

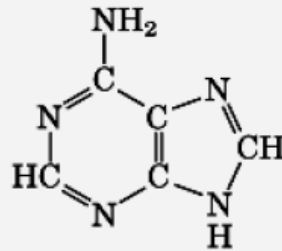
Ciclo e Fixação do N₂

□ N₂ atmosférico (80%) – pouco reativo

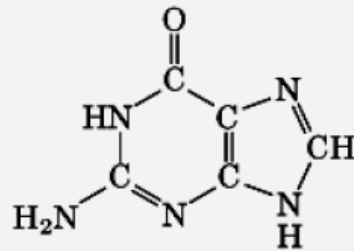
❖ Lavoisier – Nitrogênio = Azoto (gás sem vida)

□ 4º elemento mais abundante dos organismos vivos

Fazem parte de diferentes moléculas

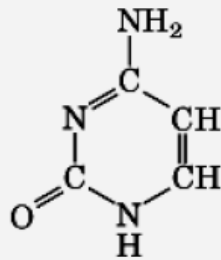


Adenine

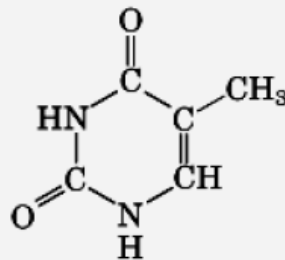


Guanine

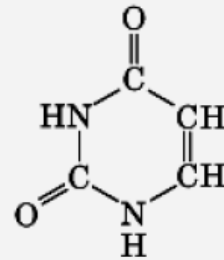
Purines



Cytosine



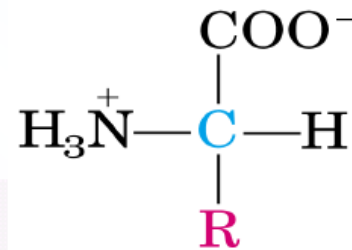
Thymine
(DNA)



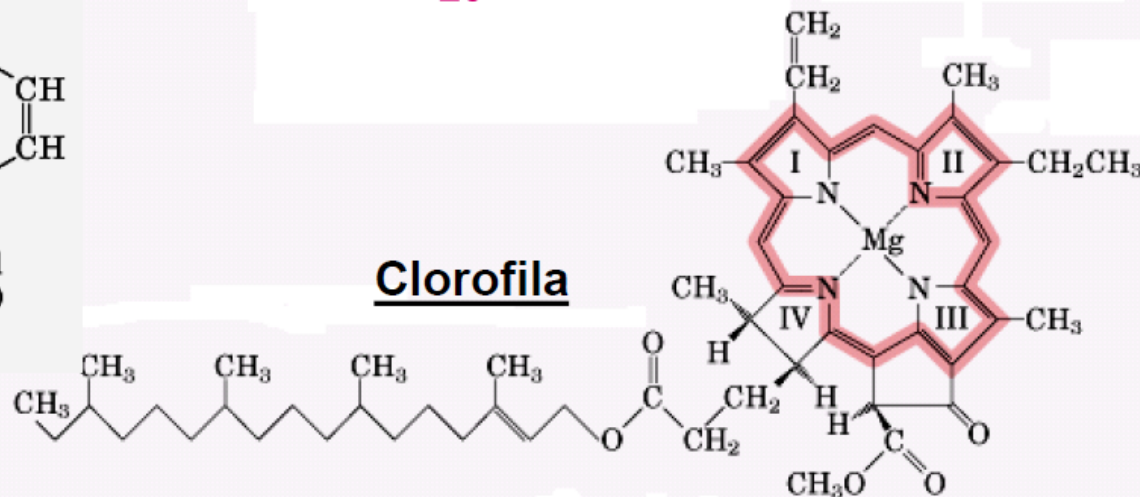
Uracil
(RNA)

Pyrimidines

Aminoácidos e proteínas



Clorofila



Ácidos nucleicos – DNA/RNA

RELAÇÃO DE DEPENDÊNCIA ENTRE OS COMPOSTOS NITROGENADOS DA BIOSFERA

INORGÂNICOS	{ N ₂ - NITROGÊNIO MOLECULAR NO ₃ ⁻ - NITRATO NO ₂ ⁻ - NITRITO NH ₃ - AMÔNIA
ORGÂNICOS	{ AMINOÁCIDOS, AMINAS, ALCALÓIDES, VITAMINAS, PROTEÍNAS ÁCIDOS NUCLÉICOS, ETC.

	NO₃⁻	NO₂⁻	N₂O₂⁻²	N₂	NH₂OH	NH₃
No oxidação	+5	+3	+1	0	-1	-3
	nitrato	nitrito	hiponitrito	nitrogenio molecular	hidroxilamina	amônia
				↓		
				N ≡ N	25.000 cal/mol	

A fixação do nitrogênio é a conversão do N₂ em quaisquer das demais formas nitrogenadas

Deficiência causa o aparecimento de folhas amareladas, desenvolvimento deficiente das plantas e baixa produtividade.



Maioria dos seres vivos é incapaz de utilizar o N₂ atmosférico

Animais – dieta - Transformações químicas sintetizam produtos necessários

Vegetais – retiram do solo e alguns da atmosfera (via microrganismos)

Caro e necessita de reciclagem

Como o N atmosférico entra no ciclo biológico?

Como os organismos vivos conseguem obter N?

Como ocorre a reciclagem do N biológico?

Ciclo do nitrogênio

Como ocorre as transformações do N_2 na natureza?

➤ Reações Químicas – Relâmpagos – processos naturais

8% N fixado do solo

Vapor d'água e $O_2 \rightarrow$ Hidroxilas ($OH\cdot$), H^+ e $O\cdot$ livres



↓
Atacam N_2
↓
Ácido nítrico (HNO_3)
precipita com a chuva

➤ Reações Químicas – processos industriais

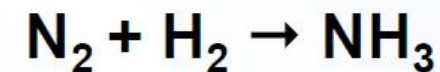
Indústrias de produtos nitrogenados – 80×10^6 ton/ano
de fertilizantes nitrogenados

(Brasil - consumo 2012, 29 milhões de ton)



Processo Haber-Bosch

**Elevada temperatura e
pressão (200°C e 200atm)**



- Alto consumo de energia
- Fonte H é o gás natural (CH_4)
- Perdas intensas
- Poluição

➤ Reciclagem de produtos nitrogenados – processos biológicos

✓ decomposição de matéria orgânica (microrganismos decompositores)



✓ excreção de produtos nitrogenados (uréia, ácido úrico e amônia)



➤ Fixação biológica

90% do N fixado

Procariotos

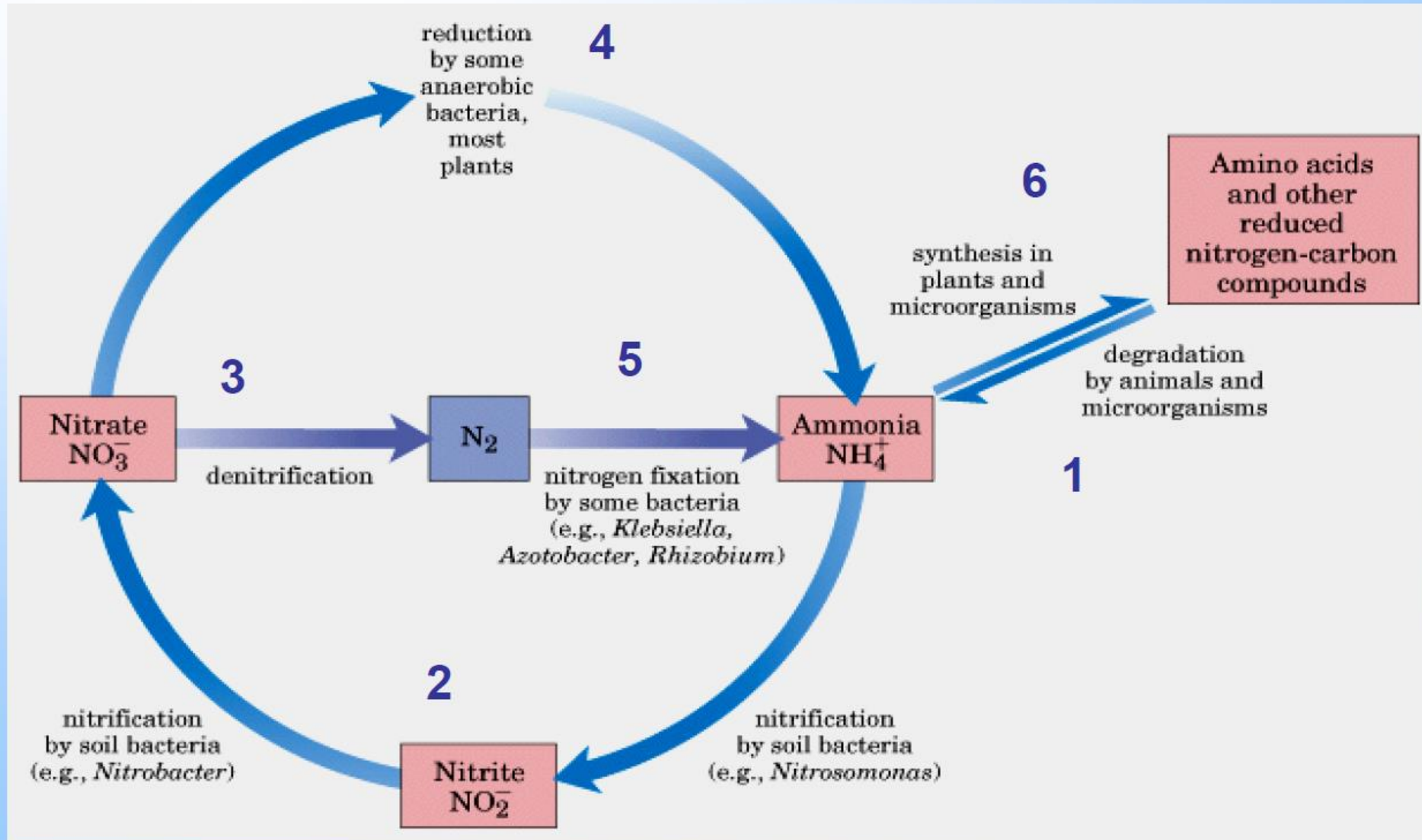
Assimilação $N_2 \rightarrow NH_4^+$



Ⓢ Realizada por microrganismos livres ou independentes, que vivem no solo ou na água

Ⓢ Por microrganismos que fazem associação simbiótica com as raízes de plantas leguminosa (produtoras de grãos)

Existem 6 processos importantes de transformação e reciclagem de Nitrogênio



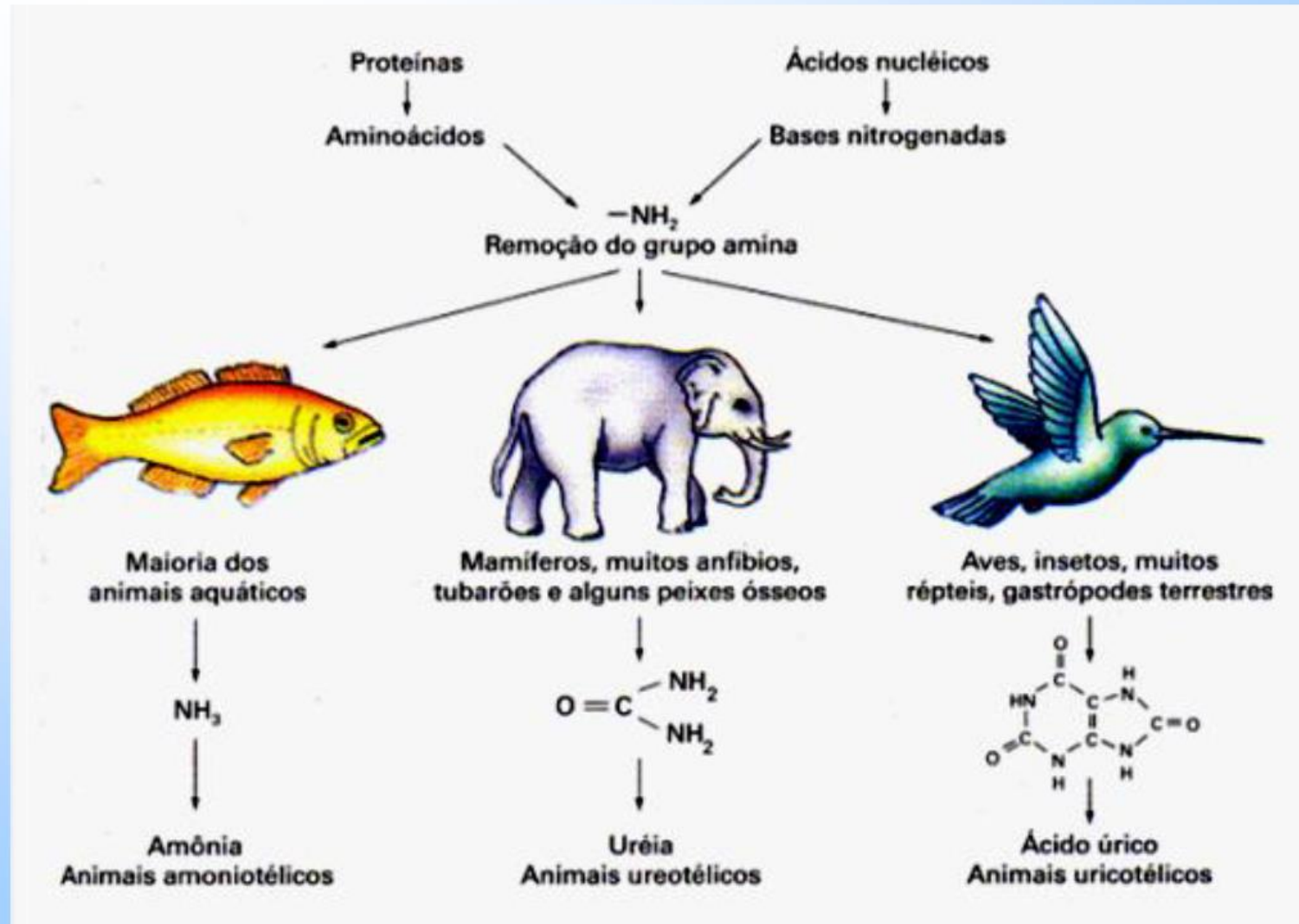
1 - Decomposição e excreção

Ação de bactérias e fungos na decomposição da matéria orgânica do ambiente (animais ou vegetais mortos)

Liberação de amônio – Amonificação

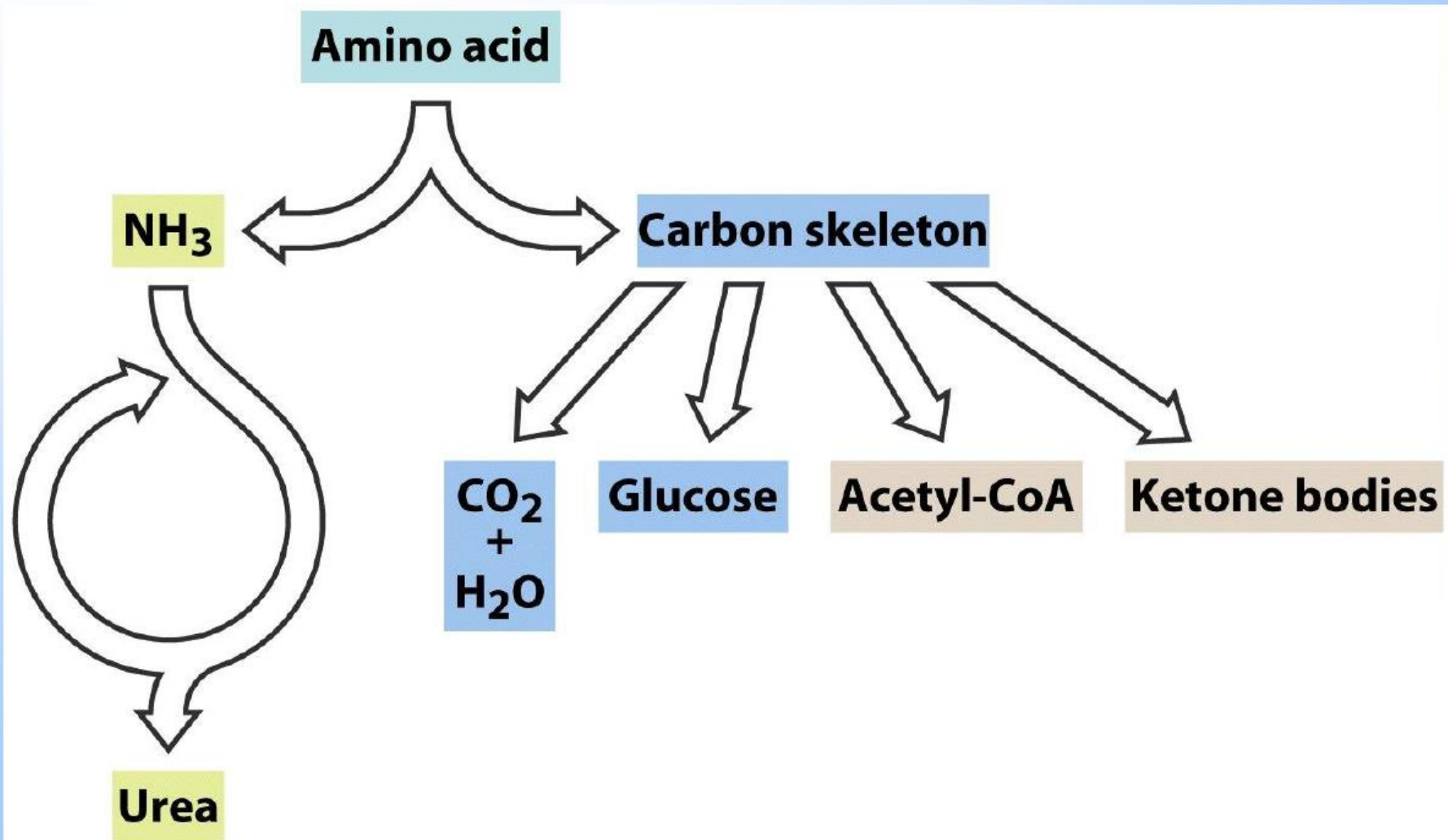


- A maioria dos animais terrestres eliminam o excesso de N ingerido na dieta através de reações bioquímicas diferentes

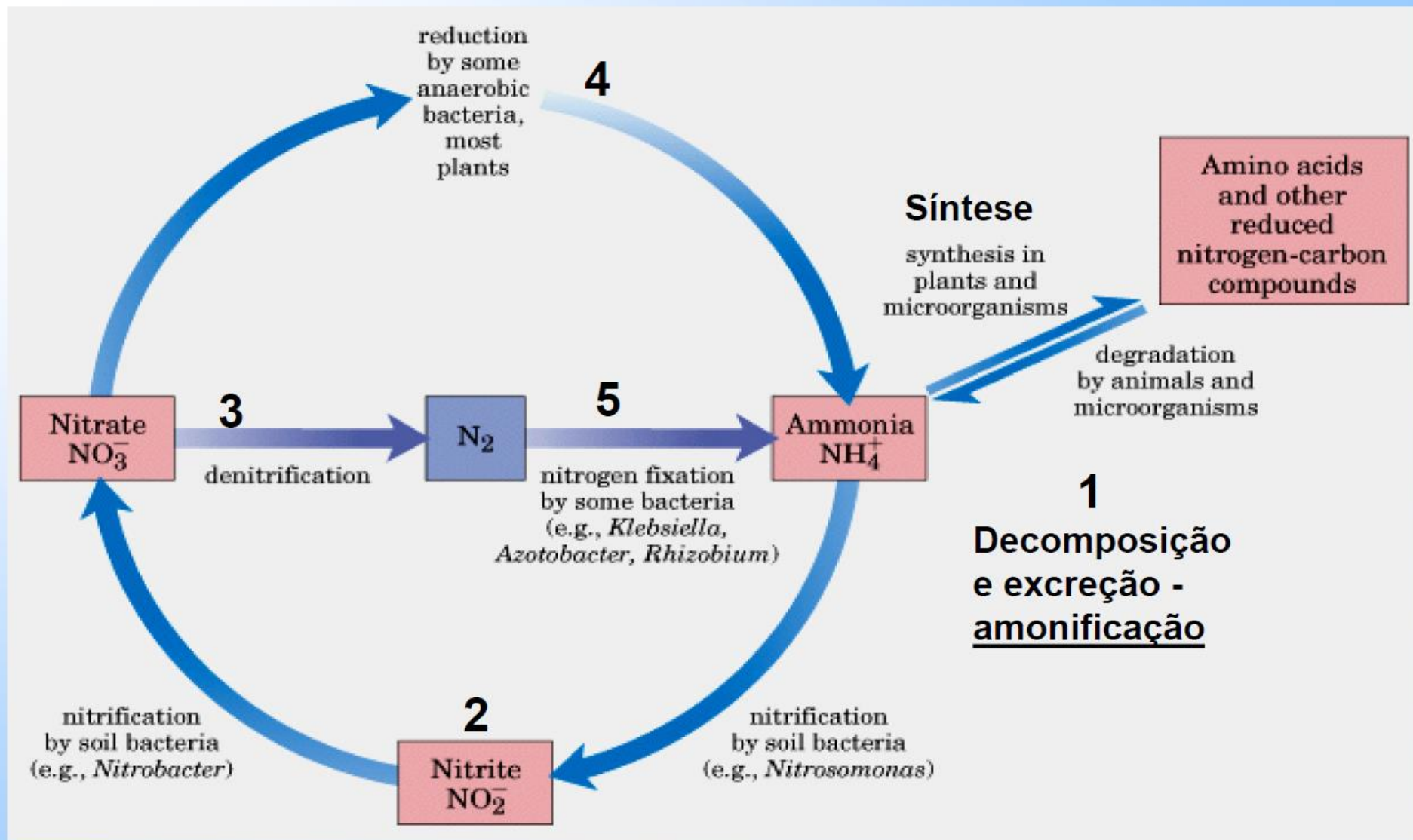


Ciclo da uréia

Essa é uma das formas mais importantes de reciclagem do nitrogênio



- ✓ **A ureia liberada na natureza pode ser convertida em amônia voltando ao ciclo biogeoquímico do nitrogênio através da ação dos microrganismos decompositores**
- ✓ **A amônia pode ser utilizada diretamente pelos vegetais e microrganismos ou convertida a nitrato por microrganismos (principal via de obtenção de N pelos organismos produtores primários)**



Como a amônia é transformada em nitrato?

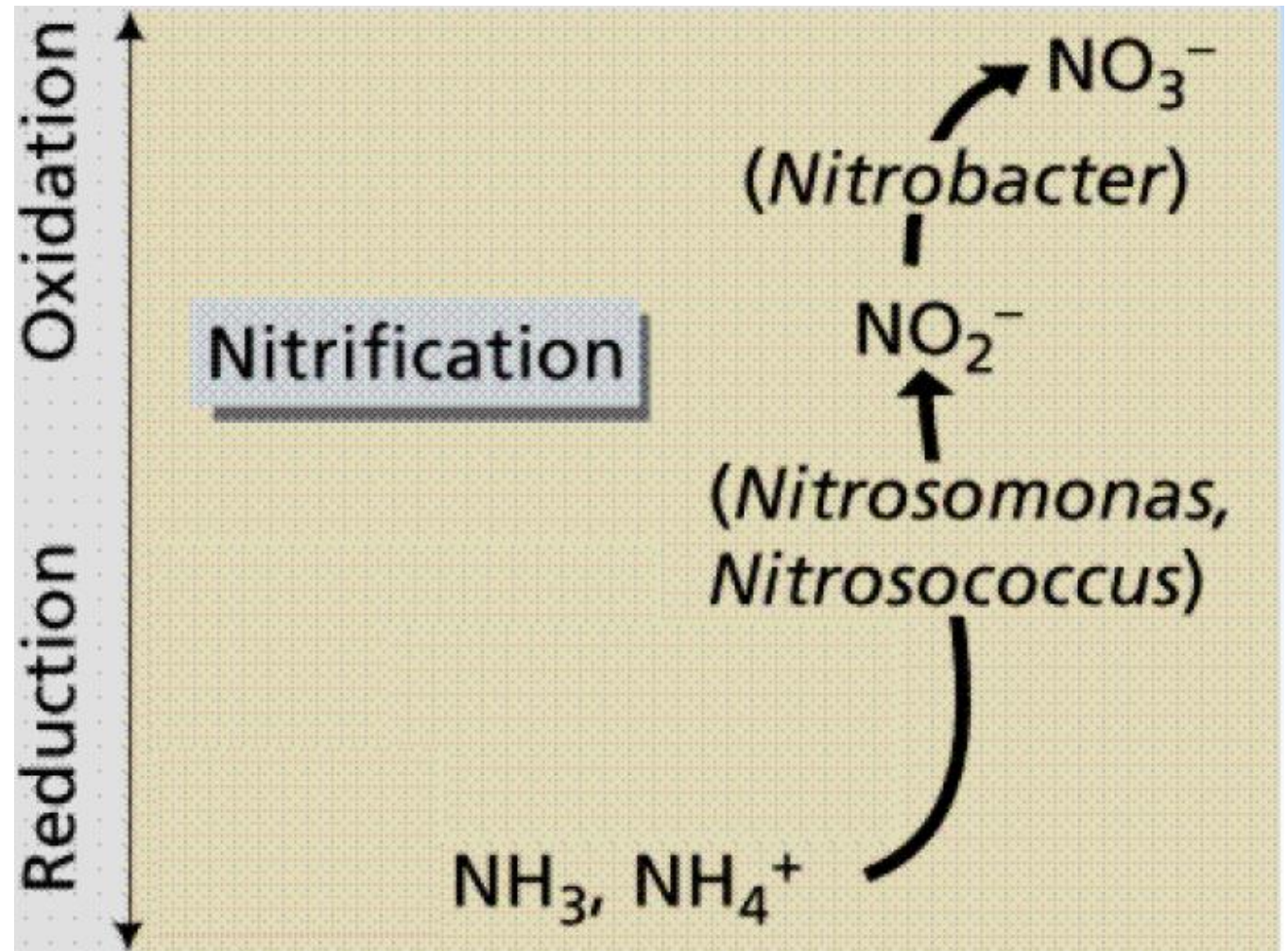
2 - Oxidação bacteriana da amônia - Nitrificação

- ✓ A amônia apesar de poder ser empregada na síntese de produtos nitrogenados por todos os organismos vivos, no solo ela é quase que totalmente transformada em nitrato por oxidação.

- ✓ A transformação da amônia em nitrato passa por duas fases:

Amonia → Nitrito → Nitrato

- ✓ Composto reduzido passa a composto oxidado

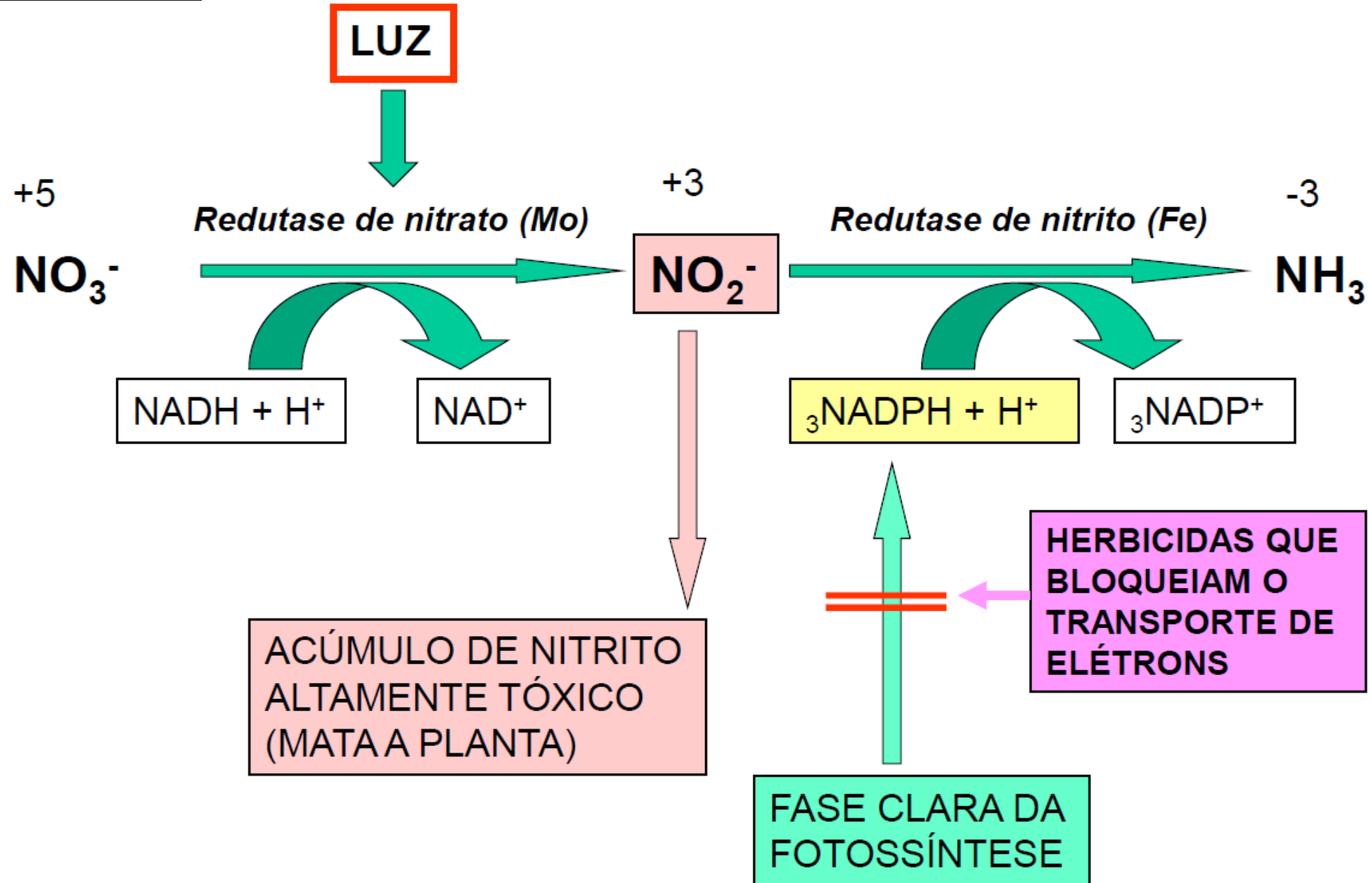


Quais organismos oxidam a amônia?

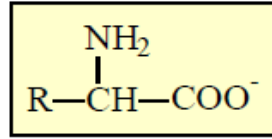
Os microrganismos que transformam a amônia em nitrato podem viver no solo ou água e participam de apenas uma das fase de oxidação

Gênero	Conversão química	Habitat
<i>Nitrosomonas</i>	amônia→nitrito	Solo , água doce e marinha
<i>Nitrospira</i>	amônia→nitrito	Solo
<i>Nitrosococcus</i>	amônia→nitrito	Solo , água doce e marinha
<i>Nitrosolobus</i>	amônia→nitrito	Solo
<i>Nitrobacter</i>	nitrito→nitrato	Solo , água doce e marinha
<i>Nitrospina</i>	nitrito→nitrato	Água marinha
<i>Nitrococcus</i>	nitrito→nitrato	Água marinha

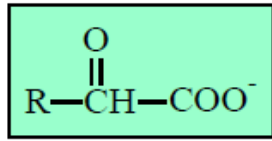
Redução do Nitrato



Alfa-aminoácido

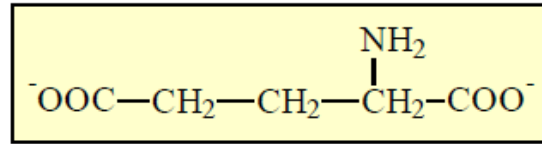
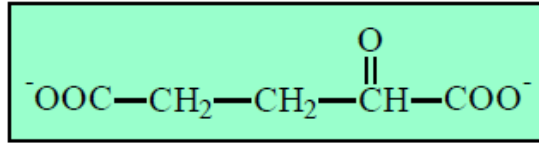


transaminase

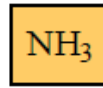


Alfa-cetoácido

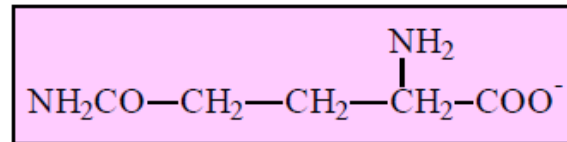
Alfa-cetoglutárico



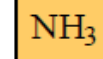
Acido glutâmico



sintetase de glutamina 2

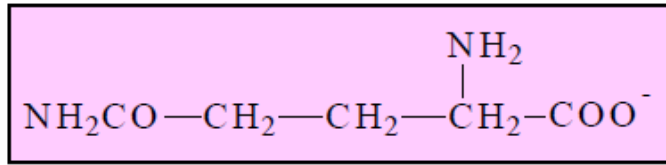


Glutamina

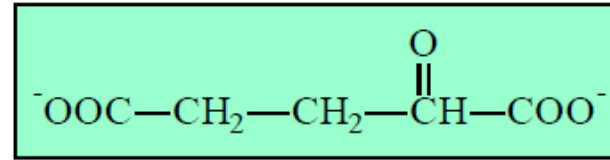


desidrogenase glutâmica 1

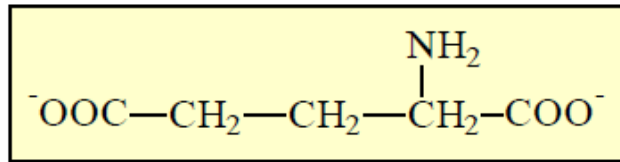
Glutamina



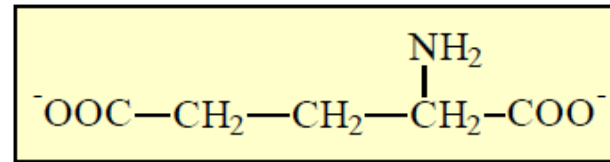
Alfa-cetoglutárico



+ NAD(P)H + H⁺

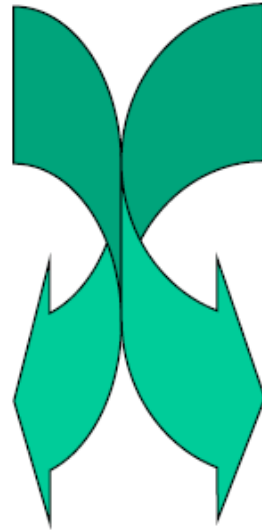


Acido glutâmico



Acido glutâmico

+ NAD(P)⁺



SINTETASE DE ASPARAGINA

GLUTAMINA + ASPARTATO + ATP → GLUTAMATO + ASPARAGINA + AMP + PPi

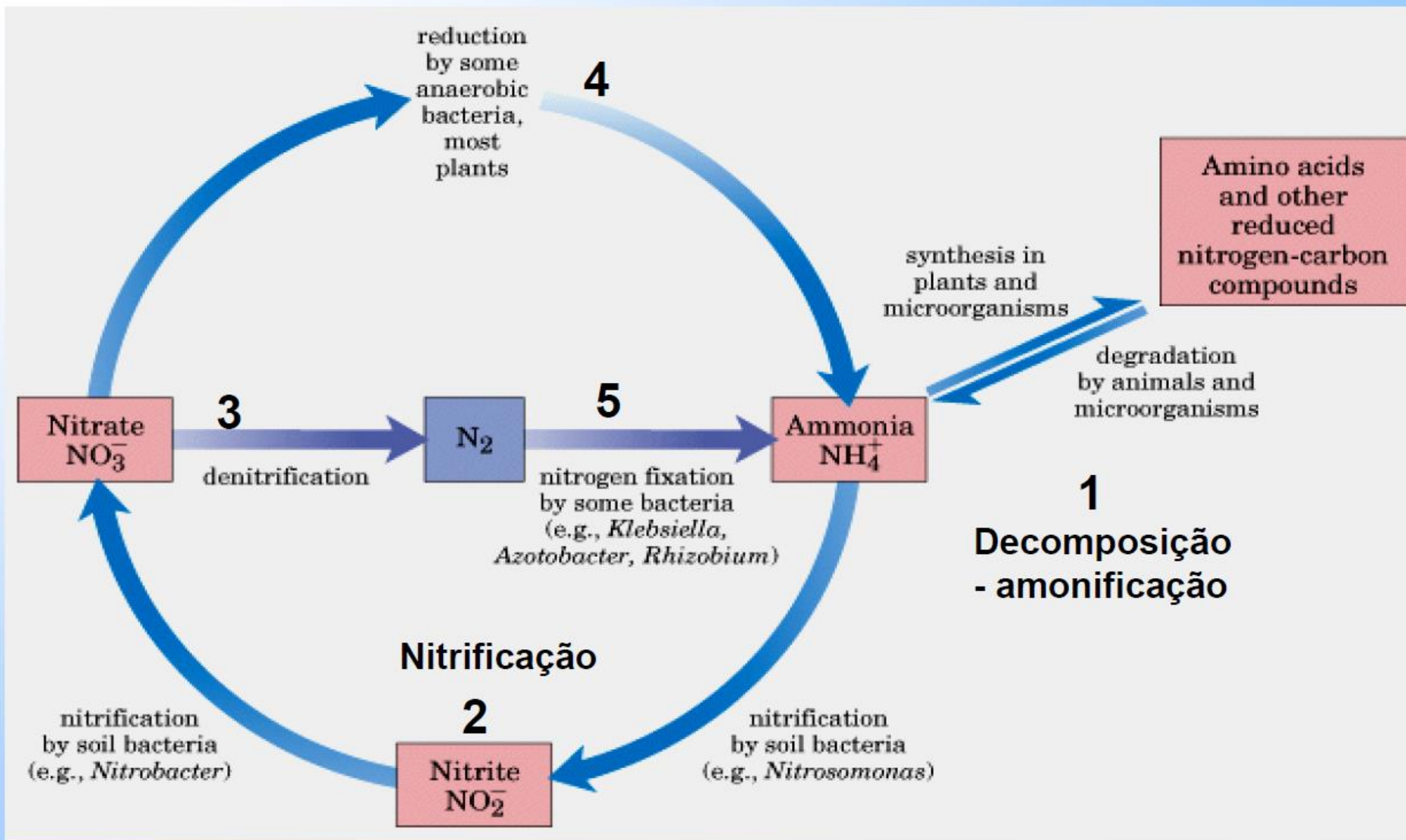
SE ACUMULAM NOS
ORGANISMOS
FIXADORES

ASPARAGINA
GLUTAMINA
CARBAMIL~P

OUTROS
AMINOÁCIDOS
BASES
NITROGENADAS

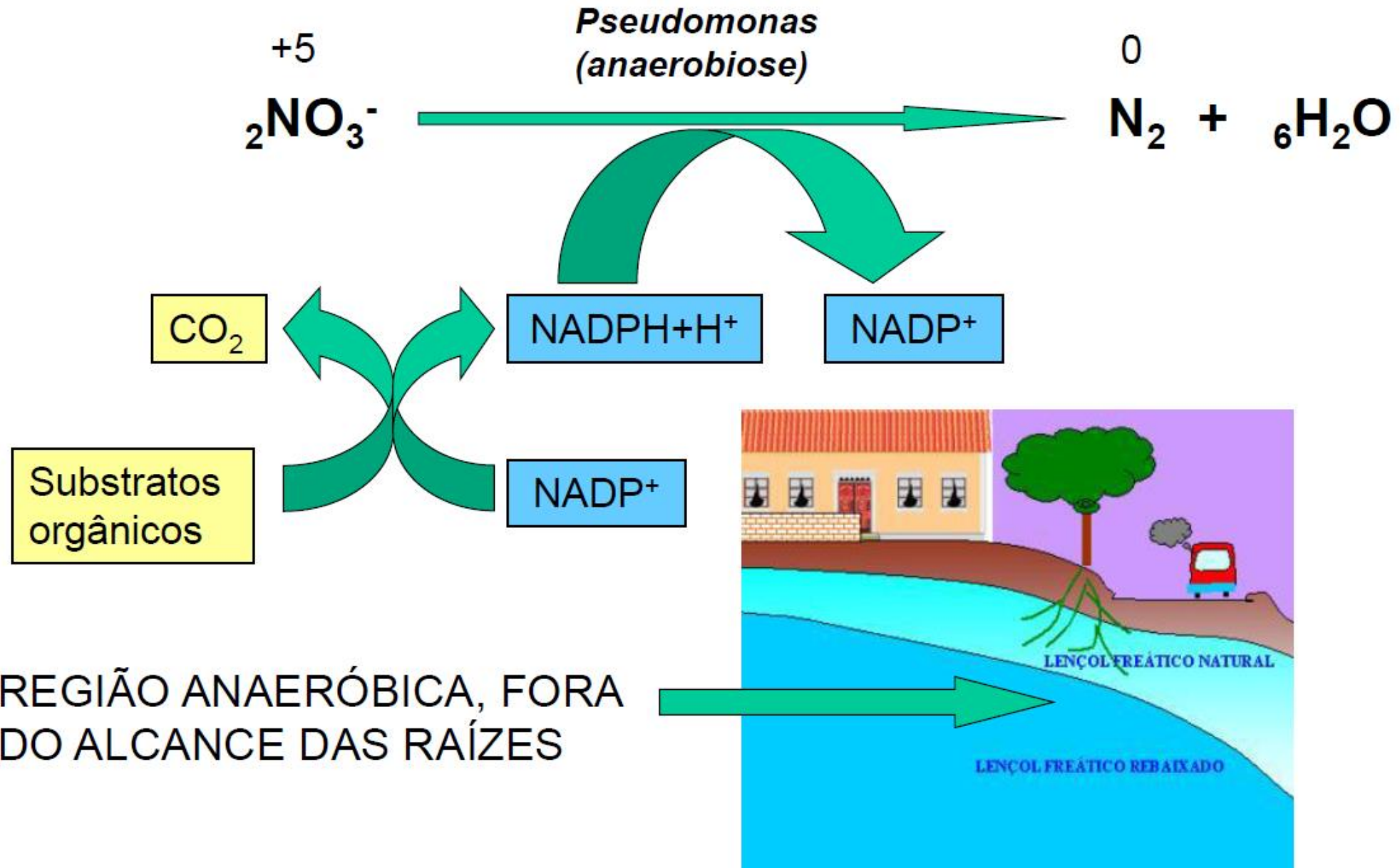
- ✓ **Após a oxidação da amônia a nitrato os vegetais e alguns microrganismos incorporam tal composto e o utilizam para a síntese de moléculas nitrogenadas**
- ✓ **O nitrato formado nos processos de nitrificação podem ter dois destinos – absorção pelos vegetais ou voltar para a atmosfera como N₂ (desnitrificação)**





•Dois caminhos pode seguir o nitrato formado durante a nitrificação

Desnitrificação (Respiração do Nitrato)



3 - Desnitrificação

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{N}_2\text{O}$ (óxido nitroso) $\rightarrow \text{N}_2$ (atmosfera)

Processo importante na respiração **anaeróbia** de algumas bactérias.

Essas bactérias usam o NO_3^- como o doador de e^- liberando N_2 na atmosfera

Esse processo gera um potencial de próton transmembrana que é utilizado na síntese de ATP.

Nesse processo ocorre perda de N para a atmosfera, mas ele é importante para a manutenção do balanço entre N biológico e N do ar.

Exemplos da aplicação desses processos

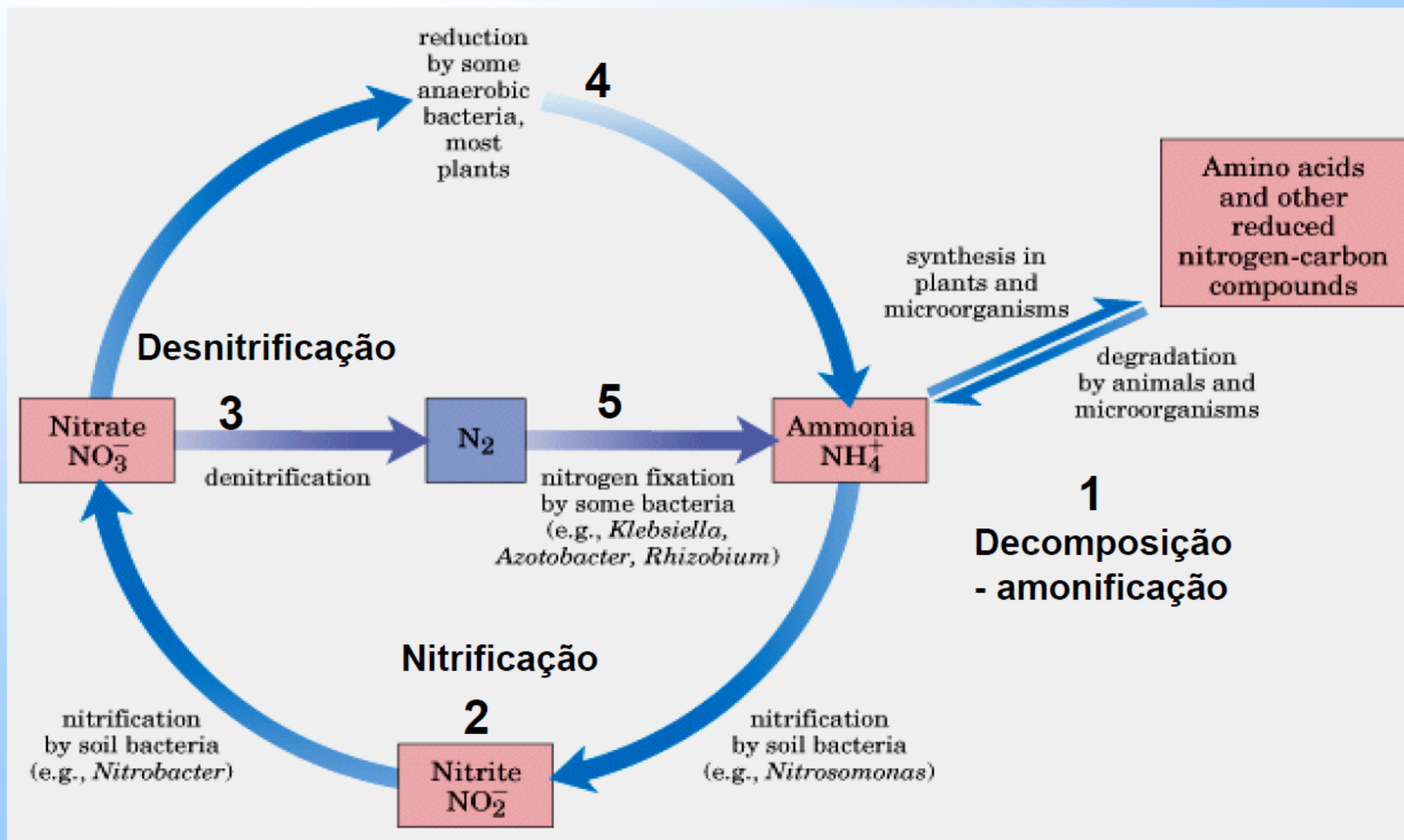
O Tanque de Arejamento Prolongado (Tanque de Nitrificação) destina-se essencialmente a transformar a matéria orgânica degradada em amônio e nitrato.

No Tanque de Desnitrificação é realizada, como o nome indica, a desnitrificação, de modo a remover o azoto até níveis exigidos por lei com liberação de N_2 .

O Tratamento Biológico de lixo urbano é composto por duas etapas principais: processo de nitrificação/desnitrificação



O nitrato é a principal forma de assimilação de N pelos vegetais.

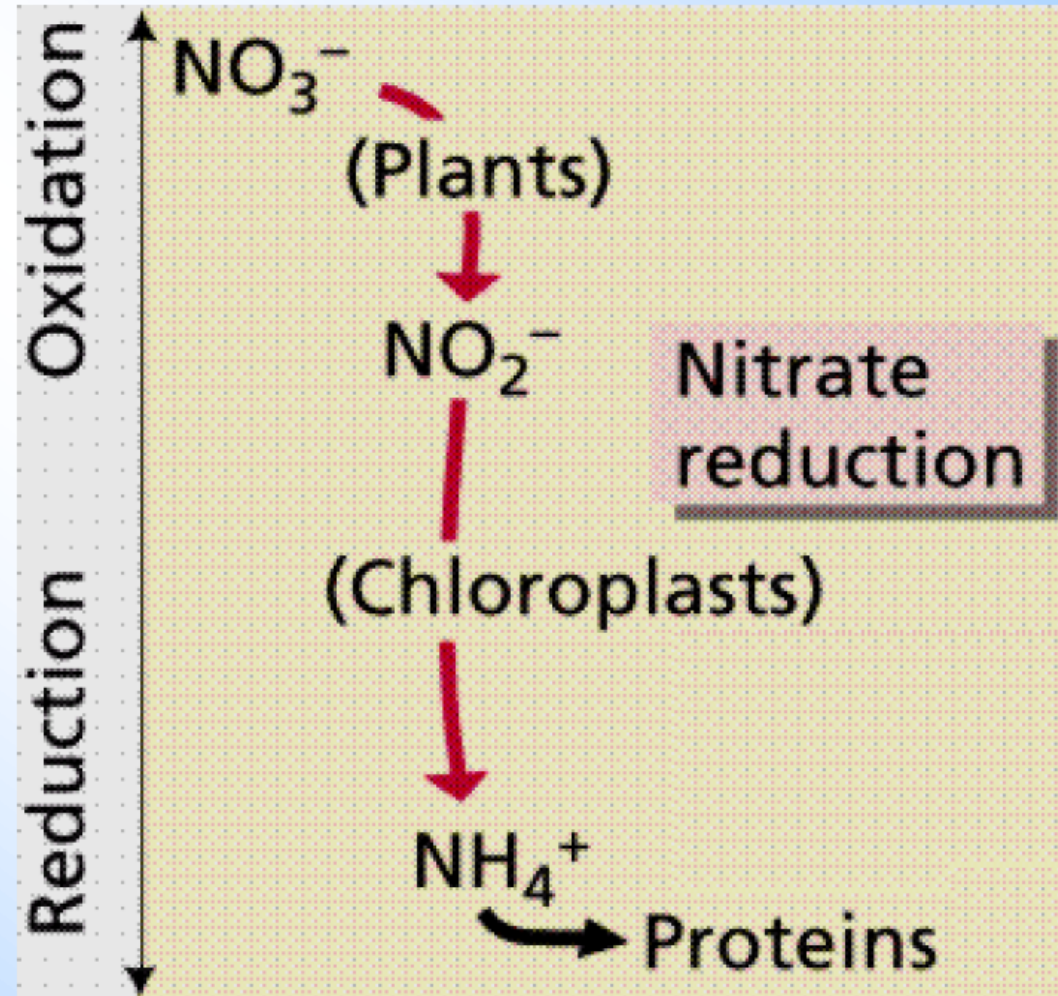


4 – Redução - Absorção e assimilação de nitrato pelos vegetais e microrganismos

- ❖ O nitrato obtido é reduzido a amônia e utilizado para a síntese de aminoácidos e outros compostos nitrogenados

➤ Nitrato e amônio são objeto de intensa competição entre microrganismos do solo e plantas

➤ Plantas desenvolveram um mecanismo especial para capturar esses elementos rapidamente do solo e estocá-lo.

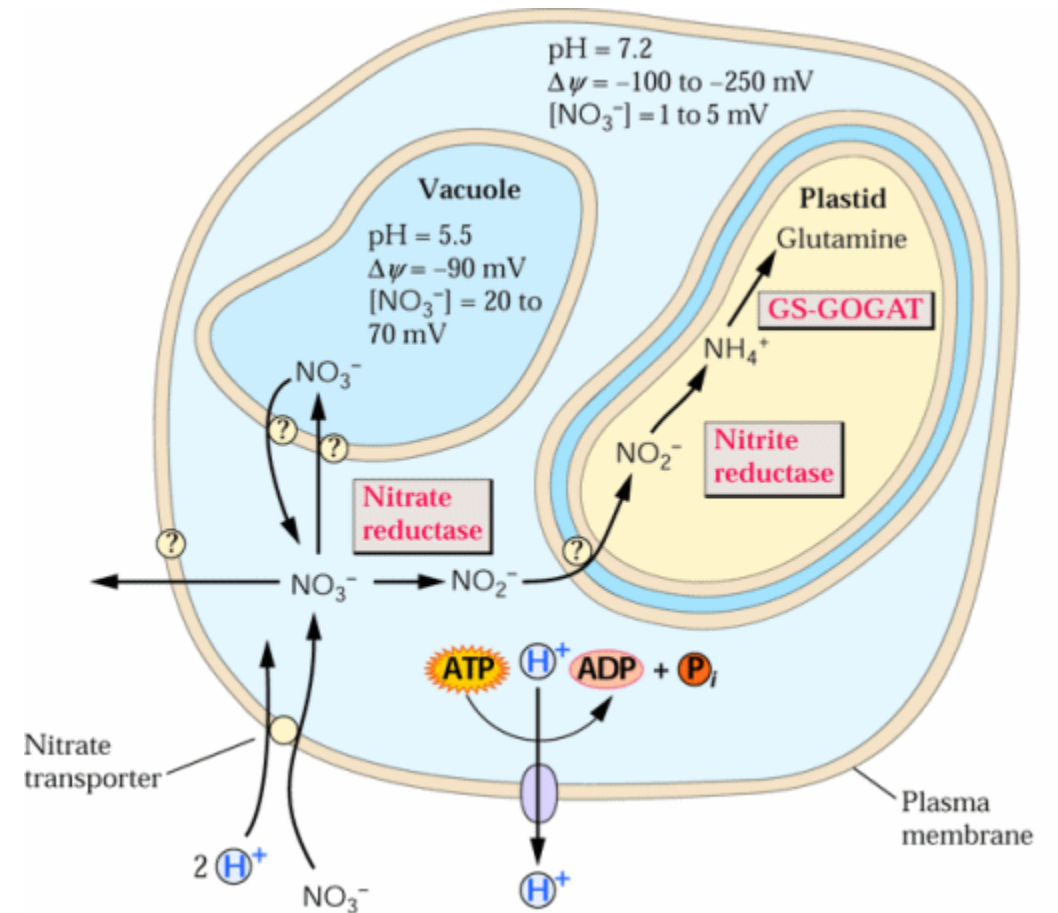


Entrada gasta energia - manutenção do potencial eletroquímico

**Nitrato pode ser armazenado em vacúolos
Isso aumenta a capacidade de absorção dele pela planta**

**Transformado em nitrito pela enzima nitrato redutase
Nitrito é altamente reativo e deve ser rapidamente retirado do citoplasma**

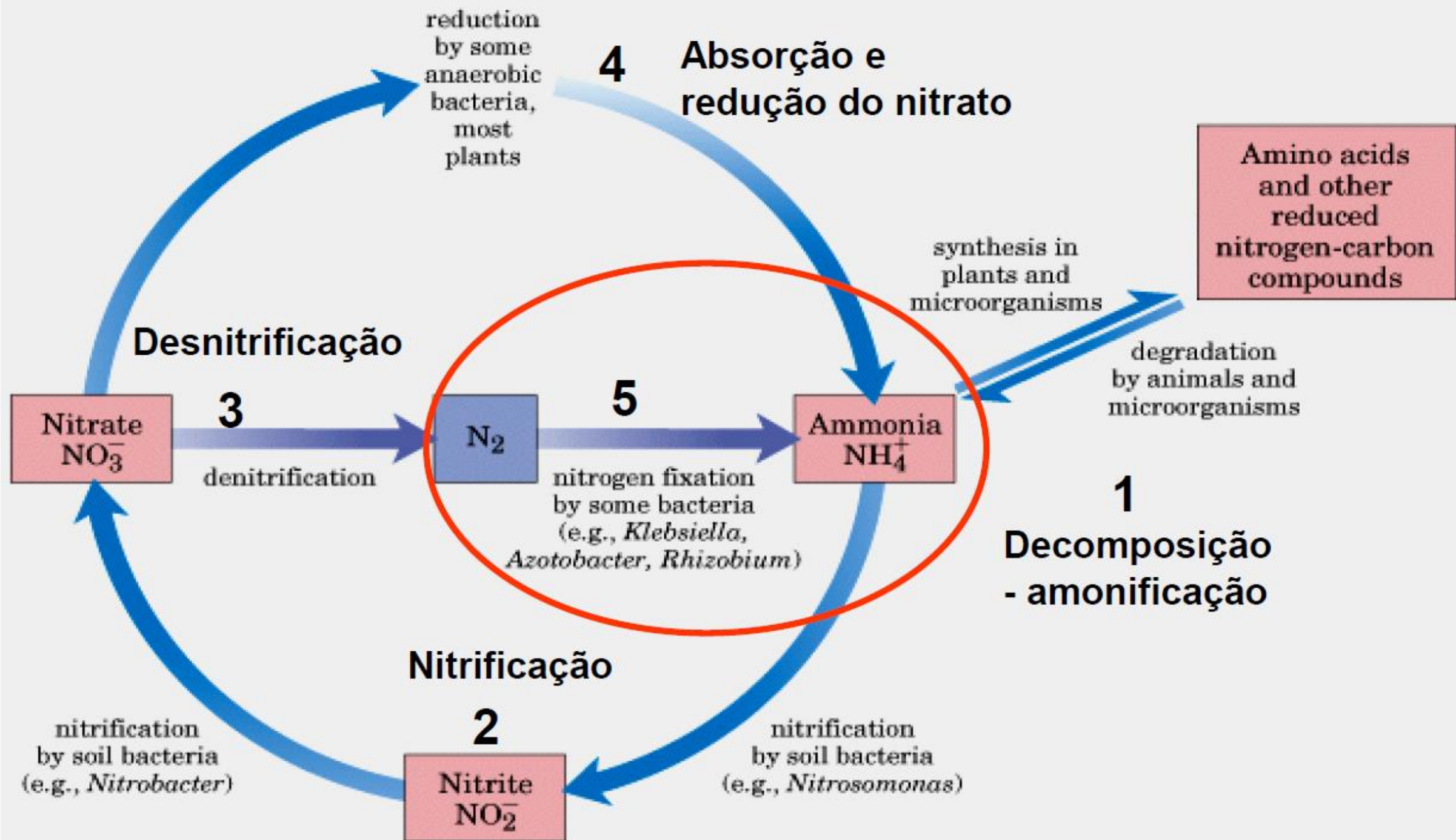
Entra nos plastídeos e é transformado em amônio pela nitrito redutase



- ✓ **Nitrato pode ser acumulado em grandes concentrações nos vegetais sem causar grandes problemas, mas se um animal ingerir plantas com altos níveis de nitrato pode sofrer uma intoxicação – combinação com a hemoglobina impedindo-a de se ligar ao oxigênio.**

- ✓ **Alguns países impõe limites ao teores de nitrato dos vegetais**

- ✓ **Tipo de cultivo e ou uso de diferentes formas de adubação nitrogenada influencia no teor de nitrato dos alimentos.**



5 - Fixação Biológica do Nitrogênio

- ✓ **Processo mais importante de entrada de N no seu ciclo biogeoquímico (90%)**
- ✓ **Certas bactérias formam amônio a partir do nitrogênio atmosférico**
- ✓ **Bactérias de vida livre ou bactérias simbióticas**
- ✓ **Hospedeiro fornece metabólitos para bactéria e esta fornece nitrogênio orgânico para o hospedeiro**
- ✓ **Enzimas responsáveis – Complexo Nitrogenase**

Exemplos de organismos que podem realizar a fixação do nitrogênio

Fixação simbiote do nitrogênio

Planta hospedeira

Fixação simbiote de N

Legumes: leguminosas e *Parasponia*

Azorhizobium, *Bradyrhizobium*, *Photorhizobium*,
Rhizobium, *Sinorhizobium*

Actinorrízicas: *Alnus* (árvore), *Ceanothus* (arbusto),
Casuarina (árvore), *Datisca* (arbusto)

Frankia

Gunnera

Nostoc

Azolla (pteridófita aquática)

Anabaena

Cana-de-açúcar

Acetobacter

Nódulos raízes

Apoplasto do caule

Fixadores de nitrogênio de vida livre

Tipo

Gêneros fixadores de N

Cianobactérias (algas azuis-esverdeadas)

Anabaena, *Calothrix*, *Nostoc*

Outras bactérias

Aeróbicas

Facultativas

Anaeróbicas

Não-fotossintetizantes

Fotossintetizantes

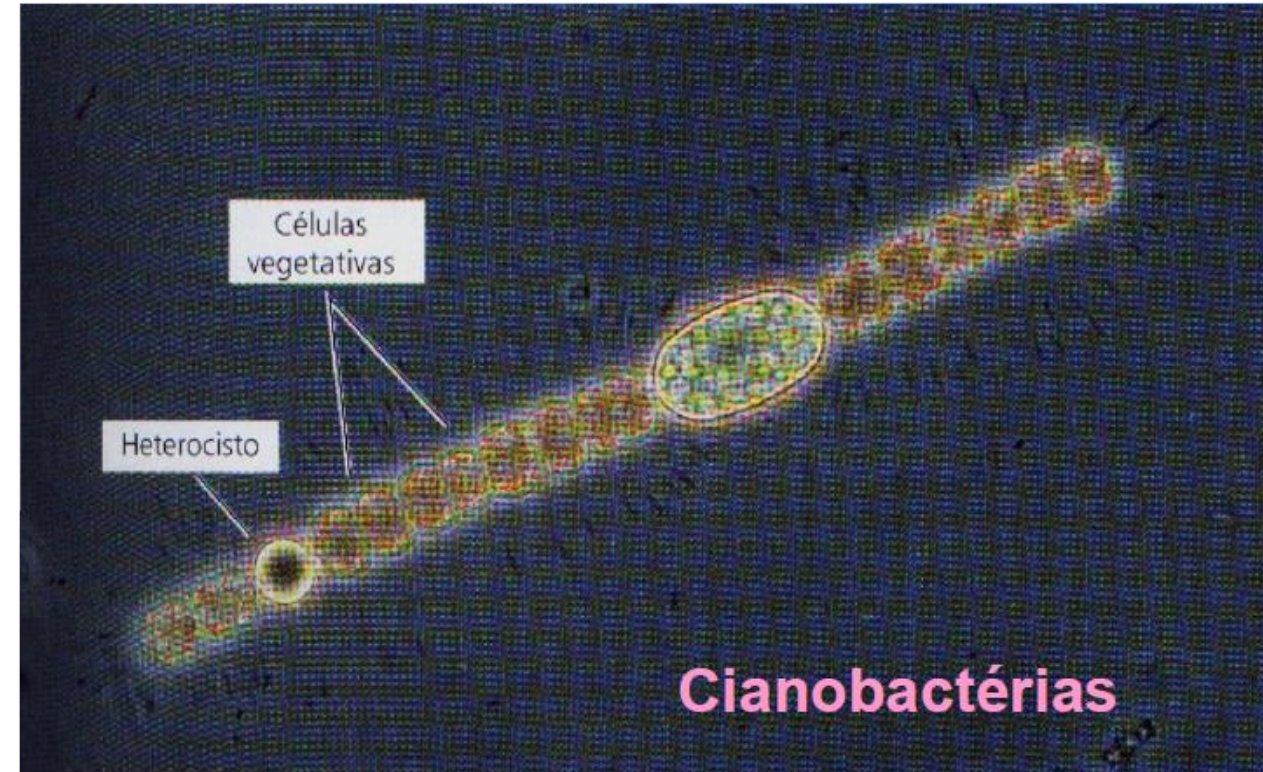
Azospirillum, *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Derxia*
Bacillus *Klebsiella*

Clostridium, *Methanococcus* (Archaeobacteria)

Chromatium, *Rhodospirillum*

Vida livre

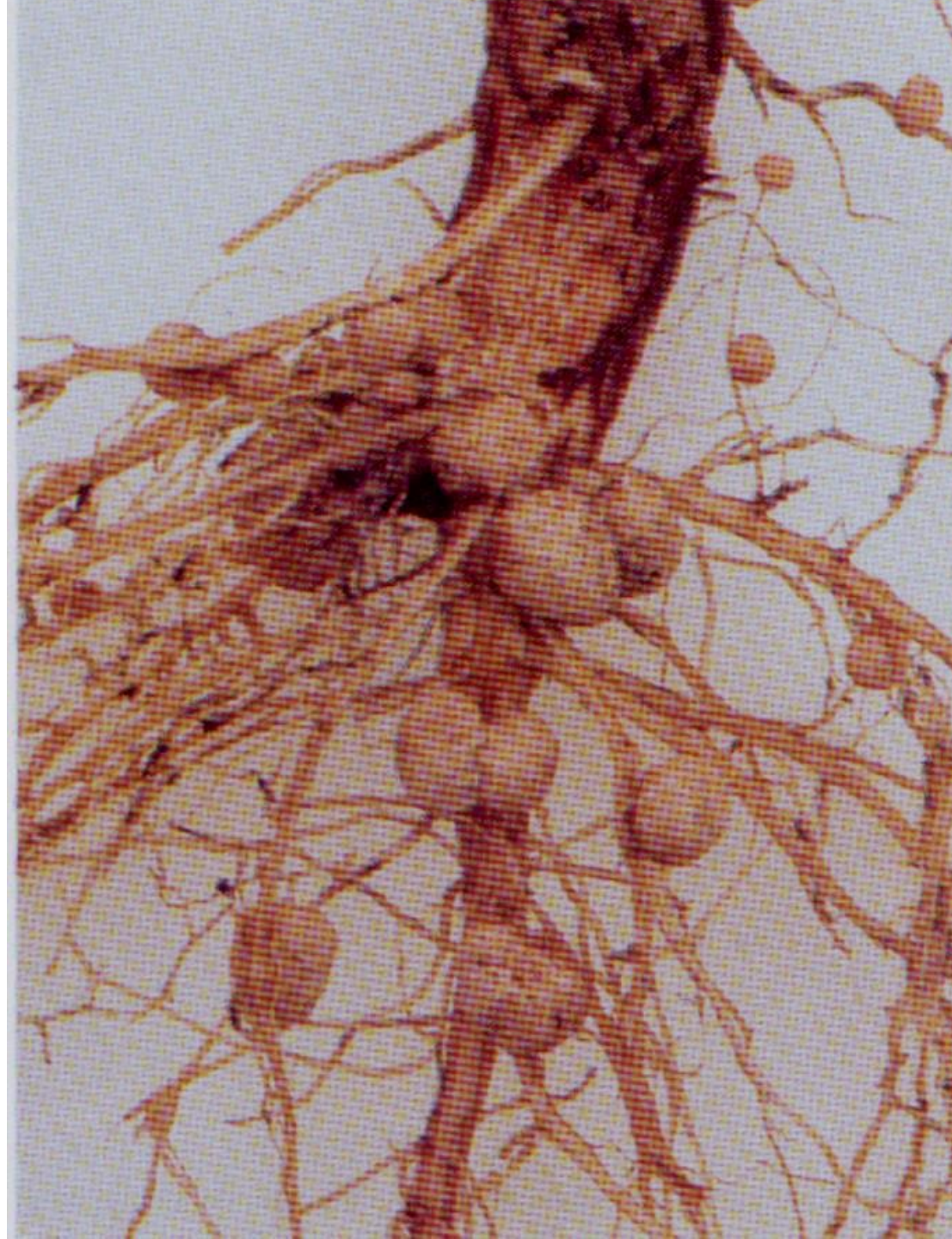
- ✓ Importante em cultura do arroz e oceanos pois podem fixar o N em condições de anaerobiose
- ✓ Fixam N em campos alagados e morrem quando eles secam liberando o N fixado
- ✓ Nitrogenase está localizada dentro de heterocistos e protegida por camadas de glicolipídeos que funcionam como uma barreira à difusão de O₂



Simbiose

Nódulos nas raízes de leguminosas

- ✓ Nódulos - nicho ecológico da simbiose e onde ocorre a Fixação Biológica do N₂
- ✓ Nódulos conectados à planta via tecidos vasculares
- ✓ Leguminosas - importância na produção de alimentos e no equilíbrio do nitrogênio nos ecossistemas naturais. Fornecem 24% do total de proteínas indispensáveis a eles
- ✓ Associação rizóbio/leguminosa - 35 milhões de toneladas de N/ano
- ✓ Especificidade bactéria X hospedeiro



Soja – *Bardyrhizobium japonicum*
e *Bradyrhizobium elkanii*



Feijão – *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, ou *Rhizobium tropicii*



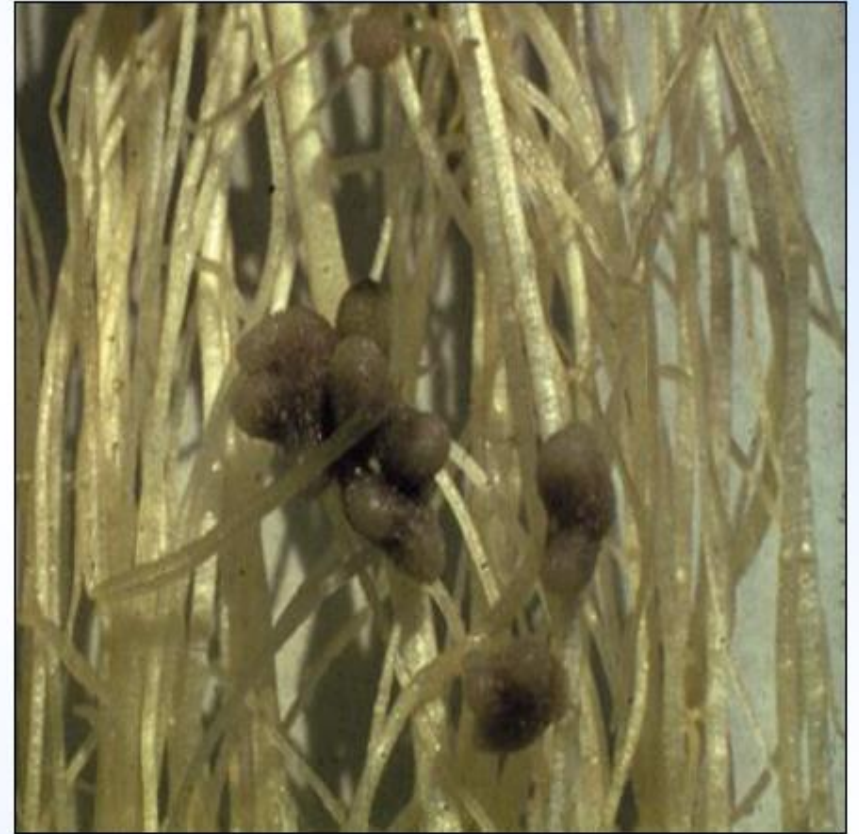
Alfafa – *Sinorhizobium meliloti*



Trevo – *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*



Ervilha – *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae*



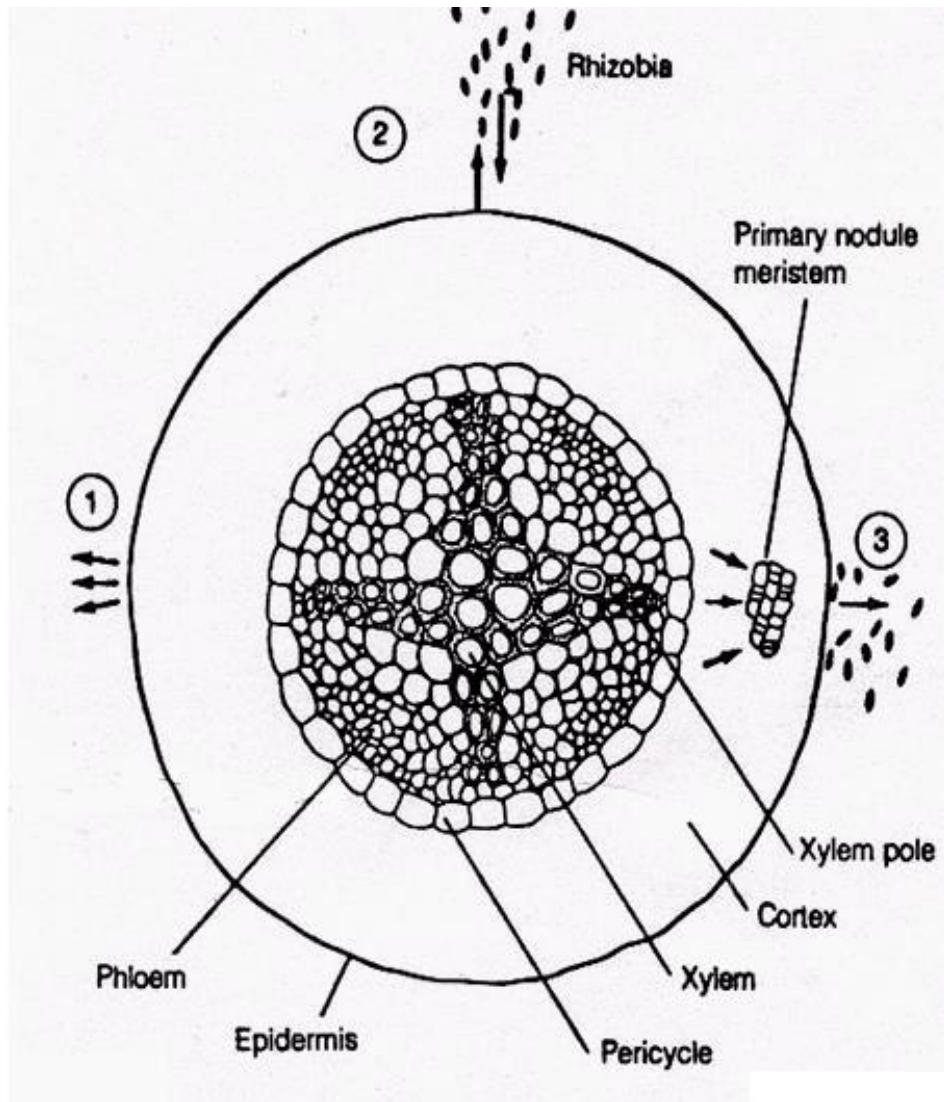
Sesbania - *Azorhizobium caulinodans* (nódulos no caule)



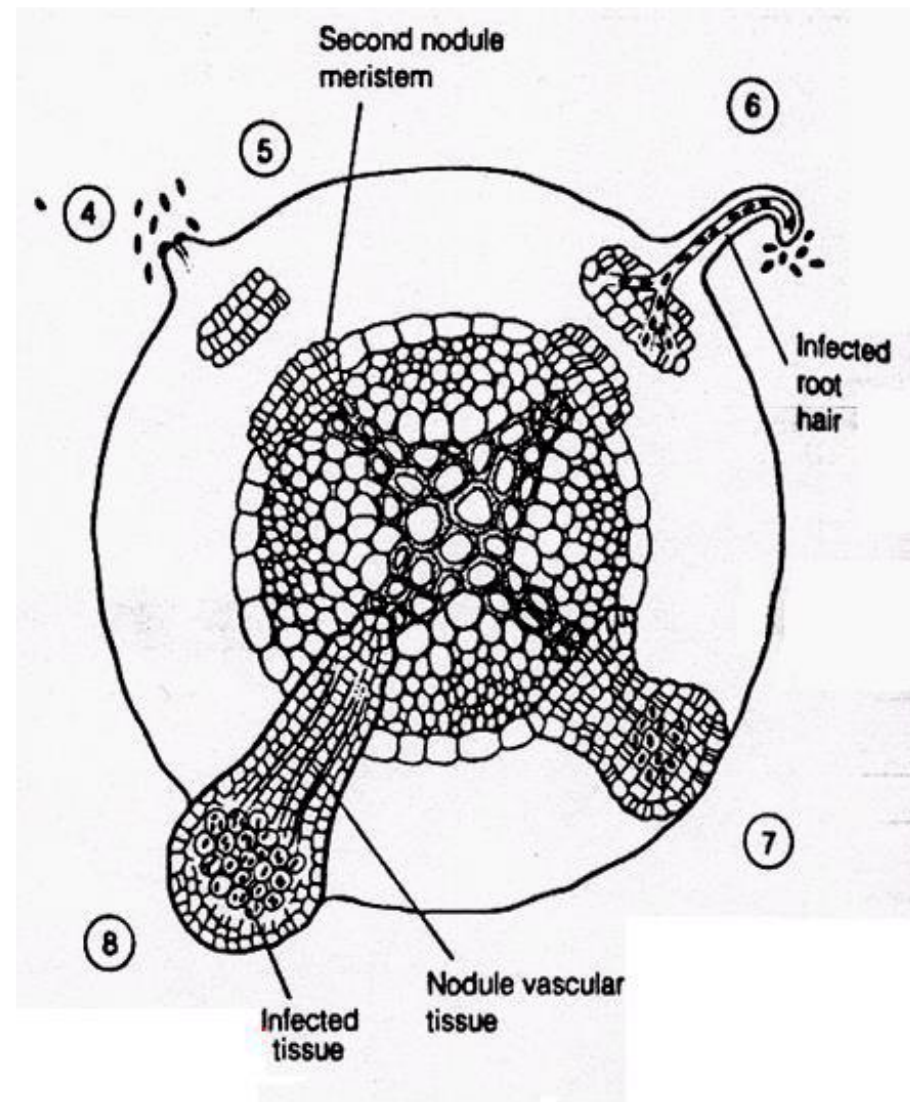
Como ocorre a fixação simbiótica do Nitrogênio?

- ✓ **Plantas e rizóbios vivem normalmente em condições adequadas sem necessidade de simbiose**
- ✓ **Deficiência de nitrogênio solo – inicia-se processo de simbiose**
- ✓ **Simbiose requer troca de sinais entre os simbiote e formação dos nódulos**

Formação dos nódulos em raízes



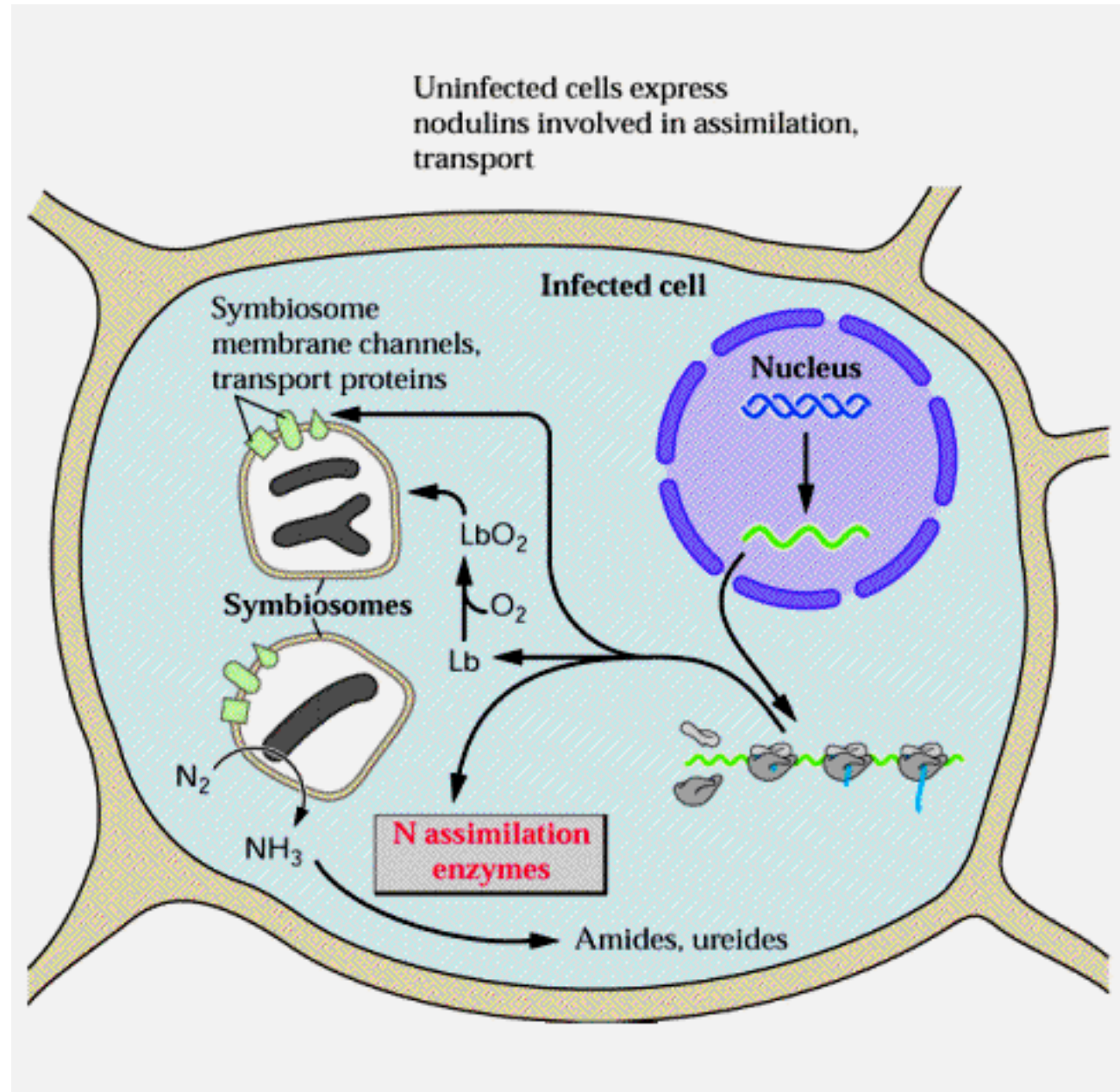
Quimiotaxia e aderência das bactérias à raiz



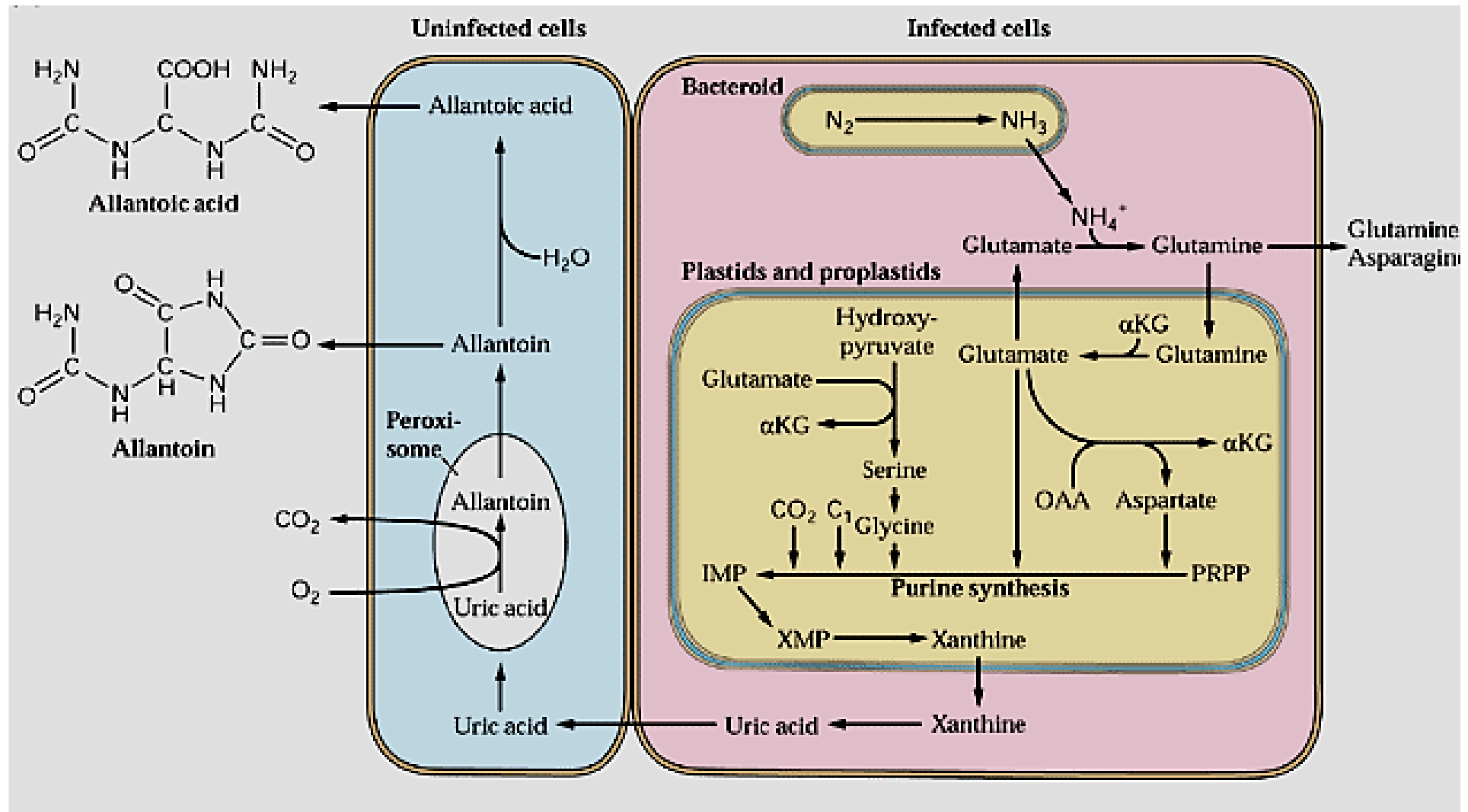
Multiplicação das células corticais e formação do cordão de infecção

Liberação das bactérias nas células, multiplicação e diferenciação em bacteroide

- ✓ Desenvolvimento da nitrogenase, leghemoglobina e enzimas relacionadas, com a fixação do N₂.
- ✓ Redução do nitrogênio atmosférico até amônio pela enzima nitrogenase.
- ✓ Amônia é convertida em aminoácido (glutamina ou asparagina) e ureídeos.



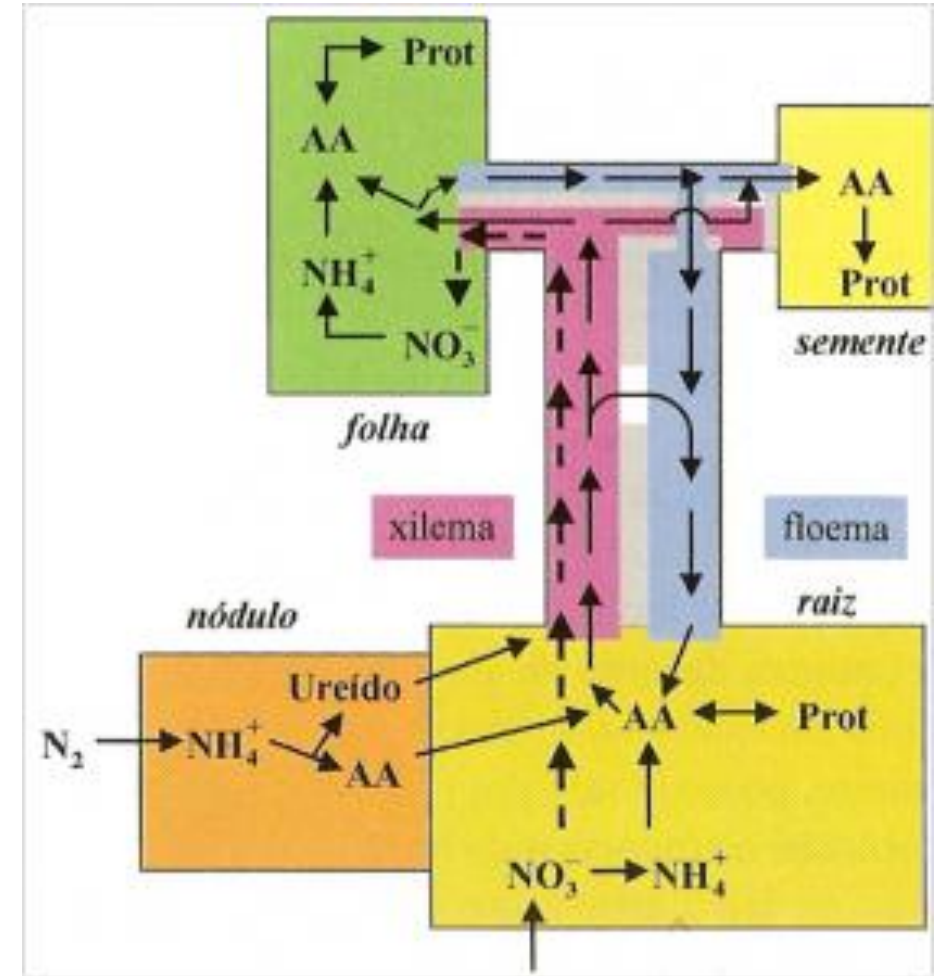
Incorporação pela planta, da amônia produzida pelos bacteróides Glutamina/Asparagina e ureídeos



Leguminosas tropicais (soja) usam ureídeos como forma de transporte de N

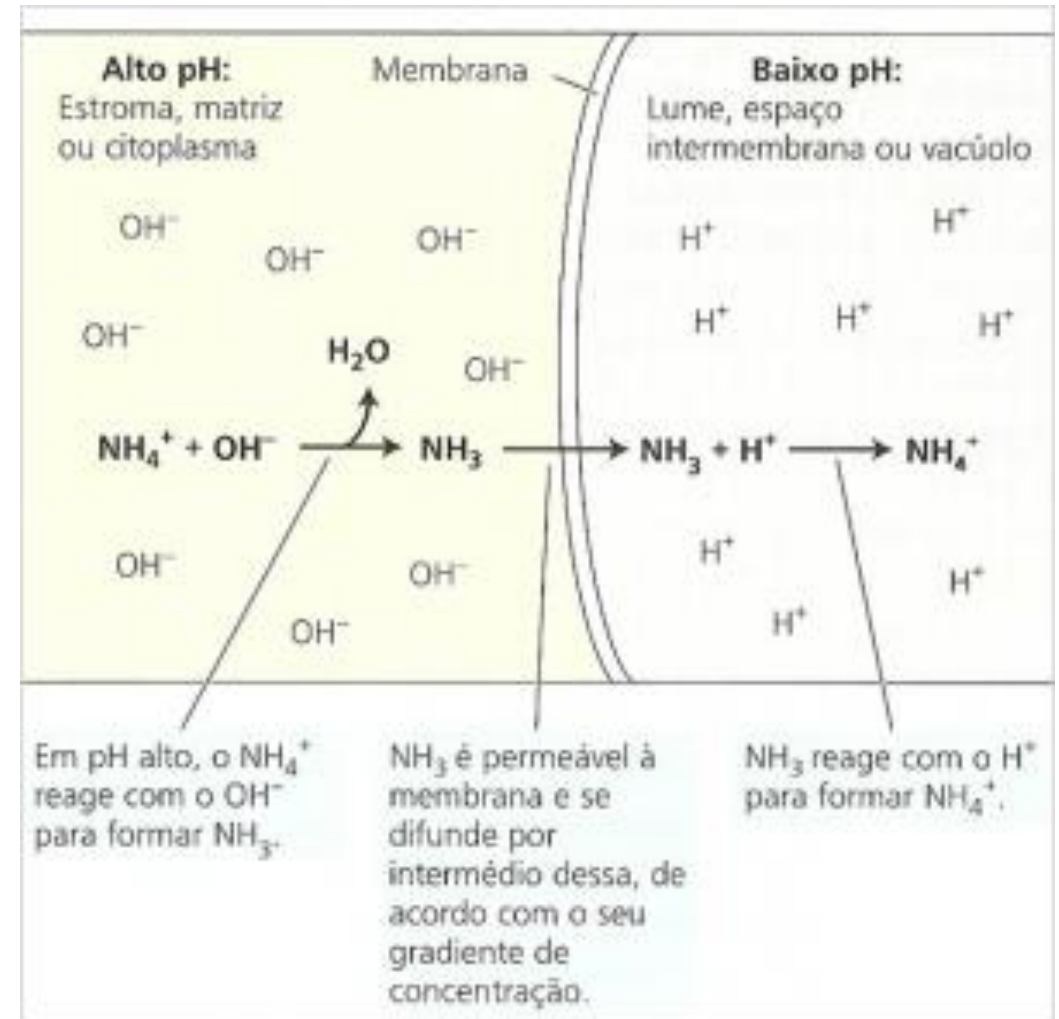
Inter-relação dos processos de assimilação e transporte de nitrogênio

Após a absorção pela planta o nitrogênio inorgânico precisa ser incorporado (ou assimilado) na forma orgânica, sendo posteriormente utilizado nos sítios de consumo da planta, ou seja, nos tecidos em rápido crescimento (folhas em expansão, meristemas, pontas de raiz) e armazenamento de reservas (sementes), sendo esses processos altamente integrados.

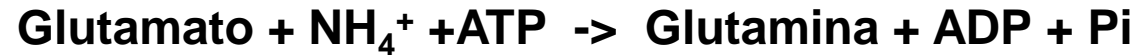


O amônio em altos níveis pode ser tóxico para as plantas, dessa forma, dispersa o gradiente de prótons na transmembrana, que é necessário para o transporte de elétrons na fotossíntese, respiração, cadeia respiratória e para “captura” de metabólitos no vacúolo.

A toxicidade do NH_4^+ pode dissipar os gradientes de pH. O lado esquerdo representa o estroma, a matriz mitocondrial ou o citoplasma, onde o pH é mais elevado. O lado direito representa o lúmen, o espaço intermembrana ou o vacúolo, onde o pH é mais baixo; a membrana representa o tilacóide do cloroplasto, a membrana interna mitocondrial ou o tonoplasto de uma célula de raiz



As células vegetais são capazes de evitar a toxicidade do amônio principalmente pela rápida conversão do mesmo em aminoácidos.



O aumento dos níveis de glutamina nos plastídeos estimula a atividade da GOGAT (glutamina: 2-oxo-glutarato aminotransferase).



As enzimas que utilizam o NADH (opção 1) estão localizadas nos plastídeos de tecidos não fotossintéticos, já as enzimas que utilizam Fd_{red} estão presentes nos cloroplastos e atuam no metabolismo fotorrespiratório do nitrogênio.

Bioquímica da Fixação Biológica do Nitrogênio



**Duas enzimas são importantes e
constituem o complexo da nitrogenase
(Dinitrogenase redutase e dinitrogenase)**

Dinitrogenase reductase

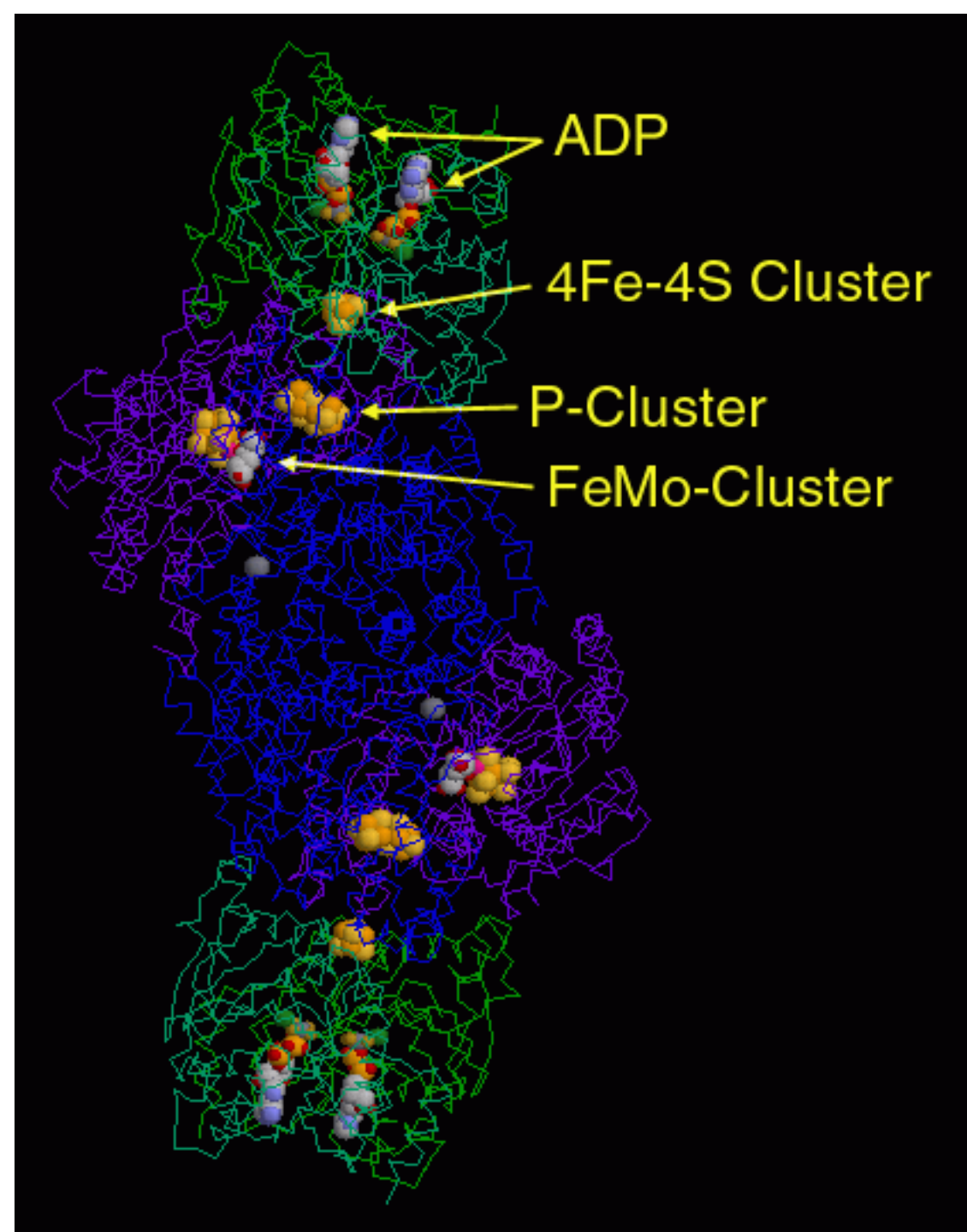
- Homodímero (2 NifH)
- PM 60.000
- 1 complexo 4Fe4S (Centro redoxi) – transfere 1 e⁻
- 2 Sítio de ligação para ATP

Dinitrogenase

- Heterotetrâmero (2 NifK e 2 NifD)
- PM 240.000
- Grupos prostéticos

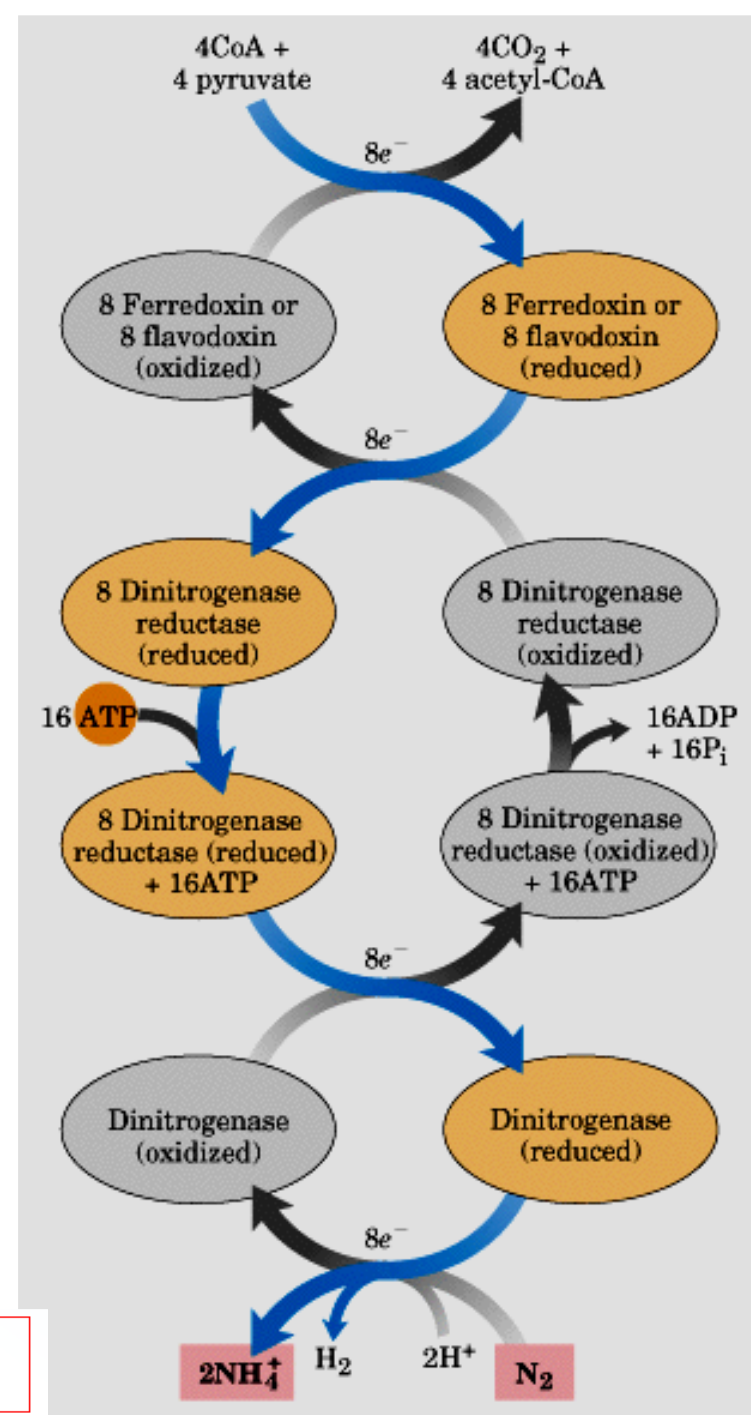
2 sítio P (8Fe7S)

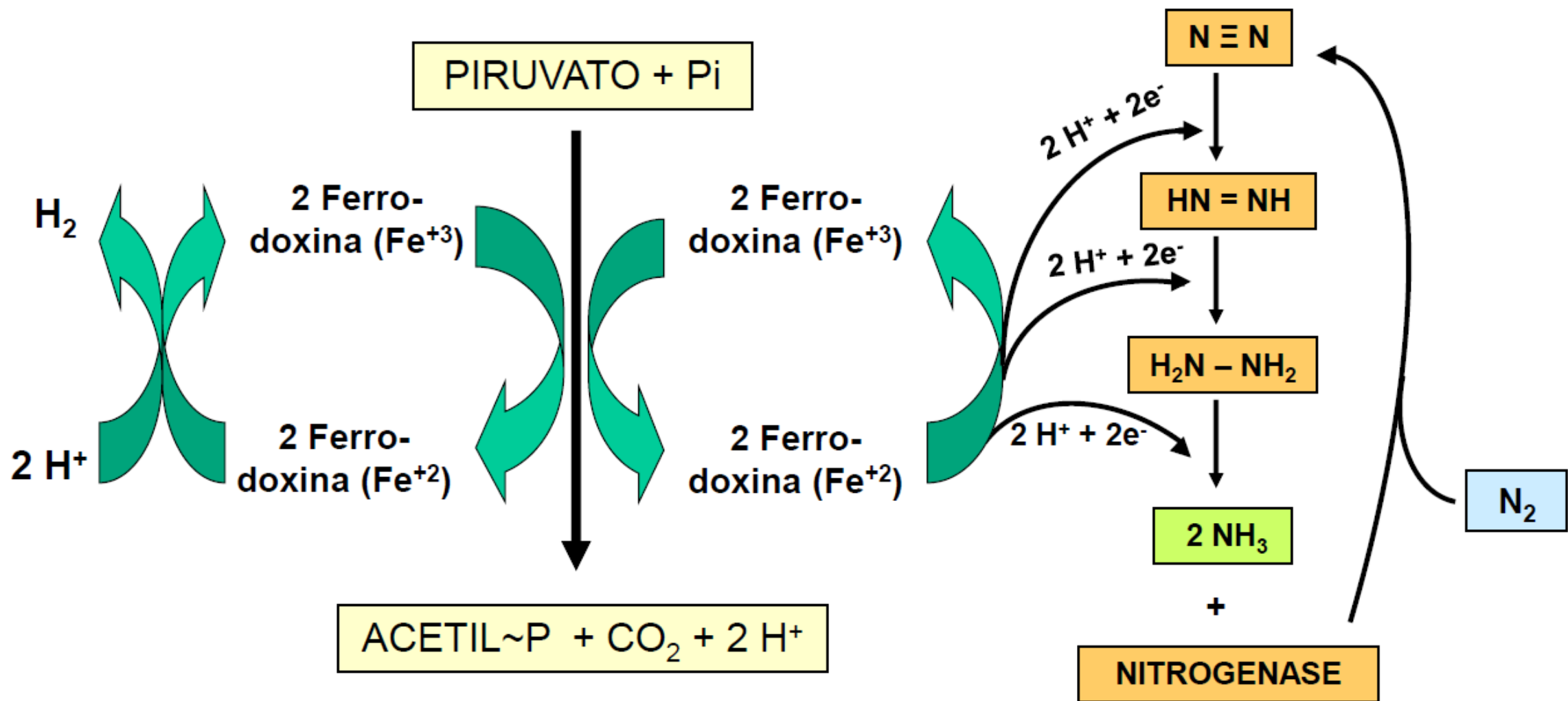
2 FeMoCo (1Mo, 7Fe, 9S e homocitrato)

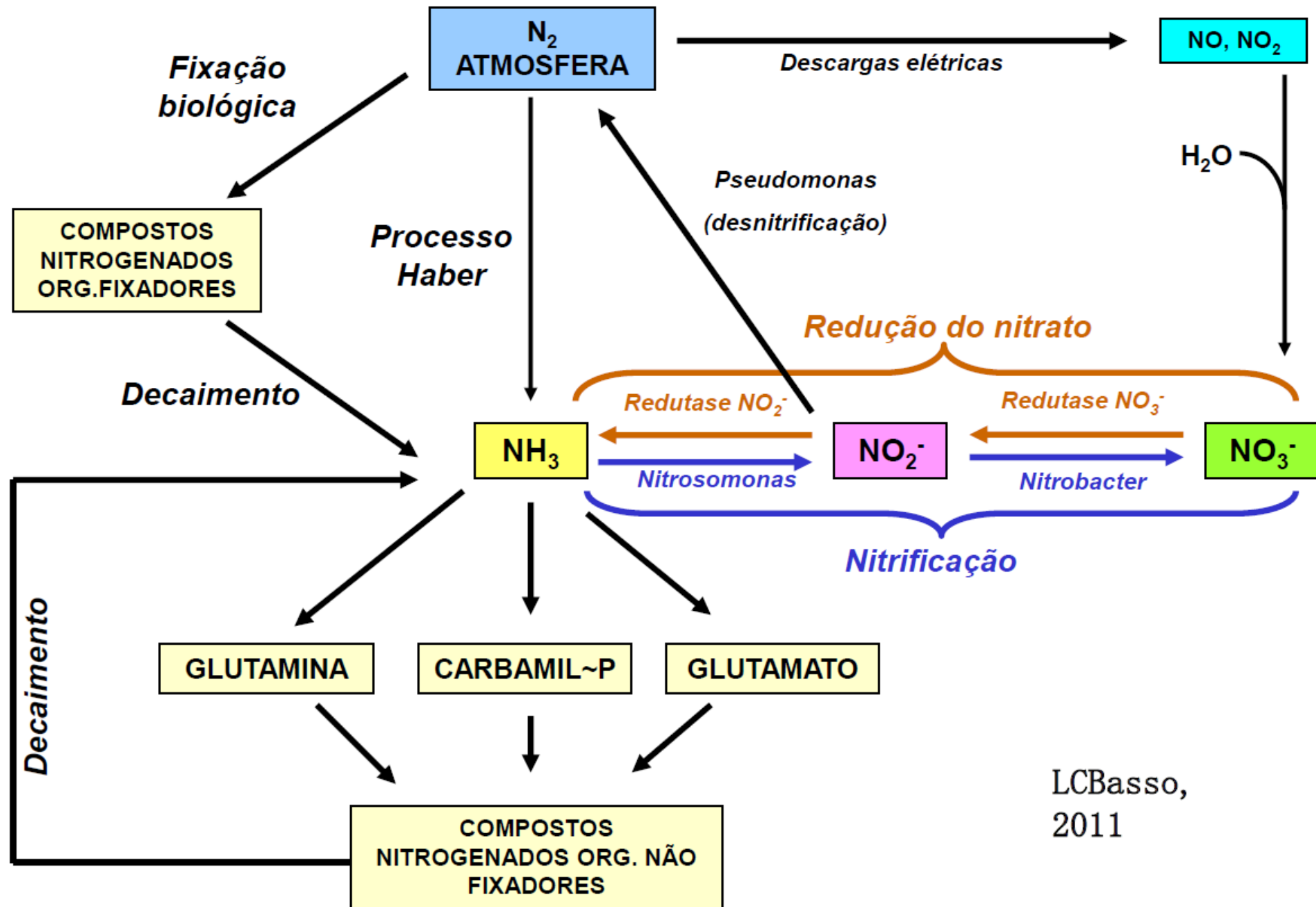


Como ocorre a fixação do nitrogênio pelo Complexo Nitrogenase?

- ✓ Doador de elétrons é o piruvato (NADH)
- ✓ Passam para a dinitrogenase redutase pela ferredoxina (um elétron de cada vez)
- ✓ Chegam à dinitrogenase que deve receber pelo 8 elétrons para reduzir um N₂ a amônio.
- ✓ Dois elétrons a mais são usados para reduzir 2H⁺ em H₂ em um processo que acompanha a fixação do Nitrogênio







LCBasso,
2011