como ficou ativa por mais tempo.

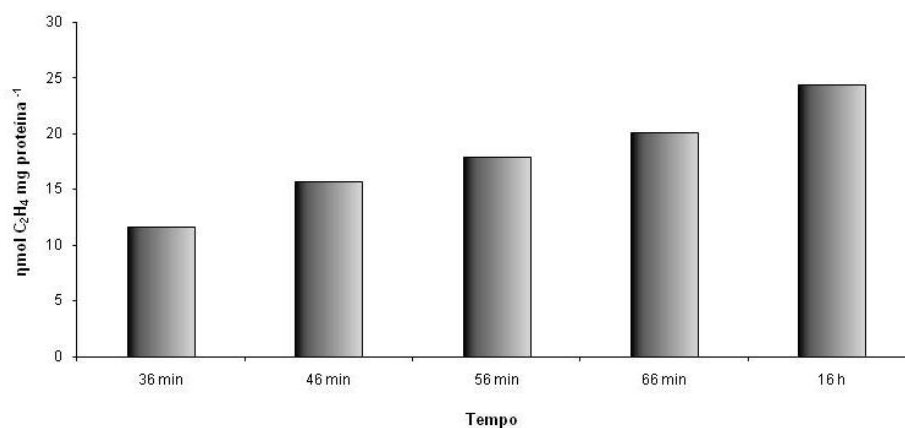


Figura 4 Acúmulo gradual da atividade da nitrogenase. ARA com extrato purificado de

***Azospirillum brasilense* estirpe FP 2.**

Nos primeiros 36 minutos a enzima alcançou uma atividade de aproximadamente $13 \eta\text{mol}$ de C_2H_4 mg de ptn^{-1} , no tempo de 66 minutos a enzima alcançou uma atividade de $\sim 20 \eta\text{mol}$ de C_2H_4 mg de ptn^{-1} , indicando que apesar de ter ficado ativa por mais tempo sua atividade não chega a dobrar o que é esperado quando a atividade da enzima é constante.

Para estrato bruto da nitrogenase extraída dos nódulos de soja (Figura 5), observa-se que os dois métodos de lise celular funcionaram satisfatoriamente.

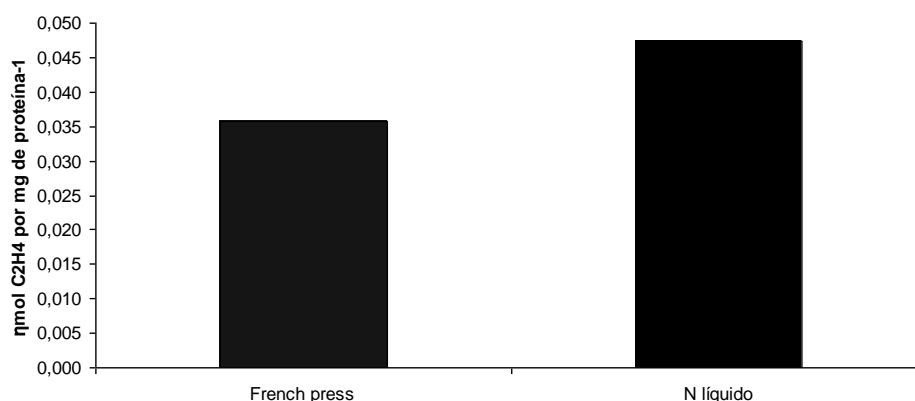


Figura 5: Ensaio de lise celular com French Press e N líquido. ARA com extrato bruto de *Bradyrhizobium elkanii*, estirpe 29 W (BR 29/SEMIA 5019) 30 min após incubação.

Mas com a necessidade de aumentar a atividade da enzima por mg de proteína, e assim conseguir uma quantidade suficiente de N fixado para o ensaio de discriminação isotópica de ^{15}N , realizou-se a purificação desta enzima (Figura 6).

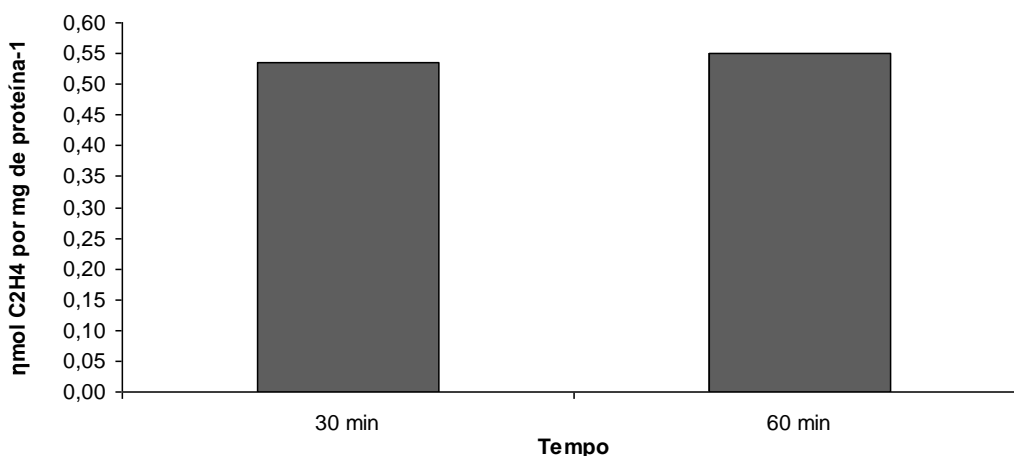


Figura 6: Atividade enzimática da enzima nitrogenase. ARA da mistura do extrato purificado de *B. elkanii* (BR29/SEMIA 5019) e de *B. japonicum* (SEMIA 5080), lisadas com N líquido.

A mistura dos extratos purificados das estirpes de rizobio de soja, 29W e CPAC 7 alcançou uma atividade dez vezes maior que o extrato bruto, mas foi muito inferior à atividade alcançada pela *A. brasilense* (FP2) e por outros autores que purificaram nitrogenase de nódulos de soja (Klucas et al., 1968; Israel et al., 1974).

Como na Figura 4, também foi avaliado o período de tempo da atividade da enzima, e não foi observada sua atividade por um período maior que 30 min, o que pode corresponder a uma inativação enzimática por entrada de O₂ no sistema.

5.4 CONCLUSÃO

A metodologia testada mostrou-se adequada para extração e purificação da nitrogenase. Os resultados de ^{15}N de células intactas de bactérias endofíticas estudadas confirmaram a existência do fenômeno da discriminação isotópica de ^{15}N no processo de FBN, este que foi mais negativo para as estirpes de *Herbaspirillum seropedicae*, $-2,44\text{‰}$ em comparação com as estirpes *Azospirillum* brasileira com uma média de $-1,84\text{‰}$, sendo menor para *A. lipoferum* com uma média de $-0,48\text{‰}$.

6. CAPÍTULO 2- INFLUÊNCIA DAS BOMBAS DE H⁺ SOBRE A EFICIÊNCIA ENERGÉTICA DA FBN EM PLANTAS DE SOJA INOCULADAS COM *B. japonicum* E *B. elkanii*

RESUMO

A regulação da fixação biológica de nitrogênio (FBN) envolve um mecanismo complexo modulado em resposta à disponibilidade de fontes de nitrogênio, à presença de oxigênio, e de oscilações do metabolismo energético devido à enorme demanda por ATP inerente ao processo. A troca metabólica entre o bacteróide e a planta, realizadas através da membrana peribacteriana (MP), essencial para realização do processo de FBN, inclui o transporte de açúcares, compostos nitrogenados e vários íons orgânicos e inorgânicos. Um dos primeiros sistemas transportadores de íons descritos em nódulos foi uma H^+ -ATPase semelhante as ATPases tipo P que geram o gradientes eletroquímicos de H^+ na membrana plasmática e energizam a translocação de nutrientes e outros metabólitos em todas as células vegetais. Neste capítulo são fornecidas as primeiras evidências experimentais sobre uma possível participação destas bombas de H^+ na modulação da eficiência do processo de FBN. Os resultados demonstram que a inoculação de plantas com as quatro estirpes licenciadas para a cultura da soja no Brasil estimulam a atividade de hidrólise de ATP das H^+ -ATPases em comparação com os valores obtidos com enzimas de plantas sob adubação mineral. O monitoramento do gradiente de H^+ associado as atividades das H^+ -ATPases tipo P e V de microssomas de nódulos enriquecidos com membrana peribacteriana apresentaram maior acoplamento entre as atividades de hidrólise de ATP e de translocação de H^+ , especialmente nas bombas de plantas inoculados com a estirpe *B. japonicum*. A inoculação com esta mesma estirpe também promoveu uma maior estimulação da H^+ -PPase favorecendo um metabolismo energético mais favorável a alta demanda por ATP da FBN.

ABSTRAT

The regulation of biological nitrogen fixation (BNF) involves a complex mechanism modulated in response to the availability of sources of nitrogen, the presence of oxygen and the oscillations in metabolic energy due to the demand for ATP inherent in the process. The metabolic exchange between the bacteroid and the plant, realized via the peribacteroid membrane (PM), is essential for the process of BNF and includes the transport of sugars, N compounds and various organic and inorganic ions. One of the first ion transport systems described for nodules was a H⁺-ATPase similar to the type P ATPases which generate electrochemical gradients of H⁺ in the plasma membrane and energize the translocation of nutrients and other metabolites in plant cells. In this chapter the first experimental evidence is presented indicating a possible participation of these H⁺ pumps in the modulation of the efficiency of the BNF process. The results demonstrated that the inoculation of soybean plants with the four different *Bradyrhizobium* strains licensed for the inoculation of soybean in Brazil, stimulated the activity of ATP hydrolysis by the H⁺-ATPase in comparison with the values obtained with enzymes from plants under mineral N fertilization. The monitoring of the gradient of H⁺ associated with the activities of the type P and V H⁺-ATPases of the microsomes of the nodules enriched with peribacteroid membrane showed a greater coupling between the hydrolytic activity of ATP and the translocation of H⁺, especially by the pumps in plants inoculated with the strain of *B. japonicum*. The inoculation of this same strain promoted a greater stimulation of the H⁺-PPase favouring an energetic metabolism for the high demand of ATP for BNF.

6.1 INTRODUÇÃO

Durante o processo de infecção da planta pela bactéria existe uma troca de sinais metabólicos e a formação de uma nova estrutura, denominada nódulo radicular. A formação de nódulos inicia-se com a quimiotaxia das células rizobianas para as superfícies dos pêlos radiculares, desencadeada a partir da exsudação de compostos flavonóides pela raiz (Perret et al., 2000; Moreira & Siqueira, 2006).

No nódulo, as bactérias sofrem uma série de transformações morfo-fisiológicas e dão origem aos bacteróides, que são isolados do citoplasma da célula da planta pela membrana peribacteriana (PBM), assim tornando-se ativos para a fixação de nitrogênio (Perret et al., 2000; Moreira & Siqueira, 2006). A PBM se forma a partir da membrana plasmática da célula epidérmica da raiz que forma o cordão de infecção, e sofre uma série de transformações morfo-fisiológicas que envolvem a expressão de diferentes sistemas transportadores, incluindo as H⁺-ATPases.

De modo geral, o processo de energização de membranas pela H⁺-ATPase é um passo fundamental para a absorção de nutrientes, pois como estes se acumulam nas células em concentrações bem acima das encontradas no ambiente, o transporte de nutrientes é freqüentemente contra o seu gradiente de concentração químico e/ou elétrico (Palmgren, 2001; Sondergaard et al., 2004). Isto também deve valer para as trocas de nutrientes e outros metabólitos que ocorrem na MPB que faz a interface entre as células da planta e as bactérias fixadoras de N.

A principal troca de nutrientes através das membranas nessa associação simbiótica envolve o fornecimento de açúcares sintetizados pela planta, que serve como combustível à atividade da nitrogenase nos bacteróides, e do nitrogênio fixado pelos bacteróides, que é assimilado e utilizado no metabolismo da planta. No entanto, muitos outros metabólitos são trocados e regulados por uma série de transportadores e canais na PBM e na membrana do bacteróide. (Ronson et al. 198; Blumwald et al. 1985). A princípio o funcionamento destes transportadores

depende do gradiente eletroquímico gerado pelas H⁺-ATPases.

Dados mais recentes mostram que durante o processo de infecção e desenvolvimento do nódulo até o estágio de eficiência da fixação de nitrogênio, a PBM muda a seletividade de metabólitos e transporte de íons necessários à manutenção da homeostase celular, e dos mecanismos sinalizadores para vários processos intracelulares (Udvardi and Day., 1997; Whitehead. and Day., 1997; Krylova et al., 2007).

Estudos de transporte com PBM em nódulos jovens de fava (*Vicia faba* L.), que têm crescimento nodular indeterminado, mostraram que ocorre transporte de glutamato além de malato e succinato, provavelmente para suprir sua necessidade em N antes do início da redução do N₂, o que não ocorre em nódulos maduros (Krylova et al., 2007). De fato, a maioria dos trabalhos realizados com PBM, utilizou nódulos de crescimento indeterminado, implicando em maior atividade das H⁺-ATPases, que em experimentos com nódulos de soja, onde o crescimento é determinado e após o desenvolvimento do nódulo, a H⁺-ATPase estaria somente energizando e regulando a troca de substâncias (Blumwald et al., 1985; Domigan et al., 1988; Udvardi & Day, 1989; Szafran & Haaker, 1995; Izmailov, 2002). Assim, persistem controvérsias sobre a função da acidez do espaço luminal do bacteróide, sobre a possibilidade de reversibilidade da H⁺-ATPase da membrana peribacteróide e também em relação à eficiência energética de estirpes comerciais.

Diante do exposto, neste estudo decidiu-se investigar o mecanismo de ação pelo qual as bombas de prótons (H⁺-ATPases e H⁺-PPases) participam do processo da FBN, verificando o potencial funcional destes sistemas para o controle da eficiência energética durante o processo de redução de N₂, conhecimento este que pode fundamentar o futuro estabelecimento de procedimentos de seleção de estirpes, cultivares, manejo ou mesmo manipulações genéticas que incrementem os efeitos deste processo sobre a produtividade da soja.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram instalados dois experimentos em épocas distintas para a posterior coleta de raízes e nódulos de soja, necessários aos procedimentos de fracionamento celular para realização dos ensaios de atividade das bombas de prótons.

Na condução dos experimentos, foram utilizados vasos plásticos, preenchidos com 4 kg de areia e vermiculita na proporção de 1:2 e a adubação foi com solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950). Nestes experimentos utilizaram-se sementes de soja cultivar BRS 133, previamente esterilizadas em etanol 70 %, por 3 min, seguido por 2 min em hipoclorito de sódio, sendo posteriormente lavadas 10 vezes com água destilada estéril.

Para estudar a diferença no metabolismo energético da simbiose entre plantas de soja e *Rhizobium*, antes do plantio, as sementes de soja foram inoculadas com inoculante turfoso contendo as estirpes *B. japonicum* ou *B. elkanii* como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Característica das estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii*, utilizadas no experimento.

Estirpe / Nomenclatura		Características
<i>B. japonicum</i>		
SEMIA 5079 ^{ab}	CPAC 15/BR 86	Hup ⁻
SEMIA 5080 ^{ab}	CPAC 7/BR 85	Hup ⁺
<i>B. elkanii</i>		
SEMIA 5019 ^b	29W /BR 29	Hup ⁻
SEMIA 587 ^{ab}	BR 96	Hup ⁻

^aFERREIRA et al., 2002; ^bBODDEY, 1995.

Em cada vaso foram semeadas cinco sementes, efetuando-se o desbaste oito dias após emergência, sendo mantidas duas plantas por vaso até o estágio de crescimento V3 e V4 (aproximadamente 35 dias após o plantio), quando o experimento foi colhido. Em seguida, procedeu-se à separação e pesagem dos nódulos e raízes frescos para posterior extração das vesículas. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições.

6.2.1 Isolamento de vesículas de mitocôndria, plasmalema e tonoplasto

Todo o procedimento de isolamento das vesículas foi realizado à baixa temperatura, a fim de conservar o material vegetal. A metodologia utilizada para isolamento das vesículas foi realizada através de centrifugação diferencial, essencialmente como descrito por Giannini e Briskin (1987), com algumas modificações (Façanha e De Meis, 1995).

As amostras foram maceradas em grau e pistilo com meio de extração gelado contendo: 250 mM sacarose, 10% glicerol, 100 mM tris-base, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,4% de PVP-40T, 0,1% BSA, 100 mM KCl, onde o volume utilizado foi proporcional à quantidade de material fresco obedecendo a proporção 1:2.

O homogenato foi filtrado em duas camadas de gaze, apertando-o para obter o máximo de material. O extrato foi centrifugado a 3000 g por 10 minutos a 4°C para a remoção das células não rompidas, e núcleos.

Em seguida o sobrenadante foi recolhido e centrifugado a 8000 g por 10 minutos para separação da fração contendo mitocôndrias que ficarão depositadas no precipitado. O sobrenadante foi novamente centrifugado em ultracentrifuga a 100000 x g por 30 minutos a 4 °C para separação das frações contendo plasmalema e tonoplasto. O precipitado das duas centrifugações foi ressuspenso em 1 ml de solução tampão contendo: 15% de glicerol, 20 mM tris-HCl (pH 7,6), 1 mM de EDTA, 1 mM DTT e 1 mM PMSF.

As proteínas foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas em freezer - 70 °C para posteriores análises.

6.2.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

6.2.3 Determinação da atividade da F-ATPase

Para a atividade da F-ATPase, da extração mitocondrial o meio de reação utilizado continha 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 8,0, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína com adição ou não de 0,2 mM de azida.

A reação foi iniciada pela adição de proteína e paralisada nos tempos 0, 10, 20 30 e 40 minutos quando foi retirada uma alíquota destas amostras e adicionado ácido tricloroacético (TCA) gelado ajustado para uma concentração final de 10 % (v/v). A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL de uma mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1) e após 15 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. A atividade desta enzima foi calculada pela diferença observada sem e com a presença de azida.

6.2.4 Determinação das atividades da P - H⁺-ATPase, V - H⁺ATPase e H⁺-PPase

A atividade ATPásica das bombas de prótons foram determinadas pela medida da liberação de Pi segundo o método colorimétrico clássico descrito por Fiske e Subbarrow (1925).

A composição do meio de reação para P - H⁺-ATPase é de 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 6,5, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína com adição ou não de 0,2 mM de vanadato, um inibidor muito eficiente da ATPase do tipo P (De Michelis e Spanswick, 1986), onde cerca de 70-95% da atividade da H⁺-ATPase das vesículas medidas são inibidas pelo vanadato, e a diferença entre essas duas atividades será atribuída a ATPase do tipo P.

O meio de reação para V- H⁺-ATPase foi composto de 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 7,0, 3 mM de MgCl₂, 100 mM de KCl, 1 mM de ATP e 50 µg de proteína com ou sem Concanamicina, e a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a V-ATPase.

O meio de reação para H⁺-PPase continha 10 mM de Mops [ácido 3-(N-morfino) propano sulfônico]-Tris pH 7,0, 3 mM de MgCl₂, 1 mM de PPI e 50 µg de proteína com ou sem adição de 100 mM de KCl, que neste caso, estimula a H⁺-PPase, e também a diferença entre essas duas atividades foi atribuída a H⁺-PPase.

Para todos os ensaios a reação foi iniciada pela adição da proteína, no tempo zero e a cada 10 minutos até os 40 minutos foram retiradas alíquotas destas amostras e a reação foi paralizada através da adição de ácido tricloroacético (TCA) gelado ajustado para uma concentração final de 10 % (v/v).

A revelação do Pi hidrolisado foi realizada mediante a adição de 0,5 mL de uma mistura contendo Molibdato de Amônio 2% em H₂SO₄ 2 % + Ácido Ascórbico 1 % (100:1) e após 15 minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro Shimadzu UV-2000 no comprimento de onda de 750 nm. Nesta reação o fosfato é incorporado dentro de um complexo fósforo-molibdênio e reduzido com ácido ascórbico para formar a cor azul.

Em todos os experimentos, a atividade hidrolítica da H⁺-ATPase e H⁺-PPase foi medida a 30 °C.

6.2.5 Monitoramento do gradiente de prótons H⁺-ATPase, da H⁺ - V-ATPase e H⁺-PPase

O gradiente de prótons foi medido como descrito por Michelis & Spanswick (1986), com algumas modificações propostas por Façanha & de Meis (1998), monitorando a taxa de decréscimo da fluorescência ($\Delta F/\text{min}$) da sonda fluorescente metacromática, 9-amino-6-cloro-2-metoxiacridina (ACMA), excitada com um feixe de comprimento de onda de 415 nm e a emissão captada a 485 nm, utilizando-se um espectrofluorímetro.

A ACMA contém um grupo amina que funciona como uma base fraca, pressupondo que não protonado tem capacidade de atravessar livremente a bicamada lipídica das membranas. A protonação da base do grupo amina limita essa capacidade de movimento transmembranar, assim, a sonda distribui-se através da membrana conforme a diferença de pH entre o interior e o exterior das vesículas.

O meio de reação utilizado para medir o gradiente de prótons foi composto de 10 mM Tris-HCl (pH 7) – para tonoplasto ou 10 mM HEPES-KOH (pH 6,5) - membrana plasmática, 100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 250 mM sacarose, 2 μ M ACMA e 50 μ g/mL de proteína.

Para membrana plasmática a reação foi desencadeada pela adição de ATP 1 mM e para tonoplasto tonoplasto, a reação foi iniciada pela adição de 1 mM de ATP ou PPI. Em ambos os casos, após atingir o equilíbrio entre efluxo e influxo de prótons, utiliza-se 0,02M de NH₄Cl para dissipar o gradiente formado.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Produção de matéria fresca

As plantas de soja inoculadas com as estirpes *B.elkanii* apresentaram em média o dobro do peso fresco de nódulos em comparação com as inoculadas com *B. japonicum* (Tabela 6), confirmando dados de outros autores que também encontraram maior produção para estirpes de *B.elkanii* (Dobereiner et al., 1970; Neves et al., 1985; Okito et al., 2004). As raízes de plantas inoculadas com as duas estirpes apresentaram peso fresco de 13 a 16 gramas, sem diferenças estatisticamente significantes (teste t de Student)

Tabela 6 - Peso fresco de nódulo de soja cv BRS 133 inoculado com estirpes de *Bradyrhizobium* colhidos entre o estágio de crescimento v3/v4.

	Peso Fresco
<i>B.elkanii</i>	g
BR 29	1,15 a
BR 96	1,05 a
<i>B. japonicum</i>	
BR 85	0,63 b
BR 86	0,47 b
CV (%)	11,1

Valores médios de 4 repetições. Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste t de Student.

Tal diferença observada no peso fresco dos nódulos deve refletir em diferenças de eficiência metabólica, uma vez que apesar da diferença na massa de nódulos, ambas alçam a mesma porcentagem de N derivado da FBN (Okito et al., 2004).

Uma das diferenças mais citadas entre essas estirpes é a presença da enzima hidrogenase (Hup^+), presente na maioria das estirpes *B. japonicum*, capaz de reciclar o H_2 produzido durante a redução do N_2 e aumentar a eficiência energética do processo (Evans et al., 1987). Mas esse não seria o único diferencial metabólico entre as estirpes, porque a hidrogenase não é encontrada em todas as estirpes *B. japonicum* (Minamisawa, 1989).

Hungria et al. (1989), estudando plantas de soja cv Santa Rosa, inoculadas com estirpes isogênicas (Hup) mutantes de *B. japonicum*, demonstraram que aos 70 dias após a emergência, a estirpe PJ 17 Hup⁻ tinha fixado 268 mg N planta⁻¹ e a PJ 17.1 Hup⁺ 304 mg N planta⁻¹. O mesmo foi encontrado para a cv Doko, quando inoculada com a estirpe BR 33 (variante da estirpe CB 1809/BR85) acumulou na parte aérea, incluindo as vagens, 3,3 mg N planta⁻¹ enquanto a BR 29 acumulou apenas 482,5 mg N planta⁻¹, demonstrando que *B. japonicum* tem maior eficiência nodular, uma vez que com menor massa consegue acumular maior quantidade de N na parte aérea (Santos et al., 1997).

Outros experimentos mostram o efeito do genótipo da planta hospedeira sobre a atividade Hup quando realizados com diferentes espécies de leguminosas infectadas com a mesma estirpe de rizóbio, em muitos casos o fenótipo Hup⁺ é reprimido de acordo com o hospedeiro, isso indica a influência dos hospedeiros na expressão da enzima hidrogenase. Sendo assim, um terceiro fenótipo em termos de expressão da atividade da hidrogenase tem sido estabelecido: Hup^{hr} (hydrogen uptake host regulated) (Van Berkum, 1990).

Todavia, muito do diferencial energético entre essas estirpes envolve um mecanismo complexo que ocorre em resposta à disponibilidade de fontes de N combinadas e concentração de O₂ (Buchanan-Wollaston et al., 1981), o qual exerceria forte influência sobre a eficiência do processo de FBN devido este envolver reações energeticamente muito desfavoráveis (Evans et al., 1987). As trocas de íons e metabólitos que ocorre nas membranas plasmáticas dos simbiontes e na PBM, as quais dependem da energização promovida pelo gradiente eletroquímico gerado pelas H⁺-ATPases, também podem influenciar a eficiência energética do processo de FBN.

6.3.2 Efeito da inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* sobre a atividade da F-ATPase

A análise da atividade hidrolítica da F-ATPase é classicamente usada como forma de inferir indiretamente a capacidade de síntese de ATP mediada por essa enzima mitocondrial sob condições fisiológicas.

A fração contendo vesículas mitocondriais apresentou uma maior atividade ATPásica sensível a azida nas plantas colonizadas pelas estirpes *B. elkanii* em comparação com as demais estirpes e com o tratamento com adubação nitrogenada, sendo este efeito mais pronunciado nos nódulos que na raiz (Figura 7).

Nos nódulos somente a estirpe BR 96 alcançou maior atividade hidrolítica destacando-se das demais

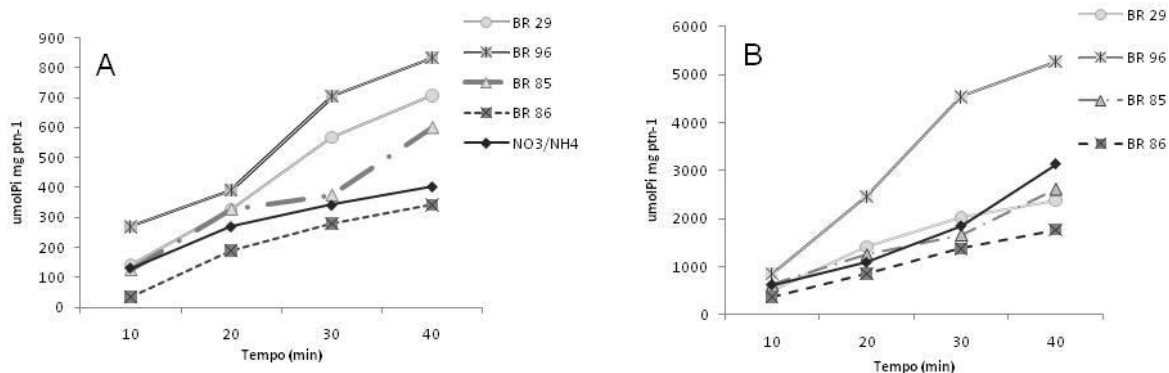


Figura 7: Cinética temporal da hidrólise de ATP mediada pela F-ATPase mitocondrial de raízes (A) e nódulos (B) de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29 e BR 96) e *B. japonicum* (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$).

Em relação a atividade hidrolítica da F-ATPase, confirmando os dados ilustrados na Figura 7, as plantas inoculadas com a BR 96 alcançou maior atividade azida sensível quando comparada as demais estirpes e ao tratamento nitrogenado tanto nas raízes quanto nos nódulos (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade hidrolítica da F-ATPase em fração mitocondrial de raízes e nódulos de plantas de soja cv BRS 133 colhidas entre o estágio de crescimento v3/v4, inoculadas com as quatro estirpes de *Bradyrhizobium* recomendadas para soja no Brasil ou sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$)

Tratamentos	Atividade das bombas de H^+	
	Raiz	Nódulo
	$\mu\text{mol Pi mg}^{-1} \text{min}^{-1}$	
<i>B. elkanii</i>		
BR 29	16,75 b	61,75 b
BR 96	22,69 a	122,98 a
<i>B. japonicum</i>		
BR 85	14,12 b	61,51 b
BR 86	7,68 c	42,43 b
$\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	11,97 bc	64,16 b
CV (%)	18	18

Valores médios de 8 repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A maior atividade de F-ATPase da BR 96 (em *B. elkanii*) pode representar uma resposta bioenergética a uma maior demanda metabólica por essa estirpe.

Assim, na presente condição experimental, somente as plantas inoculadas com a estirpe BR 96 apresentam evidências de uma ativação diferencial da energética mitocondrial.

6.3.3 Efeito da inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* sobre a atividade da P-ATPas, V-ATPase e V-PPase

Para avaliar as atividades das bombas de prótons da plasmalema e do tonoplasto, diferentes inibidores específicos foram utilizados. As vesículas microssomais isoladas de raízes e nódulos apresentaram um padrão de ativação das bombas de prótons diferente do encontrado na fração mitocondrial, onde as estirpes *B. elkanii* apresentaram as maiores atividades (Figura 8).

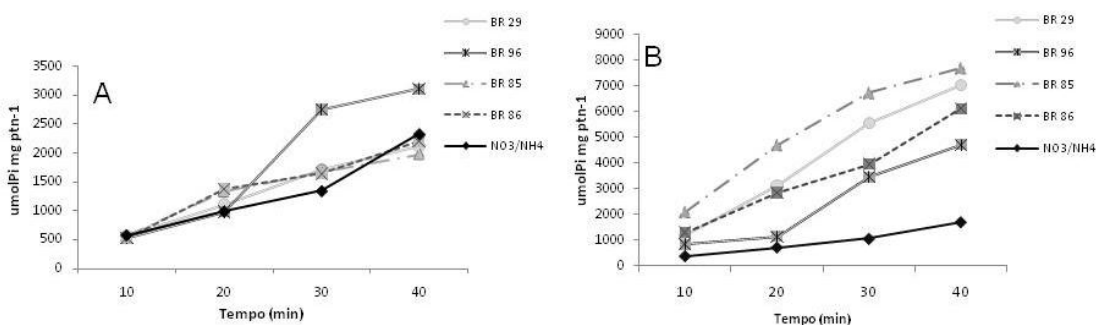


Figura 8: Cinética temporal da hidrólise de ATP mediada pela P-ATPase de microssomas de raízes (A) e nódulos (B) de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29 e BR 96) e *B. japonicum* (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$).

As vesículas de membrana plasmática e tonoplasto isoladas de plantas de soja inoculadas exibiram estímulos evidentes das atividades de hidrólise de ATP sensível a concanamicina (V-ATPase) e de PP_i dependente de K^+ (V-PPase). Pode-se observar que para a V-ATPase houve diferença entre os tratamentos e que a maior atividade dessa bomba ocorreu na raiz da planta inoculada com a estirpe BR85, enquanto que para a H^+ -PPase as duas estirpes *B. japonicum* (BR 85 e BR 86) apresentaram maior atividades hidrolíticas. A atividade hidrolítica sensível a vanadato (H^+ -ATPase tipo P), não apresentou diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 8).

Tabela 8 - Atividade específica da hidrólise de ATP mediada pela P-ATPase, sensível a vanadato; V-ATPase, sensível a bafilomicina; e H⁺-PPase estimulada a KCl de microsomas de raízes e nódulos de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre estágio v3/v4, inoculadas com *Bradyrhizobium elkanii* (BR 29 e BR 96) e *B. japonicum* (BR 85 e BR 86) e sob adubação nitrogenada (NO₃⁻/NH₄⁺).

Raiz	Atividade das bombas de H ⁺		
	Membrana Plasmática	Tonoplasto	Tonoplasto
	H ⁺ -P-ATPase	H ⁺ - V-ATPase	H ⁺ -PPase
Estirpes	μmol Pi mg ⁻¹ min ⁻¹		
BR 29	56 ^{ns}	20 b	23 ab
BR 96	68	22 ab	15 b
BR 85	57	26 a	28 a
BR 86	58	8 c	31 a
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	53	8 c	1 c
CV(%)	20	12	20

Nódulo	Membrana Plasmática	Tonoplasto	Tonoplasto
	H ⁺ -ATPase	H ⁺ -ATPase	H ⁺ -PPase
	μmol Pi mg ⁻¹ min ⁻¹		
BR 29	159 B	85 b	191 a
BR 96	94 C	42 c	146 a
BR 85	215 A	118 a	202 a
BR 86	139 B	86 b	150 a
NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	39 D	19 d	13 b
CV(%)	16	14	26

Valores médios de 8 repetições. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Já microsomas isolados de nódulos, enriquecidos com membranas peribacterianas (MPB), seguiram uma mesma tendência no que tange as mudanças promovidas nas atividades das H⁺-ATPases tanto do tipo P quanto nas do tipo V, onde as bombas de nódulos da estirpe BR 85 (*B. japonicum*) apresentaram a maior ativação dentre todos os tratamentos inoculados. Todavia, as atividades de todas as plantas inoculadas, independente da estirpe de bactéria utilizada, foram significativamente maiores quando comparadas a atividade ATPásica apresentada por microsomas oriundos de plantas com adubação nitrogenada adequada. Portanto, pode-se concluir que a energização da membrana plasmática das células da planta se apresenta diferencialmente ativada durante a simbiose ativa, em relação ao que se verifica nas células de plantas sob adubação nitrogenada. Parte desta ativação pode estar relacionada à maior atividade de transporte associada à interface de troca de nutrientes e outros metabólitos já descrita como característica das MPB. Estudos prévios com

simbiossomas intatos de soja mostraram que H⁺-ATPases estão presentes na MPB e bombeiam prótons formando um potencial de membrana e um gradiente de pH (acidificando o lúmen do symbiossomo), apesar destes encontrarem atividades de hidrólise sensível a vanadato (~0,2 μmol mg ptn⁻¹ h⁻¹) muito menores do que encontramos no presente trabalho (Udvardi et al., 1989; Udvardi et al., 1991; Dubrovo et al., 1992; Szafran e Haaker, 1995).

As atividades hidrolíticas de ATP sensível (V-ATPase) a concanamicina e PP_i estimulada por K⁺ (H⁺-PPase) das vesículas microssomais de nódulos contendo MPB, também mostraram atividades específicas maiores para membranas oriundas de plantas inoculadas com *B. japonicum* e *B. elkanii*, em comparação com o que ocorre em microssomos de plantas tratadas com adubação nitrogenada adequada (Tabela 8). A maior ativação de todas estas de bombas de H⁺ nos tratamentos inoculados sugere que a absorção do N presente do solo, quando este nutriente está disponível em concentrações adequadas, parece exigir menos energia metabólica do que a requerida durante a simbiose com as bactérias diazotróficas, pelo menos no que concerne ao metabolismo inerente às membranas plasmática e vacuolar.

Não foi possível estabelecer uma relação direta entre as diferenças verificadas nas atividades das H⁺-ATPases dos tipos P ou V com o fenômeno relacionado a eficiência diferencial da FBN dependente do inóculo, no qual as estirpes *B. elkanii* produzem o dobro de nódulos que as estirpes *B. japonicum* para alcançar a mesma taxa de FBN. Porém, uma relação parece existir na atividade de hidrólise de PP_i, onde verifica-se que membranas de raízes inoculadas com *B. japonicum* BR 85 e BR 86 apresentam V-PPases mais ativas do que as com *B. elkanii* BR 29 e BR 96 (Tabela 8). E como tal diferença não se verifica em microssomas de nódulos (Tabela 8), esta ativação diferencial do metabolismo de pirofosfato parece se desenvolver apenas nas células da raiz colonizadas.

Como o PP_i é um substrato que não deriva do catabolismo de carboidratos, sendo produzido em várias reações de biossínteses (de proteínas, lipídeos e açúcares), a ativação da V-PPase tem sido relacionada a várias respostas a condições ambientais adversas que causam estresses energéticos. Assim, a maior atividade desta enzima induzida pelas estirpes *B. japonicum* pode estar diretamente relacionada à capacidade desta interação simbiótica ser mais

eficiente do que a estabelecida com *B. elkanii*, a qual necessita do dobro de massa de nódulos para realizar a mesma taxa de FBN. É tentador especular que a ativação da H⁺-PPase possa proporcionar uma economia de ATP significativa que possa ser mobilizada para proporcionar uma maior eficiência do dispendioso processo de redução do N₂. Em concordância com essa possibilidade verificou-se que a atividade V-ATPásica associada a raízes colonizadas por *B. japonicum* (BR 86) foi a menor dentre as inoculadas e semelhante à pequena atividade apresentada por plantas adubadas (Tabela 8). Apesar do mesmo não se verificar com a atividade V-ATPásica associada a raízes colonizadas por *B. japonicum* (BR 85), não se pode descartar a possibilidade de esta enzima ser inibida em condições fisiológicas, em resposta à ativação da V-PPase.

A atividade de translocação de H⁺ acoplada à hidrólise de ATP pôde ser observada através da formação do gradiente de H⁺ dependente de ATP medido pela queda de fluorescência da sonda ACMA (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**).

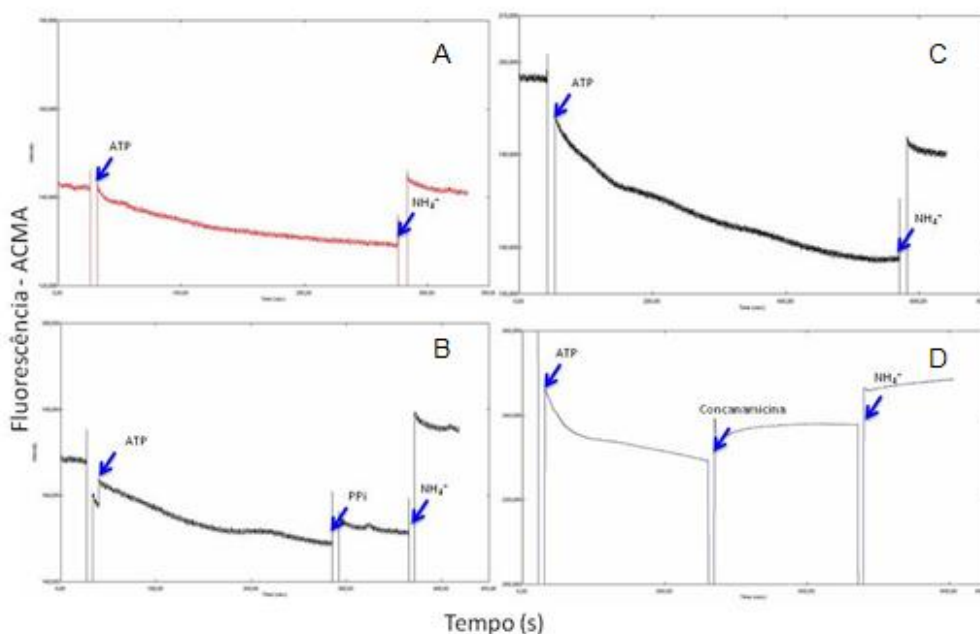


Figura 9: Formação de gradiente de H⁺ em fração microsomal pela P_ATPase (A e C) e V-ATPase (B e D) por variação em fluorescência de ACMA sobre a energização de microsomas de raiz (A e B) e microsomas de nódulo enriquecidos com membrana peribacteriana (C e D). Após a formação do gradiente de H⁺, concanamicina ou NH₄Cl foi adicionado, promovendo a recuperação da fluorescência inicial.

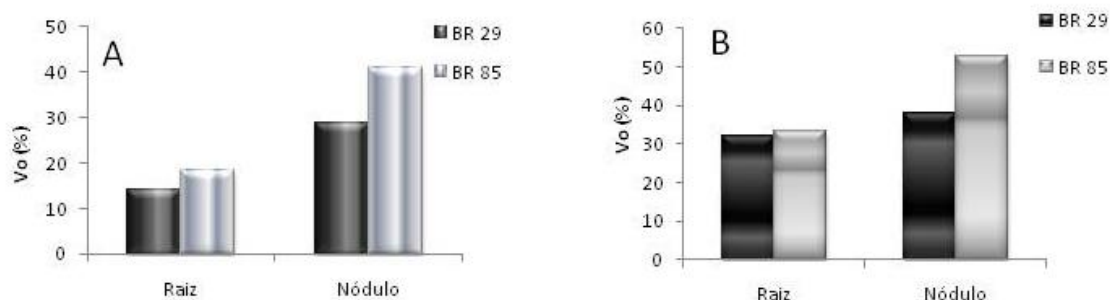


Figura 10: Velocidade inicial do gradiente de prótons gerados pela P-ATPase (A) e V-ATPase (B) de vesículas isoladas de raiz e nódulos de plantas de soja cv BRS133 colhidas entre o estágio v3/v4 inoculadas com *B. elkanii* (BR 29) e *B. japonicum* (BR 85)

Os dados de transporte de prótons foram obtidos somente para plantas inoculadas com as estirpes BR 29 e BR 85 (Figura 10), o que impossibilita uma avaliação comparativa com a atividade de transporte das demais estirpes. Com os dados apresentados só é possível afirmar que parece não existir diferenças significativas de acoplamento nas H^+ -ATPases P e V, pois ambas apresentaram um mesmo perfil de ativação tanto para a atividade de hidrólise quanto para a translocação de H^+ , sendo maior em plantas inoculadas com *B. japonicum* (estirpe BR 85) quando comparada às inoculadas com *B. elkanii* (estirpe BR 29).

Em conjunto, os resultados revelam uma inusitada ativação das principais bombas de prótons responsáveis pela energização da plasmalema e do tonoplasto, com significativas diferenças induzidas por diferentes inóculos, suscitando a existência de mecanismos ainda inexplorados pelos quais estas H^+ -ATPases e H^+ -PPases influenciam ou mesmo regulam os processos simbióticos entre as plantas e as bactérias diazotróficas, via modulações da eficiência energética da FBN e/ou na translocação do N fixado. Uma hipótese instigante foi postulada por Szafram & Harker (1995), os quais vislumbraram a possibilidade de reversibilidade da P-ATPase de PBM, o que consiste em mais um dos possíveis mecanismos pelos quais as bombas poderiam contribuir para uma maior eficiência do processo de FBN. Experimentos suplementares serão necessários para prover uma visão mais ampla sobre o papel das bombas de H^+ não só na energização da troca de metabolitos bem como na eficiência energética global do processo de FBN realizada nos simbiossomas.

6.4 CONSIDERAÇÃO FINAL

- 1) As estirpes utilizadas em inoculantes comerciais no Brasil induzem uma ativação diferencial das bombas de H^+ da plasmalema e do tonoplasto, bem superior a verificada sob adubação nitrogenada. Isto sugere que a absorção do N presente do solo, quando este nutriente está disponível em concentrações adequadas, compromete menos energia metabólica do que a requerida durante a simbiose com bactérias diazotróficas, pelo menos no que concerne ao metabolismo inerente às membranas plasmática e vacuolar em plantas de soja.
- 2) Membranas de raízes inoculadas com *B. japonicum* (BR 85 e BR 86) apresentam V-PPases mais ativas do que as inoculadas com *B. elkanii* (BR 29 e BR 96); e tal ativação diferencial pode estar relacionada com a maior eficiência da simbiose evidenciada pela diferença na massa de nódulos necessária para realizar a FBN nestas estirpes
- 3) Existem diferenças significativas na atividade das bombas de prótons em diferentes simbioses e condições de adubação nitrogenada, suscitando que mais ênfase deva ser dada aos estudos dos mecanismos pelos quais as bombas de H^+ -ATPases e H^+ -PPases energizam e regulam os processos simbióticos entre plantas e bactérias diazotróficas. Tal descoberta revela o potencial funcional destes sistemas para o controle da eficiência energética durante o processo de redução de N_2 , conhecimento que pode fundamentar o futuro estabelecimento de procedimentos de seleção de estirpes, cultivares, manejo ou mesmo manipulações genéticas que incrementem os efeitos deste processo sobre a produtividade da soja.

6.5 CONCLUSÃO

A ativação diferencial das bombas de H^+ da plasmalema e do tonoplasto revelada neste estudo indica que os processos inerentes a simbiose demandam maior energia metabólica em comparação a adubação nitrogenada e que existe uma estimulação destes sistemas bem mais intensa nas membranas de células de nódulos que nas de células de raízes.

A H^+ -PPase de microsomas isolados de raízes inoculadas com *B. japonicum* alcançou uma atividade média de $30 \mu\text{mol PPI mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ sendo menor para as inoculadas com *B. elkanii* com uma média de $19 \mu\text{mol PPI mg}^{-1} \text{min}^{-1}$, o que pode sugerir a participação destas bombas num mecanismo que promova uma economia energética (de ATP) associada a maior eficiência no processo de FBN verificada em plantas inoculadas com *B. japonicum* em comparação com *B. elkanii*.

Em conformidade com esta hipótese, o monitoramento do gradiente prótons mostrou que nódulos de plantas de soja inoculadas com *B. japonicum* possuem H^+ -ATPases do tipo P e V com maior acoplamento que as inoculadas com *B. elkanii*, sugerindo uma melhor eficiência na transdução da energia química do ATP na formação do gradiente eletroquímico que energiza as membranas plasmática e vacuolar das células radiculares, e a MPB dos nódulos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL,A.K. & KEISTER, D.L. Physiology of *ex planta* nitrogenase activity in *Rhizobium japonicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1592-1601, 1983.

ALVES,B.J.R.; OLIVEIRA,O.C.D.; BODDEY,R.M.; URQUIAGA,S. Métodos isotópicos. In: SANTOS,G.A.; CAMARGO,F.A.O., ed. **Fundamentos da Matéria Orgânica do Solo**, Porto Alegre :Editora Genesis. p. 337-357, 1999.

ALVES,B.J.R.; ZOTARELLI,L.; BODDEY,R.M.; URQUIAGA,S. Soybean benefit to a subsequent wheat cropping system under zero tillage. **Nuclear Techniques in Integrated Plant Nutrient, Water and Soil Management**. Vienna :IAEA, p. 87-93. , 2002.

ALVES, B.J.R; ZOTARELLI, L; FERNANDES, F.M; HECKLER, J.C; DE MACEDO, R.A.T; BODDEY, R.M; JANTALIA, C.P; URQUIAGA, S. Fixação biológica de nitrogênio e fertilizantes nitrogenados no balanço de N em soja, milho e algodão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira (no prelo)**, 2006.

AMADO, T.J. C.; BAYER, C.; ELTZ, F.L.F.; BRUM, A.C.R. Potencial de culturas de cobertura em acumular carbono e nitrogênio no solo no plantio direto e na melhoria da qualidade ambiental. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, p. 189-197, 2001.

ATKINS, C.A. and SMITH, P. Ureide syntesis in legume nodules. In: Triplett, E. W. (ed.) **Prokaryotic Nitrogen Fixation**, Horizon scientific Press, Wymomdham, UK, p. 559-587, 2000.

BALDANI, J.I; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov. a root associated nitrogen fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.

BALDANI, J.I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; HOSTE, B.; KERTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of (*Pseudomonas*) *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov. and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

BASSARB S.; MELLOR R.B.; WERNER D. Evidence for two types of Mg⁺⁺-ATPase in the peribacteroid membrane from Glycine max root nodules. **Endocyt Cell Res**, v. 3, p. 189-196, 1986.

BERGERSEN, F.J.; PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L. Isotopic discriminations during the accumulation of nitrogen by soybean. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 15, p. 407-420, 1988.

BISHOP, P.E.; PREMAKUMAR, R. 1992. Alternative nitrogen fixation systems. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 736-762, 1992.

BISHOP, P.E.; JARLENSKI, D.M.L.; HETHERINGTON, D.R. Evidence for an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 150, n. 3, p. 1244-1251, 1980.

BLUMWALD E.; FORTIN M.G.; REA P.A.; VERMA DPS, POOLE RJ. Presence of host-plasma membrane type H⁺-ATPase in the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. **Plant Physiol**, v. 78, p. 665-672, 1985.

BODDEY, R.M.; JANTALIA, C.P.; CONCEIÇÃO, P.C.; ZANATTA, J.A.; BAYER, C.; MIELNICZUK, J.; DIECKOW, J.; SANTOS, H.P.; DENARDIN, J.E.; ALTA, C.; GIACOMINI, S.J.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S. Carbon accumulation at depth in Ferralsols under zero-till subtropical agriculture. **Global Change Biology**, v. 16, p. 784–795, 2010.

BODDEY, R.M.; PEOPLES, M.B.; PALMER, B.; DART, P.J. Use of the ¹⁵N natural abundance technique to quantify biological nitrogen fixation by woody perennials. **Nutrient Cycling in Agroecosystem**, v. 57, n. 3, p. 235-270, 2000.

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

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S. Calculations and assumptions involved in the use of the value and ^{15}N isotope dilution techniques for the estimation of the contribution of plant-associated biological N_2 fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 145, p. 151-155, 1992.

BODDEY R.M.; BODDEY L.H.; URQUIAGA S. A técnica de redução de acetileno na medição da fixação biológica de nitrogênio. EMBRAPA-CNPBS, **Documento No. 6**, Editora Universidade Rural, Itaguaí, RJ, Brasil. p. 37, 1990.

BODDEY, R.M. Methods for quantification of nitrogen fixation associated with gramineae. **Critical Reviews Plant Science**, v. 6, n. 3, p. 209-266, 1987.

BORTELS, H. Weitere untersuchungen uber die bedeutung von molybden, vanadium, wolfram und anderen erdascenstoffen fur stickstoffbindende und andere mikroorganismen. **Zentralblatt Bakteriologie, Parasitenkunde AbtII**, Stuttgart, v. 95, p. 193-218, 1932

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.7 2 p. 248-254, 1976.

BREMNER, J.M. Inorganic forms of nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. **Methods of Soil Analysis**, Madison, WI, USA :American Society of Agronomy, p. 1179-1237, 1965.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; CANNON, M.C.; BEYNON, J.; CANNON, F.C. Role of the *nifA* gene product in the regulation of *nif* expression in *klebsiella pneumoniae*. **Nature**, London, v. 294, p. 776-778, 1981.

BULEN, W.A.; BURNS, R.C.; LeCOMTE, J. R. The nitrogenase system from *Azotobacter* : two enzyme requirement for N_2 reduction, ATP-dependente H_2 evolution and ATP hidrolysis. **Proceedings of the National Academy of**

Sciences of the United States of America, Washington, v. 56, p. 979-986, 1966

CARROL, B.J. and MATHEWS, A. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. In: Greshoff, P. M. (ed.) **Molecular Biology of Symbiotic Nitrogen Fixation**, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 159-180, 1990.

CAVALCANTE, V.A. & DOBEREINER, J. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. **Plant.Soil**, v. 108, p. 23-31, 1988.

CHOURA, M.E REBAÏ, A. Identification and characterization of new members of vacuolar H⁺-pyrophosphatase family from *Oryza sativa* genome. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 6, p. 821-825, 2005.

CORZO J.; SANTAMARIA M.; GUTIERREZ-NAVARRO A.M. Transient energy coupling between rhizobia and legume cells mediated by the peribacteroid membrane ATPase proton pump. **Bioscience Reports** v. 17, p. 389-400, 1997.

DAVIS, R., LEHMAN, L.; PETROVICH, R.; SHAH, V.K.; ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, n. 5, p. 1445-1450, 1996.

DAY, D.A, COPELAND, L. Carbon metabolism and compartmentation in nitrogen fixing legume nodules. **Plant Physiol Biochem**, v. 29, p. 185-201, 1991.

DAY, D.A.; WHITEHEAD, L.F.; HENDRIKS J.H.M.; TYERMAN S.D. Nitrogen and carbon exchange across symbiotic membranes from soybean nodules. In: Tikhonovich IA, Provorov NA, Romanov VI, Newton WE (eds.) **Nitrogen Fixation fundamentals and applications**. Kluwer, Dordrecht, p. 557-564, 1995.

DOMIGAN, N.M.; FARNDEN, K.J.F.; ROBERTSON, J.G, MONK, B.C. Characterization of the peribacteroid membrane ATPase of lupin root nodules. **Arch Biochem Biophys**, v.264, p.564-573, 1988.

DELWICHE, C.C. & STEYN, P.L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. **Environmental Science and Technology**, v. 4, n. 11, p. 929-935, 1970.

DE MICHELIS, M.I.; SPANSWICK, R.M. H⁺-pumping driven by vanadate sensitive ATPase in membrane vesicles from corn roots. **Plant Physiology** v. 81, p. 542-547, 1986.

DIEKOW, J.; MIELNICZUK, J.; KNICKER, H.; BAYER, C.; DICK, D.P; KOGEL-KNABNER, I. Soil C and N stocks as affected by cropping systems and nitrogen fertilisation in a southern Brazil Acrisol managed under no-tillage for 17 years. **Soil & Tillage Research**, v. 81, n. 1, p. 87-95, 2005.

DILWORTH, M.J. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 127, p. 285-294, 1965.

DÖBEREINER, J.; BALDANI, V. L. D.; BALDANI, J. I. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Embrapa-SPI, Brasília, 1995. 60 p.

DOBEREINER, J.; BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I. Como isolar e identificar bacterias diazotroficas de plantas nao-leguminosas. Brasilia: Embrapa-SPI; Itaguai: Embrapa-CNPAB, p. 60, 1995.

DOBEREINER, J. Isolation and identification of root associated diazotrophs. **Plant Soil**, v. 110, p. 207-212, 1988.

DOBEREINER, J.; DAY, J.M. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and nitrogen-fixing sites. In: NEWTON, W.E.; NYMAN, C.J., ed. **Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation**. Pullman, WA, USA :Washington State University Press, p. 518-538. 1975.

DOBEREINER, J; FRANCO, A A; GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.5, p.155-161, 1970.

DROZDOWICZ Y.M. E REA P.A. Vacuolar H⁺-pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. **Trends in Plant Science**, v. 6, p. 206-211, 2001.

EADY, R.R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Reviews**, Washington, v. 96, p. 3013-3030, 1996

EVANS, H.J.; BURRIS, R.H.; Highlights in Biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. eds. **Biological Nitrogen Fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 1-42, 1992.

EVANS, H.J.; HARKER, A.R.; PAPEN, H.; RUSSEL, S.A.; HANUS, F.J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 335-361, 1987.

Evans, H.J.; Hanus, F.J.; Haugland, R.A.; Cantrell, M.A.; Xu, L. Hydrogen recycling in nodules affects nitrogen fixation and growth of soybeans. **Proc. World Soybean Conference**, 3rd, Ames, Iowa, pp. 935-42. Boulder, Colo: Westview. 1 262 pp. 1985.

EVANS, H.J.; EISBRENNER, G.; CANTRELL, M.A.; RUSSELL, S.A.; HANUS, F.J. The present status of hydrogen recycling in legumes. **Israel Journal of Botany, Jerusalem**, v. 31, n. 1, p. 72-88, 1982.

FAÇANHA, A.R., DE MEIS, L. Reversibility of H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds. **Plant Physiology** v. 116, p. 1487-1495, 1998.

FRED, E. B. and GRAUL, E. J. The effect of soluble nitrogenous salts on nodule formation. **Journal of the American Society of Agronomy**, v.8, p.316-328, 1916.

FISKE, C.F. and SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry**, v. 66, p. 375, 1925.

GIANNINI, J.L. and BRISKIN, D.P. Proton transport in plasma membrane and tonoplast vesicles from red beet (*Beta vulgaris* L.) storage tissue. **Plant Physiology**, v. 84p. 613, 1987.

GILLIS, M.; KERTERS, K.; HOSTE, B.; JANSSENS, D.; KROPPESTEDT, R.M.; STEPHAN, M P; TEIXEIRA, K.R.S.; DOBEREINER, J.; DELEY, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen fixing acetic acid bacterium associated with sugar cane. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 361-

364, 1989.

GUIMARÃES, A.P. Determinação do coeficiente de discriminação isotópica do ^{15}N relacionado ao processo de fixação biológica de nitrogênio em soja. Tese Mestrado, Depto. Solos, UFRRJ, 2005.

HAPER, J.E. and GIBSON, A H. Differential nodulation tolerance to nitrate among legume species. **Crop Science**, v. 24, p. 797-801, 1984.

HILL, S. Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In: Stacey, G. S.; Burris, R. H. and Evans, H. J. (eds) **Biological Nitrogen Fixation**. Chapman and Hall, New York, p. 86-113, 1992.

HOERING, T.C. and FORD, H.T. The isotope effect in the fixation of nitrogen by *Azotobacter*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 82, p. 376-378, 1960.

HU-CHENG, Z.; TING, Z.; J.I.A.W.; BAO-SHU,X. Effect of Ca^{2+} on H^{+} -ATPase activity of plasma membrane in wheat root. **Colloids and surfaces B-biointerfaces**. v. 28, n. 2-3, p. 147-152, 2003.

HUSS-DANIEL, K. The physiology of actinorhizal nodules. In: Schwintzer, C. R. and Tjepkema, J. D. (eds) **The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants**. Academic Press, New York, p. 129-156, 1990.

ISRAEL, D.W.; HOWARD, R.L.; EVANS, H.J.; RUSSELL, S.A. Purification and characterization of the molybdenum-iron protein component of nitrogenase from soybean nodule bacteroids. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 2, p. 500-508, 1974.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic Hup mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 7, p. 325-329, 1989.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Partitioning of nitrogen from biological fixation and fertilizer in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, Oxford, v. 69, p. 55-63, 1987.

JANTALIA, C.P.; SANTOS, H.P.; DENARDIN, J.E.; KOHHANN, R.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Influência de rotações de culturas no estoque de carbono e nitrogênio do solo sob plantio direto e preparo convencional. **Agronomia** (UFRRJ), v. 37, p. 92-97, 2003.

JANTALIA, C.P. Estudo de sistemas de uso do solo e rotações de culturas em sistemas agrícolas brasileiros: dinâmica de nitrogênio e carbono no sistema solo-planta-atmosfera. Tese de doutorado, Depto Fitotecnia, UFRRJ, 2005.

JANTALIA, C.P.; RESCK, D.V.S; ALVES, B.J.R; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Effect of tillage intensity on carbon stocks under a soybean based crop rotation in the Brazilian Cerrado. **Soil & Tillage Research** (no prelo), 2006.

JUNK, G.; SVEC, H. J. The absolute abundance of the nitrogen isotopes in the atmosphere and compressed gas from various sources. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, Oxford, v. 14, p. 234-243, 1958.

KALAMPANAYIL, B.D. and Wimmer L.E. Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H⁺-AT&Pase in tomato. **Plant Cell and Environment**, v. 24, p. 999-1005, 2001.

KANCZEWSKA, J.; MARCO, S.; VANDERMEEREN, C.; MAUDOUX, O.; RIGAUD, J-L.; BOUTRY, M. Activation of the plant plasma membrane H⁺ -ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. **PNAS**, v. 102, n. 33, p. 11675-11680, 2005

KENNEDY, C. and TOUKDARIAM, A. Genetics of Azotobacters: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 227-258, 1987.

KLUCAS, R.V.; KOCH, B.; RUSSELL, S.A.; EVANS, H.J. Purification and some properties of the nitrogenase from soybean (*Glycine max* Merr.) nodules. **Plant Physiology**, v. 43, p. 1906-1912, 1968.

MIELNICZUCK, J.; TESTA, V.M.; TEIXEIRA, L.A.J.; PALADINI, F.L.S.; BAYER, C. Recuperação da produtividade do solo por sistemas de cultivos IN: **Curso Intensivo sobre Plantio Direto na Palha**. Fundação ABC, Ponta Grossa ,PR,. p. 116-123, 1996.

MINCHIN, F.R. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules, **Soil Biology & Biochemistry**, v.29, n. 5, p. 881-888, 1997.

MINCHIN, F.R.; BECANA, M.; SPRENT, J.I. Short-term inhibition of legume N₂-fixation by nitrate. II. Nitrate effects on nodule oxygen diffusion. **Planta**, v. 180, p. 46-52, 1989.

MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H.; RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. **Plant, Cell and Environmental**, v. 4, p. 4-26, 1981.

MULLINEAX, P.M.; GALLON, J.R.; CHAPLIN, A.E. Acetylene reduction (nitrogen fixation) by cyanobacteria grown under alternating light-dark cycles. **FEMS Microbiological Letters**, v. 10, p. 245-247, 1981.

NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J. *Rizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 36, p. 1179-1192, 1985.

NISHI, C. Y. M. Infecção, competitividade e eficiência da FBN em soja inoculada com estirpes de *Bradyrhizobium* SEMIA 566, SEMIA 586, SEMIA 5079 e SEMIA 5080. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR. 1995

OLIVEIRA, J.C.; RAMOS, M.L. G.; DUQUE, F. F. Inoculação da soja, em solo de cerrado, no primeiro ano de cultivo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 15, p. 273-276, 1991.

OKITO, A.; ALVES, B.J.R; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Isotopic fractionation during N₂ fixation by four tropical legumes. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, n. 7, p. 1179-1190, 2004.

OU YANG, L-J.; DAY, D.A. Transport properties of symbiosomes isolated from siratro nodules. **Plant Physiol Biochem** v. 30, p. 613-623, 1992.

PARSONS, R.; SATNFORD, A.; RAVEN, J.A.; SPRENT, J.I. Nodule growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. **Plant, Cell and Environment**, v. 16, p. 125-136, 1993.

PEDROSA, F.O. and YATES, M.G. Regulation of nitrogen fixation (*nif*) genes of *Azospirillum brasilense* by *nifA* and *ntr(gln)* type gene products **FEMS Microbiology Letters**, v. 23, p. 95-101, 1984.

PATE, J.S. and LAYZELL, D.B. Energetics and biological costs of nitrogen assimilation. In: Mifflin, B. J. and Lea, P. J. (eds) **The Biochemistry of Plants**, Academic Press, San Diego, California, v. 16, p. 1-41, 1990.

PEOPLES, M.B.; BODDEY, R.M.; HERRIDGE, D.F. Quantification of nitrogen fixation. In: LEIGH, G.J., ed. **Nitrogen Fixation at the Millenium**. Brighton :Elsevier, p. 357-389. 2002.

PEOPLES, M.B.; TURNER, G.L.; SHAH, Z.; SHAH, S. H.; ASLAM, M.; ALI, S.; MASKEY, S. L.; BHATTARAI, S.; AFANDI, F.; SCHWENKE, G.D.; HERRIDGE, D.F. Evaluation of the ¹⁵N natural abundance technique for measuring N₂ fixation in experimental plots and farmer's fields. In: INTERNATIONAL WORKSHOP ON MANAGING LEGUME NITROGEN FIXATION IN CROPPING SYSTEMS OF ASIA, 1997, Hyderabad, Índia. **Proceedings**. Índia: ICRISAT, Editores: O. P. Rupela, C. Johansen, D. F. Herridge. p. 57-75, 1997.

PEOPLES, M.B.; FAIZAH, A.W.; RERKASEM, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra: ACIAR, 1989.

PEOPLES, M.B.; GAULT, R.R.; LEAN, B.; SYKES, J.D.; BROCKWELL, J. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. **Soil Bioloy & Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 4/5, p. 553-561, 1995.

RAMOS, M.G; VILLATORO, M.A.A; URQUIAGA, S; ALVES, B.J.R; BODDEY, R.M. Quantification of the contribution of biological nitrogen fixation to tropical green manure crops and the residual benefit to a subsequent maize crop using ¹⁵N-isotope techniques. **Journal of Biotechnology**, v. 91, n.(2-3), p. 105-115, 2001.

RAMOS, A.C.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Molecular mechanisms of the plant growth promotion and biocontrol by humic

substances and soil microorganisms. In: Ashok K. Chauhan e Ajit Varma. (Org.). Text Book on Molecular Biotechnology. 1 ed. New Delhi, Mumbai, Bangalor: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2009, v. xvi, p. 1-1336.

ROBERTS, G.P.; LUDDEN, P.W.; BURRIS, R. H.; FITZMAURICE, W.P.; FU, H.A.; NIELSEN, G.; LIANG, J.L.; LEHMAN, L.; WOEHLE, D.; WIRT, H.; MONTGOMERY, S.; DAVIS, R.; BAO, Y. The genetics and biochemistry of the reversible ADP-ribosylation system of *Rhodospirillum rubrum* and *Azospirillum lipoferum*. In: Gresshoff, P. M.; Roth, L. E.; Sracey, G.; Newton, W. E. (eds) **Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives**. Chapman and Hall, New York, p. 475-481, 1990.

ROBERTSON J.G.; WARBURTON, M.P.; LYTTLETON, P.; FORDYCE, AM.; BULLIVANT, S. Membranes in lupin root nodules II. Preparation and properties of peribacteroid membranes and bacteroids envelope inner membranes from developing lupin nodules. **J Cell Sci**. v. 30, p. 151-174, 1978.

ROBRISH, S.A. and MARR, M.G. Extraction of nitrogenases of *Klebsiella pneumoniae* and *Azotobacter chroococcum*. **Journal of Bacteriology**, v. 83, p. 158-162, 1962.

ROBSON, R.L.; WOODLEY, P.R.; PAU, R.N.; EADY, R.R. Second gene (*nifH**) coding for a nitrogenase iron-protein in *Azotobacter chroococcum* is adjacent to a gene coding for a ferredoxin-like protein, **EMBO. J**, v. 5, p. 1159-1163, 1986.

ROWELL, P; JAMES, W; SMITH, W.L; HANDLEY, L; SCRIMGEOUR, C.M. ¹⁵N discrimination in molybdenum- and vanadium-Grown N₂-fixing *Anabaena Variabilis* and *Azotobacter Vinelandii*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 14, p. 2177-2180, 1998.

SAARI, L.L. and LUDDEN, P.W. The energetics and energy costs of symbiotic nitrogen fixation. In: Kosuge, T. and Nester, E. (eds) **Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives**. v.II, Macmillan, New York, p. 147-193, 1986.

SCHERINGS, G.; HAAKER, H.; WASSINK, H.; VEEGER, C. On the formation of an oxygen-tolerant three-component complex from *Azotobacter vinelandii*.

European Journal of Biochemistry, v. 135, p. 591-599, 1983.

SCHUBER, K.R. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis, transport and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 37, p. 539-574, 1936.

SELLSTEDT, A. and ATKINS, C. A. Composition of amino acids transported in xylem of *Casuarina* spp. **Journal of Experimental Botany**, v. 42, p. 1493-1497, 1991.

SHAH, V.K.; DAVIS, L.C.; BRILL, W.J. Nitrogenase I. Repression and derepression on the iron-molybdenum and iron proteins of nitrogenase in *Azotobacter vinelandii*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 256, p. 498-511, 1972.

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

SHIRATAKE, K.; KANAYAMA, Y.; MAESHIMA, M.E.; YAMAK, S. Changes in H⁺-pumps and tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. **Plant Cell Physiology**, v. 38, p. 1039-1045, 1997.

SISTI, C.P.J; SANTOS, H.P.D.; KOCHHANN, R.A.; ALVES, B.J.R.; URQUIAGA, S.; BODDEY, R.M. Change in carbon and nitrogen stocks in soil under 13 years of conventional or zero tillage in southern Brazil. **Soil and Tillage Research**, v..76, n..1, p..39-58, 2004.

SOMASEGARAN, P. and HOBEN, H. J. **Handbook for Rhizobia: Methods in legume-rhizobium technology**, Berlin, Springer Verla, 1994.

SRA, A K; HU, Y; MARTIN, G E; SNOW, D D; RIBBE, M W; KOHEN, A. Competitive ¹⁵N kinetic isotope effects of nitrogenase catalyzed dinitrogen reduction. **Journal of the American Chemical Society**, 2004.

SPRENT, J.I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms; pure and applied aspects**. London: Chapman and Hall, p. 256. 1990.

STEPHAN, M.P.; OLIVEIRA, M.; TEIXEIRA, K.R.S.; MARTINEZ DRETS, G.;

DOBEREINER, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 77, p. 67-72, 1991.

STELLE, K.W.; BONISH, R.M.; DANIEL, R.M.; O'HARA, G. W. Effect of Rhizobial strains on host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 72, p. 1001-1004, 1983.

STRANDBERG, G.W. and WILSON, P.W. Formation of the nitrogen-fixing enzyme system in *Azotobacter vinelandii*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 25-31, 1968.

STREETER, J.G. Recent development in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. **Symbiosis**, v. 19, p. 175-196, 1995.

STREETER, J. G. Nitrate inhibition of the legume nodule growth and activity. II Short-term studies with high nitrate supply. **Plant Physiology**, v. 77, p. 325-328, 1985.

STREETER, J. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 7, p. 1-23, 1988.

SONDERGAARR, T.E.; SCHULTZ, A.; PALMGREN, M.G. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, v. 136, p. 2475-2482, 2004.

SZAFRAN M.M.; HAAKER, H. Properties of the peribacteroid membrane ATPase of pea root nodules and its effect on the nitrogenase activity. **Plant Physiol**, v. 108, p. 1227-1232, 1995.

TARRANT, J.J.; KRIEG, N.R.; DOBEREINER, J. 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. **Canadian Journal of Botany**, v. 24, n. 8, p. 967-980, 1978.

TEIXEIRA, K.R. dos S. Bases moleculares e genética da Fixação de nitrogênio. Seropédica: Embrapa-CNPAB, Embrapa-CNPAB. **Documentos 32**, p. 26, 1997.

TURNER, G.L.; BERGERSEN, F.J. Evaluating methods for determination of δ¹⁵N

in nitrogen fixation studies. In: GIBSON, A.H.; NEWTON, W.E., ed. **Current Perspectives in Nitrogen Fixation**. Canberra : Australian Academy of Sciences, p. 482-483. 1981.

TYERMAN S.D.; WHITEHEAD, L.F.; DAY, D.A. A channel-like transporter for NH_4 on the symbiotic interface of N_2 -fixing plants. **Nature**, v. 378, p. 629-632, 1995

UDVARDI, M.K. and DAY, D.A. Electrogenic ATPase activity on the peribacteroid membrane of soybean (*Glycine max* L.) root nodules. **Plant Physiol**, v. 90, p. 982-987, 1989.

UDVARDI, M.K. and DAY, D.A. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**. v. 48, p. 493-523, 1997.

UDVARDI, M.K.; LISTER, D.L.; DAY, D.A. ATPase activity and anion transport across the peribacteroid membrane of isolated soybean symbiosomes. **Arch Microbiol**, v. 156, p. 362-366, 1991.

UNKOVICH, M.; PATE, J.S. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N_2 fixation by annual legumes. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 211-228, 2000.

van BERKUN, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3835-3841, 1990.

VANCE, C.P. and HEICHEL, G.H. Carbon in N_2 fixation: limitation or exquisite adaptation. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v. 42, p. 373-392, 1991.

VERMA, D.P.S.; KAZAZIAN, V.; ZOGBI, V.; BAL, A.K. Isolation and characterization of the membrane envelope enclosing the bacteroids in soybean root nodules. **J Cell Biol**. v. 78, p. 919-936, 1978.

WALSH, K.B.; Ng, B.H.; CHANDLER, G. E. Effects of nitrogen nutrition on xylem sap composition of *Casuarinaceae*. **Plant and Soil**, v. 81, p. 291-292, 1984.

WANI, S.P.; RUPELA, O P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 29-49, 1995

WHELLER, C.T. and BOND, B.G. The amino acids of non-legume root nodules. **Phytochemistry**, v. 9, p. 705-708, 1970.

WHITEHEAD LF, DAY DA. The peribacteroid membrane. **Physiol Plant**. v. 100, p. 30-44, 1997.

WHITEHEAD, L.F.; TYERMAN, S.D.; SALOM, C.L.; DAY, D.A. Transport o fixed nitrogen across symbiotic membranes of legume nodules. **Symbiosis**, v. 19, p. 141-154, 1995.

WITTY, J.F.; SKOT, L.; REVSBECH, N.P. Direct evidence for changes in the resistance of legume root nodules to O₂ diffusion. **J Exp Bot** , v. 38, p. 1129-1140, 1987.

YONEYAMA, T.; FUJITA, K.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; KAMBAYASHI, I.; YAZAKI, J. Variation in natural abundance of ¹⁵N among plant parts and in ¹⁵N/¹⁴N fractionation during N₂ fixation in the legume-rhizobia symbiotic system. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 27, p. 791-799, 1986.

ZINONI, F.; ROBSON, M.; ROBSON, R.L. Organization of potential alternative nitrogenase genes from *Clostridium pasteurianum*. **Biochemica et Biophysica Acta**, Amsterdam, n. 1174, p. 83-86, 1993.

ZOTARELLI, L. Influência da rotação de culturas na agregação do solo, acumulação de carbono e emissões de óxido nitroso nos sistemas de plantio direto e convencional. Tese Doutorado, Depto. Solos, UFRRJ, 2005.

ZOTARELLI, L. Balanço de nitrogênio na rotação de culturas em sistemas de plantio direto e convencional na região de Londrina-PR. Dissertação de Mestrado Depto. Solos, UFRRJ, p. 128, 2000.