

## PRÁTICA Nº. 6.7

## FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

## INTRODUÇÃO

O nitrogênio é o macronutriente mais abundante nos tecidos das plantas. A atmosfera terrestre é um grande reservatório de nitrogênio, mas apesar de ser composta por aproximadamente 78% de N<sub>2</sub>, a maioria dos seres vivos não tem a capacidade de usá-lo diretamente para produzir aminoácidos (proteínas) e outras substâncias orgânicas, necessitando de compostos mais reativos como o amônio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ou o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>), presentes no solo. Esses compostos não são tão abundantes quanto o nitrogênio gasoso e, por isso, a escassez de nitrogênio no solo é, normalmente, o principal fator limitante no crescimento vegetal.

A fixação de nitrogênio industrial tem um alto custo energético, pois depende da queima de combustíveis fósseis. Nesse processo, o N<sub>2</sub> reage com o H<sub>2</sub> na presença de metais catalisadores em alta temperatura e pressão, formando amônia (NH<sub>3</sub>). O hidrogênio, derivado de gás natural, petróleo ou carvão é o responsável pelo elevado custo energético da reação. Apesar disso, em países desenvolvidos como nos Estados Unidos, esse processo contribui com um terço do nitrogênio fixado por ano, evidenciando as vantagens e a redução nos custos de produção em culturas que fixam o N<sub>2</sub> atmosférico, como ocorre, por exemplo, com a soja nos cerrados do Brasil.

A fixação biológica do nitrogênio (N<sub>2</sub>) é o processo pelo qual este elemento químico é capturado da atmosfera e reduzido a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, que combinado com compostos orgânicos produz aminoácidos e outras substâncias contendo nitrogênio. A fixação do nitrogênio é catalisada pela nitrogenase. Esta enzima utiliza ATP na catálise enzimática, tornando a fixação biológica um processo metabolicamente dispendioso. A equação que resume esse processo é apresentada a seguir:



Bactérias fixadoras de nitrogênio formam associações simbióticas com as plantas. As mais comuns são a *Rhizobium* e a *Bradyrhizobium* que colonizam raízes de leguminosas. A associação entre as bactérias e as plantas é altamente especializada. O resultado dessa simbiose é um solo enriquecido em nitrogênio. Essas bactérias (rizóbios) penetram nos pelos radiculares das leguminosas quando elas ainda estão no estágio de plântulas, formando estruturas tubulares denominadas canais de infecção. Ao aumentarem de tamanho e se tornarem fixadores de nitrogênio, os rizóbios param de se multiplicar e são, então, denominados bacteróides (ou bacterióides). Com a proliferação contínua dos bacteróides e também das células corticais das raízes, surgem crescimentos tumorais, conhecidos como nódulos.

Para o funcionamento desse processo, é necessária a regulação da concentração de oxigênio (O<sub>2</sub>) nos nódulos, uma vez que esse gás é um potente inibidor irreversível da enzima nitrogenase. Todavia, as bactérias envolvidas no processo são aeróbias, o que exige a participação de uma molécula transportadora de oxigênio, a leg-hemoglobina. A leg-hemoglobina é uma hemoproteína encontrada em concentrações elevadas no citoplasma das células do nódulo (700 µM em soja), conferindo-lhes uma coloração rosada. A porção heme dessa proteína é sintetizada pelo DNA bacteriano enquanto a porção globina é sintetizada pelo DNA da planta. A leg-hemoglobina apresenta 10 vezes mais afinidade pelo oxigênio (K<sub>m</sub> ≈ 0,01 µM) do que a cadeia β da hemoglobina humana. Estudos recentes indicam que leg-hemoglobina armazena uma quantidade suficiente de oxigênio para a manutenção da respiração nodular por apenas poucos segundos, permitindo a respiração da bactéria (importante para suprir a demanda de ATP) sem que ocorra a inativação da nitrogenase.

Nas cianobactérias, a anaerobiose é possibilitada pela presença de células especializadas denominadas heterocistos. Os heterocistos são células com paredes espessadas que se diferenciam quando as cianobactérias são privadas de  $\text{NH}_4^+$ . Tais células não apresentam fotossistema II, responsável pela produção de oxigênio nos cloroplastos e que poderia inativar irreversivelmente a nitrogenase. Outra relação simbiótica de grande interesse agrônomico é observada entre *Azolla* (uma pequena pteridófito aquática) e *Anabaena* (uma cianobactéria fixadora de nitrogênio que vive nas cavidades de *Azolla*). Essa relação é única, pois é mantida durante todo o ciclo de vida da planta. Na Ásia, seu crescimento massivo é permitido em plantações de arroz, pois estas acabam sombreando as plantas de *Azolla* e, à medida que esta pteridófito morre, o nitrogênio é liberado para a nutrição das lavouras. A associação *Azolla-Anabaena* pode fixar até 0,5 kg de nitrogênio por hectare/dia, taxa suficiente para nutrir uma plantação de arroz.

## OBJETIVOS

Observar a ocorrência de fixação biológica do nitrogênio e a sua importância para o desenvolvimento das plantas.

## MATERIAIS

- Vasos de argila



- Areia grossa lavada



- Sementes de milho e de feijão (ou soja)



- Formol



- Inoculantes comerciais (*Bradyrhizobium japonicum* ou *Sinorhizobium fredii* para soja e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* para feijão)



## PROCEDIMENTOS

Encha quatro vasos de argila com 1 L de areia grossa lavada e autoclave-os por 20 min a 120°C e 1 atm de pressão. Alternativamente, coloque-os por uma hora em forno ligado a 300°C. Retire os vasos do forno (ou da autoclave) e deixe-os esfriar. Adube-os com solução nutritiva sem nitrogênio. Coloque sementes de soja (ou feijão) e de milho em uma solução de formaldeído a 1% (v/v) por 15 min. Enxágue-as em água destilada e deixe-as embeber por 12 h em água esterilizada (fervida). Com uma pinça esterilizada, coloque 3 sementes em cada vaso. Semeie milho em dois vasos. Nos outros dois vasos, semeie soja (ou feijão). Etiquete-os. Retire uma colher de terra de um canteiro onde se plantou soja (ou feijão) e amasse nessa terra alguns nódulos das raízes dessas plantas. Junte um copo de água fervida (100 mL) já a temperatura ambiente, mexa bem e deixe repousar. Infeccione, com a água turva (sobrenadante) um vaso com milho e um dos vasos com soja (ou feijão). Alternativamente, podem ser utilizados inoculantes comerciais disponíveis no mercado na forma líquida ou misturados em turfa. Diariamente, regue os vasos com água fervida e acompanhe os resultados. Após 20-40 dias, desenterre as plantas e observe os seus sistemas radiculares. Com o auxílio de uma tesoura ou lâmina separe as raízes da parte aérea. Transfira essas porções para estufas de secagem a 70°C. Após dois dias, retire da estufa e mantenha em dessecador. Após resfriamento, pese cada uma das porções das plantas.