

Fixação Biológica do Nitrogênio

Prof. Dr. Tiago Tezotto

Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas
Departamento de Ciência do solo

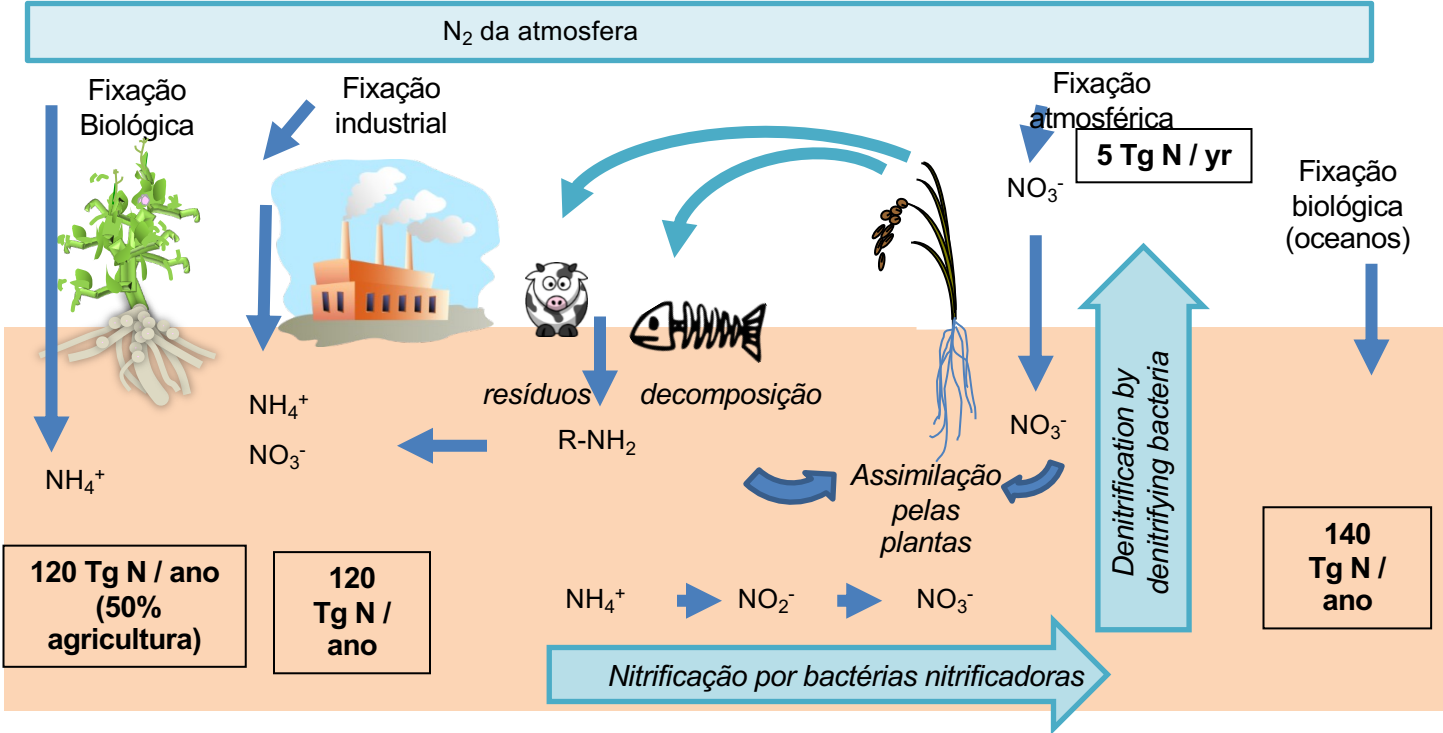


1. Conteúdo

1. Relevância da Fixação Biológica do Nitrogênio
2. Microrganismos envolvidos na FBN
3. Processo de fixação do Nitrogênio
4. Fatores que afetam a FBN
5. Benefícios da FBN no ambiente produtivo



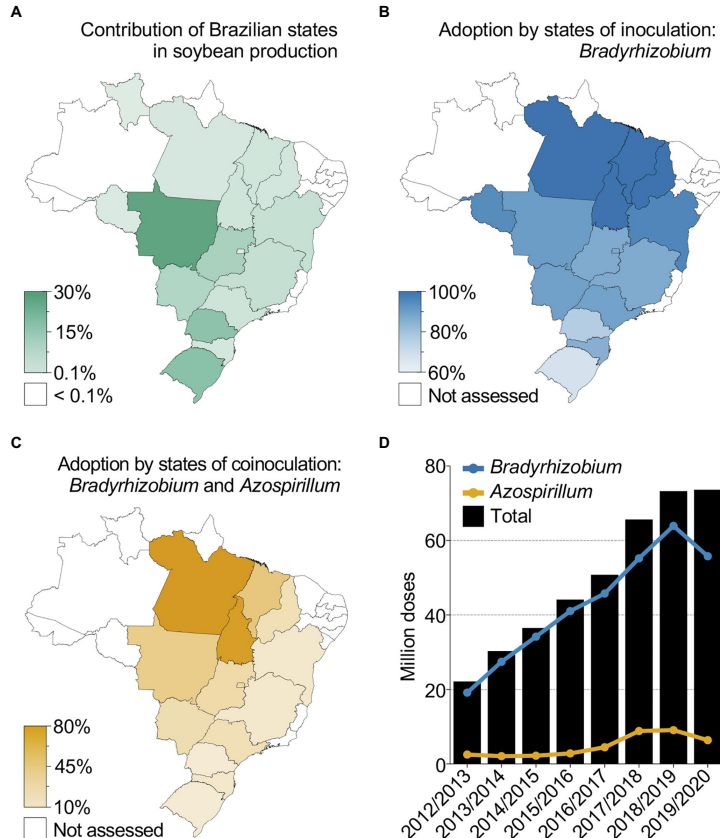
Relevância da fixação biológica do nitrogênio



Adapted from Fowler, D., et al. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. Phil. Trans. Roy. Soc. B: 368: [20130164](https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0164)



Relevância da fixação biológica do nitrogênio



Vamos aos cálculos?

- 1000 kg soja = 80 kg de N
- Produtividade média: 3500 kg/ha
- Demanda: 280 kg/ha N
- Eficiência fertilizante ureia: 50%
- 560 kg/ha N-ureia
- 1000 kg ureia = 460 kg/ha N
- **1200 kg/ha ureia**
- Custo tonelada ureia = US\$ 450
- **Custo por ha = US\$ 540 x R\$ 5**
- Brasil Safra 21/22 – 40,95 milhões/ha

110,7 bilhões – safra 22/23



Microrganismos envolvidos no processo

Bactérias de Vida-livre

Bactérias associativas

Bactérias simbiotes



Microrganismos envolvidos no processo

Vida-livre
Ex.: Cianobactérias

- Organismos fixadores de C e N
- Podem possuir ou não células especializadas para fixação de N - heterócitos



Microrganismos envolvidos no processo

Associativas

Ex.: Bactérias rizosféricas

Diazotrófico	Espécie Vegetal
<i>Azotobacter paspali</i>	<i>Paspalum notatum</i>
<i>Azospirillum brasiliensis</i> / <i>Azospirillum lipoferum</i>	Milho, arroz, sorgo, trigo, cevada
<i>Azospirillum amazonense</i>	<i>Panicum boliviense</i> , <i>Paspalum repens</i> , <i>Sorghum arudinaceum</i> , <i>Brachiaria</i> <i>humidicola</i> , <i>Brachiaria brizantha</i>
<i>Beijerinckia</i> spp.	Cana-de-açúcar, braquiária
<i>Burkholderia brasiliensis</i>	Arroz, mandioca, batata-doce e cana-de-açúcar

- Colonizam a rizosfera das raízes
- Importância em gramíneas
- 20 a 50 kg ha⁻¹ ano⁻¹ N
- PGPR – auxina

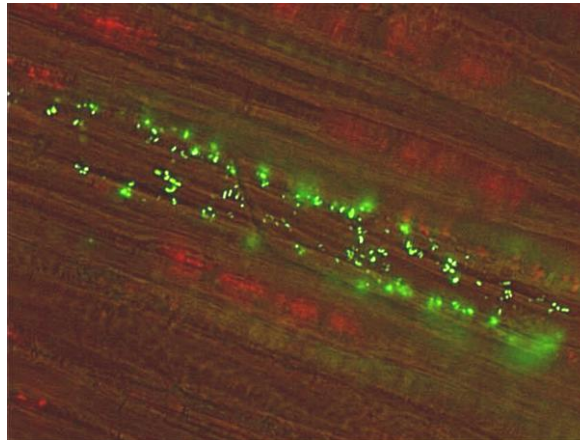
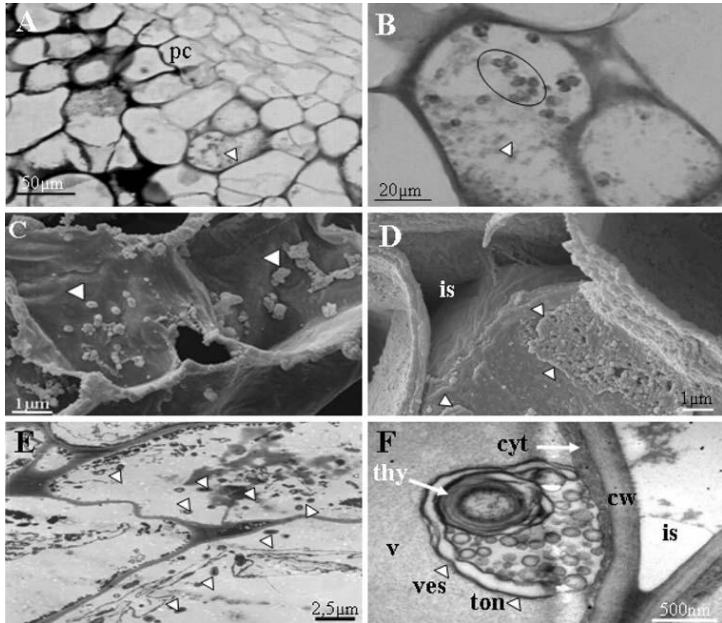


Microrganismos envolvidos no processo

Associativas

Ex.: Bactérias endofíticas

- Organismos inter e intra-celulares
- Colonizam os tecidos das plantas
- Alguns capazes de fixar N

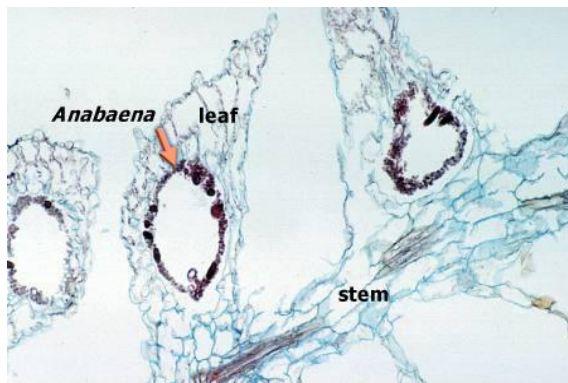


Microrganismos envolvidos no processo

Simbiose

Ex.: Anabaena - Azolla

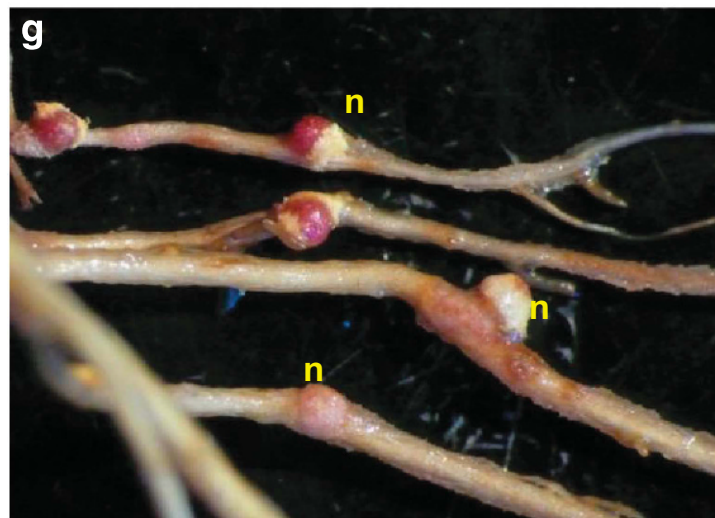
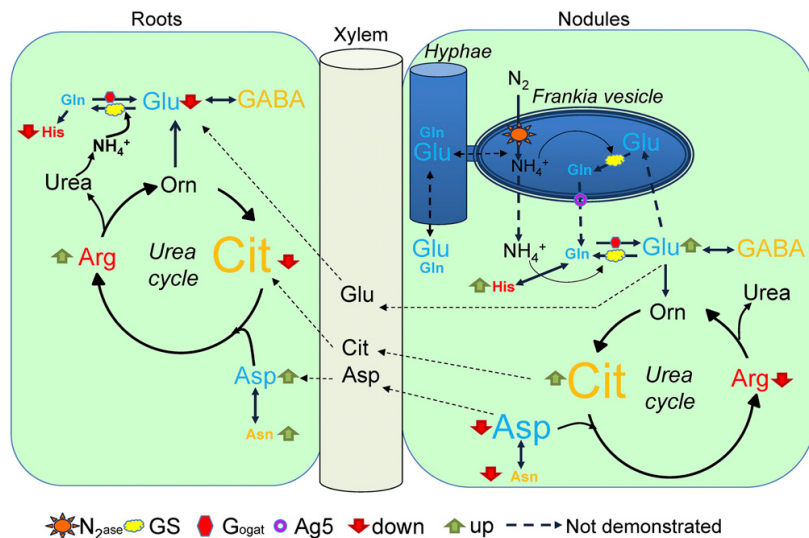
- Azolla – planta aquática que estabelece simbiose com Anabaena
- Sistema fixador de N_2 -atm



Microrganismos envolvidos no processo

Simbiose
Ex.: *Frankia spp.*

- Associação entre actinobactérias e raízes
- Importantes em espécies arbóreas (*Casuarina* e *Alnus*)
- 40 a 300 kg ha⁻¹ ano⁻¹ N



Nódulos *Frankia*
em *Alnus glutinosa*

The *ISME Journal* (2015) 9, 1723–1733; doi:10.1038/ismej.2014.257;

Microrganismos envolvidos no processo

Simbiose

Ex.: *Rhizobium/Bradyrhizobium*

- Associação entre bactérias e raízes formando nódulos
- Importantes em espécies leguminosas (Soja, amendoim, feijão, etc)
- 200 a 600 kg ha⁻¹ ano⁻¹ N ??



Nódulos
Bradyrhizobium
em soja



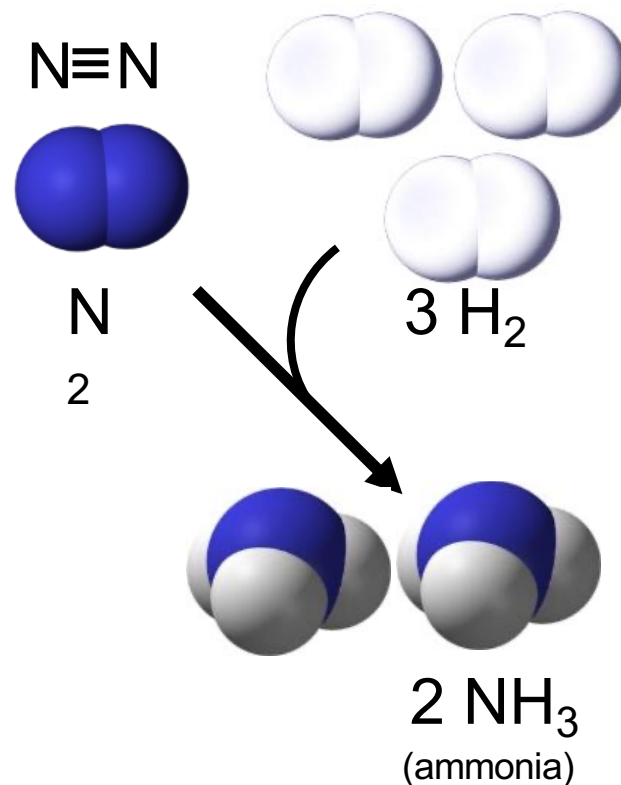
Nódulos *Rhizobium*
em trevo



Processo de fixação do nitrogênio

O nitrogênio deve ser fixado "(reduzido)" e esta ligação tripla quebrado de forma que N se torne biologicamente disponível.

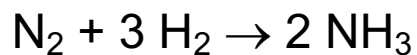
A reação de fixação de nitrogênio exige uma alta entrada de energia.



Processo de fixação do nitrogênio



Fritz Haber



~500 Atmospheres
~600° C
Catalyzed reaction

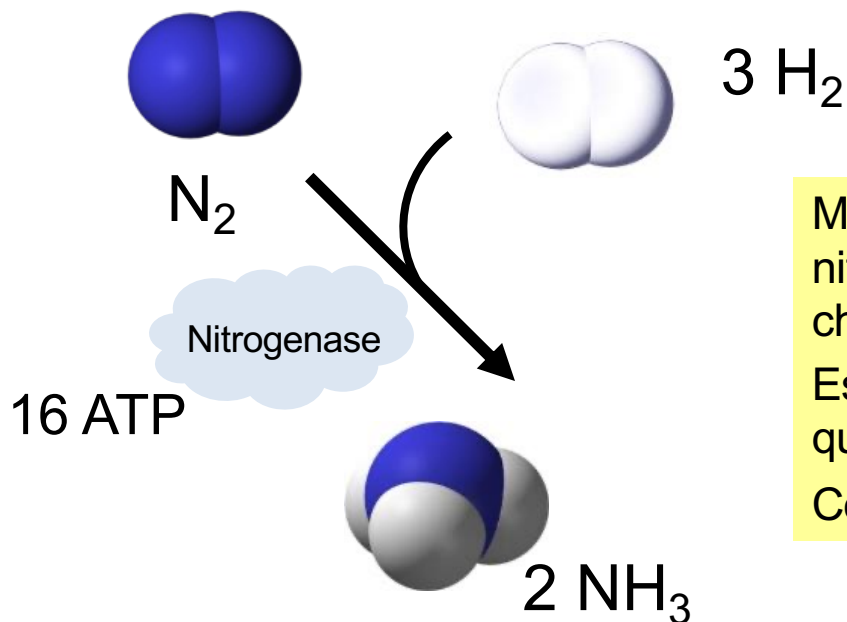


Carl Bosch

Muito caro energeticamente!



Processo de fixação do nitrogênio

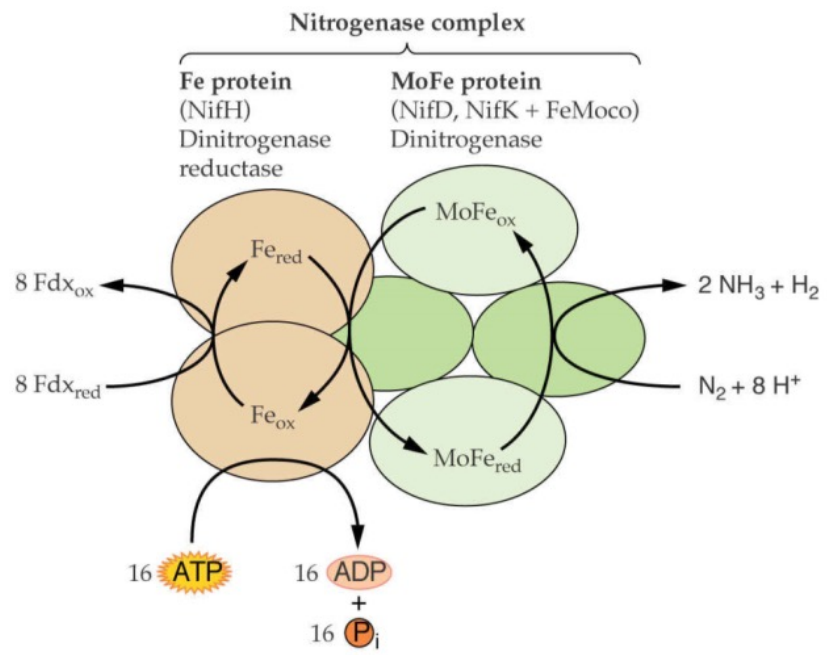
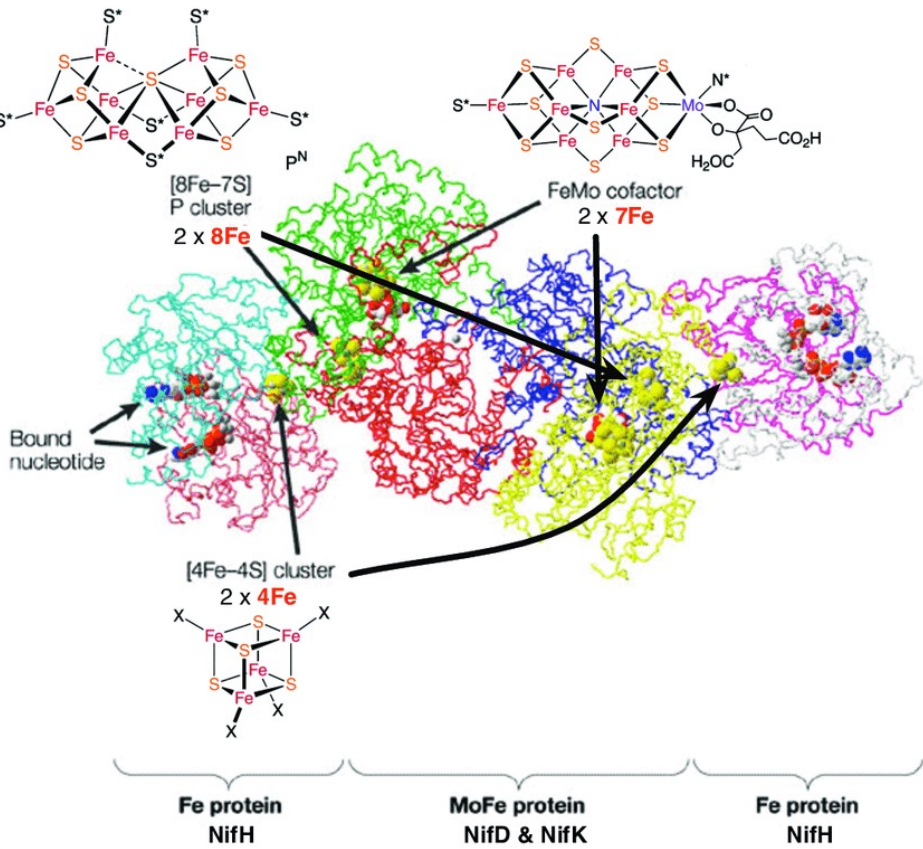


Muitos procariontes podem fixar nitrogênio usando uma enzima chamada **nitrogenase**.

Este processo usa uma grande quantidade de energia celular – ATP
Consumo ~ 12 gr C para 1 g de N_2



Processo de fixação do nitrogênio



Somente procariontes podem produzir nitrogenase!

Processo de fixação do nitrogênio

Associativas
Ex.: Bactérias rizosféricas

20 a 50 kg ha⁻¹ ano⁻¹ N



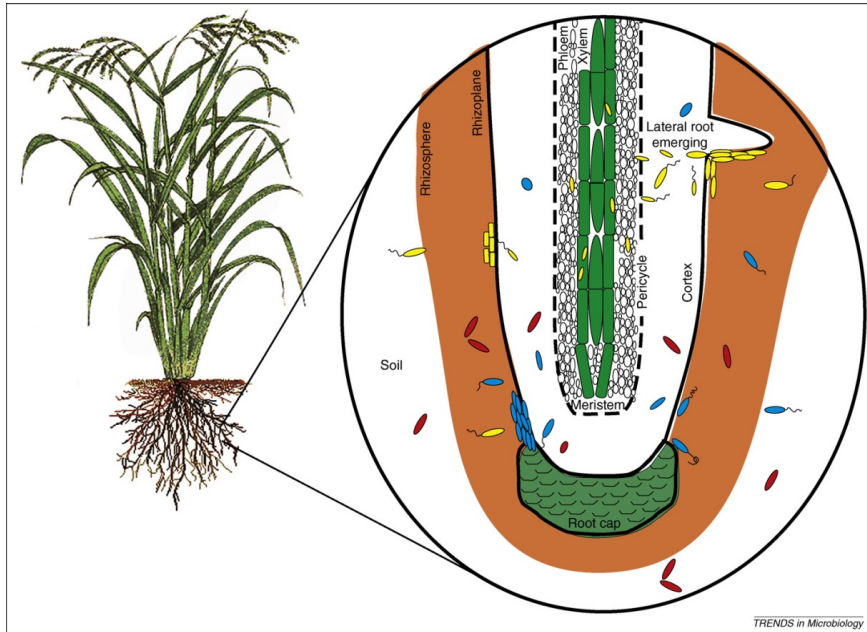
Simbiose
Ex.: Bradyrhizobium

100 a 600 kg ha⁻¹ ano⁻¹ N



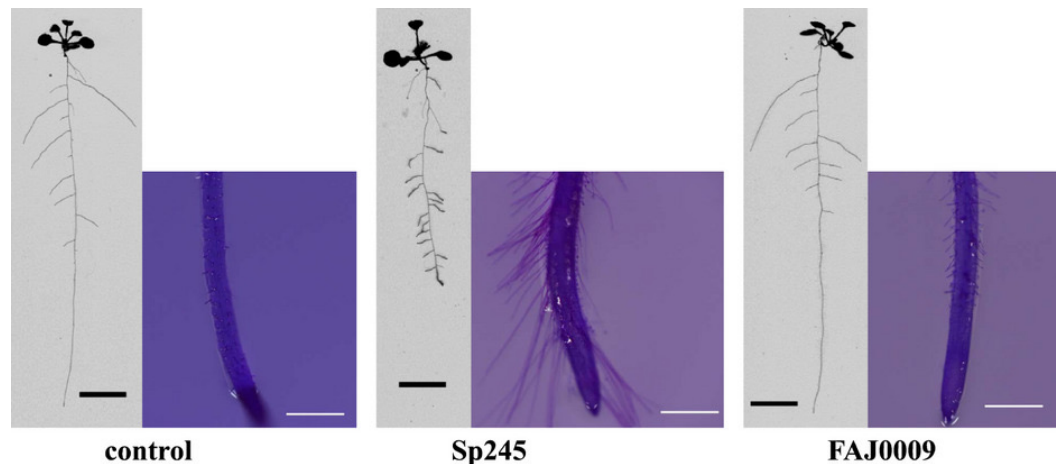
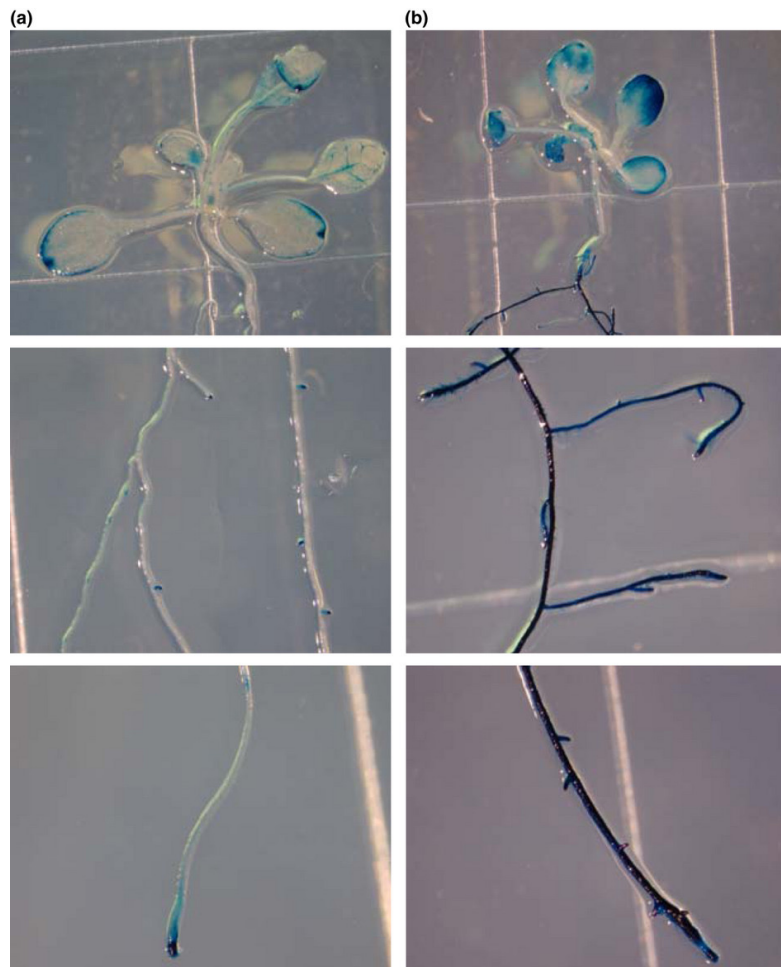
Processo de fixação do nitrogênio - associativas

Associativas
Ex.: Bactérias rizosféricas



- Ambiente de maior disponibilidade de O_2
- Exsudatos radiculares
- Produção fitormônios – auxina
 - Melhor desenvolvimento radicular
- Sinergia com *Bradyrhizobium*
 - Co-inoculação





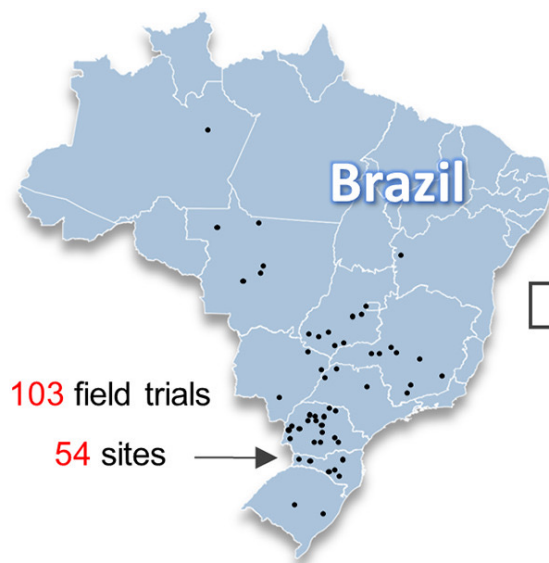
Azospirillum brasilense inoculation (b) increases the internal auxin concentration in *Arabidopsis thaliana* compared with control (a), as visualized by the auxin reporter gene *DR5::GUS*. Images show shoot, middle section of the root and root tip for both treatments. Seedlings were inoculated 7 d post-germination at a concentration of 4E6 colony-forming units (CFU) per plate, and β -glucuronidase (GUS) staining was performed at 7 d post-inoculation (dpi).

<https://doi.org/10.1111/nph.12590>



Processo de fixação do nitrogênio - associativas

Meta-analysis of maize response to inoculation with *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6



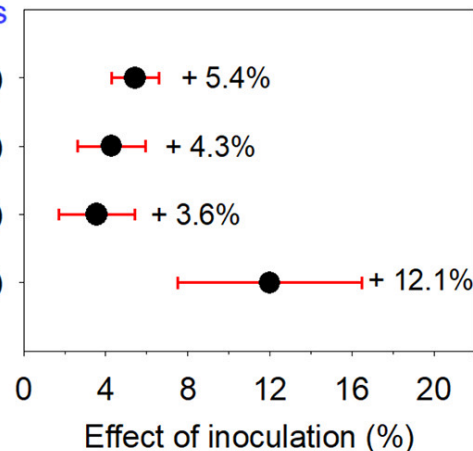
Maize attributes

Grain yield (493)

Leaf N (139)

Grain N (89)

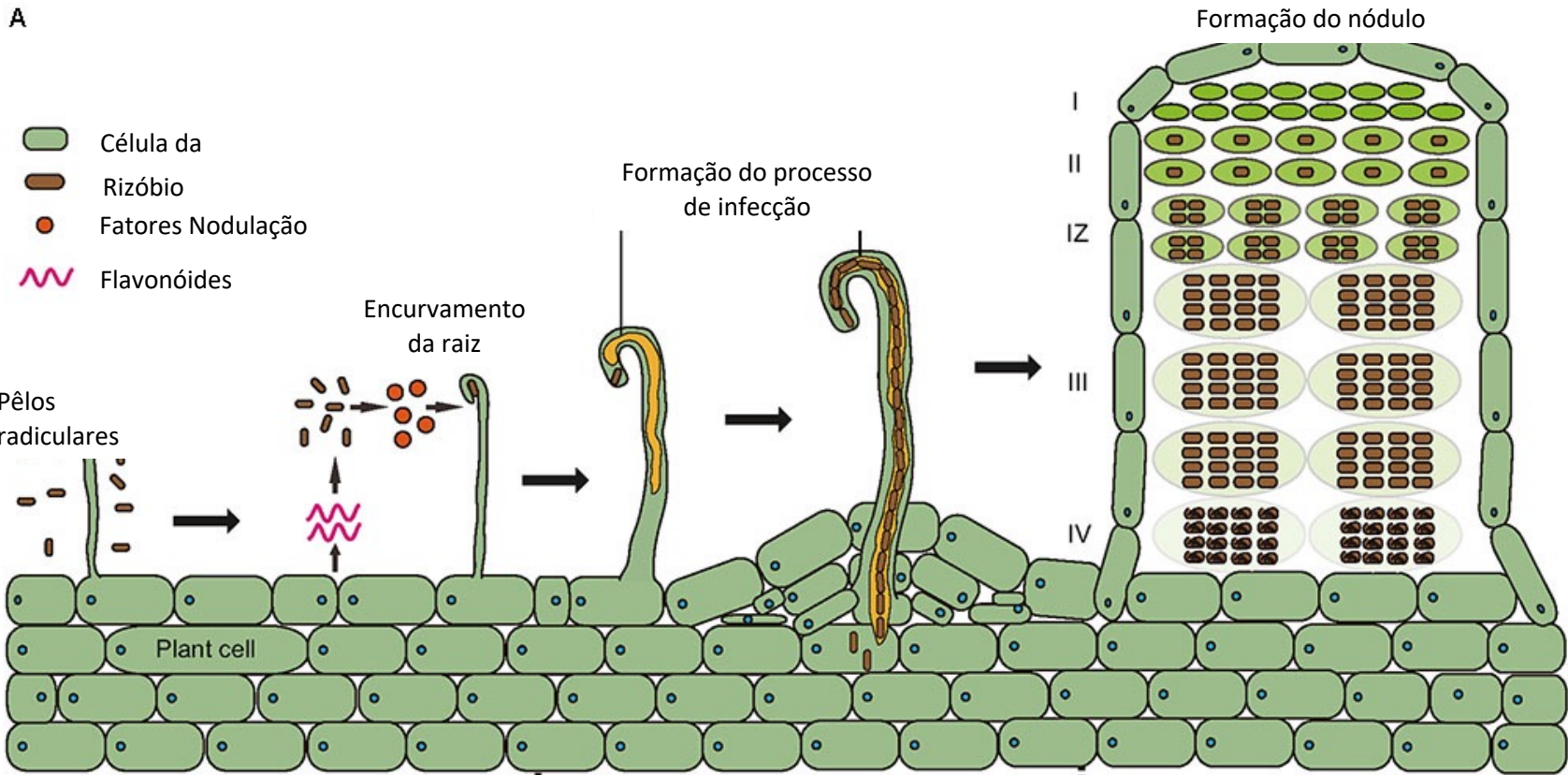
Root mass (19)



++ Positive effects of inoculation on grain yield regardless of the controlling factor evaluated: Inoculation methods; yield and N fertilization classes; maize characteristics; soil and climate. **++**

Processo de fixação do nitrogênio

A



Wang et al., 2018

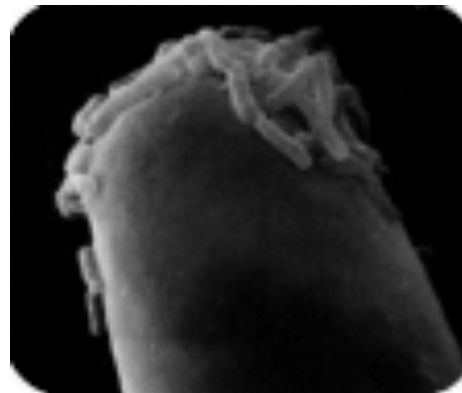


Processo de fixação do nitrogênio – desenvolvimento do nódulo

1. Processo de pré-infecção



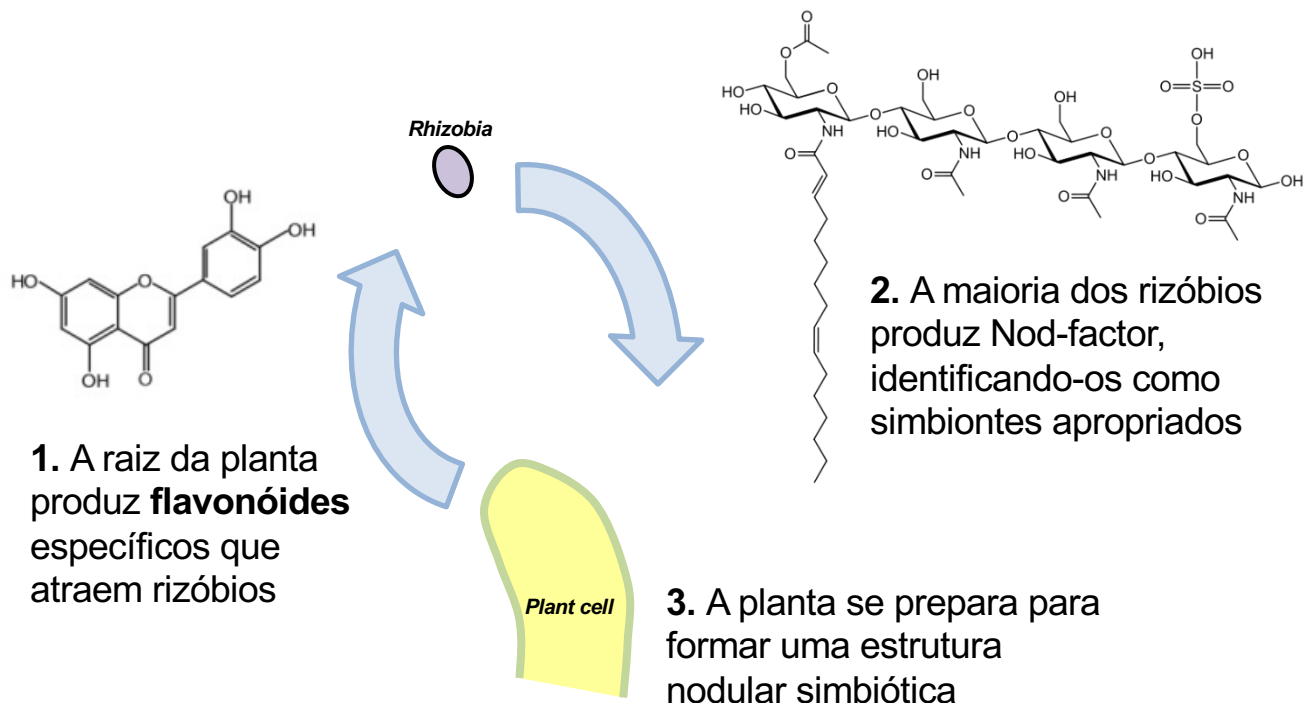
Quimiotaxia



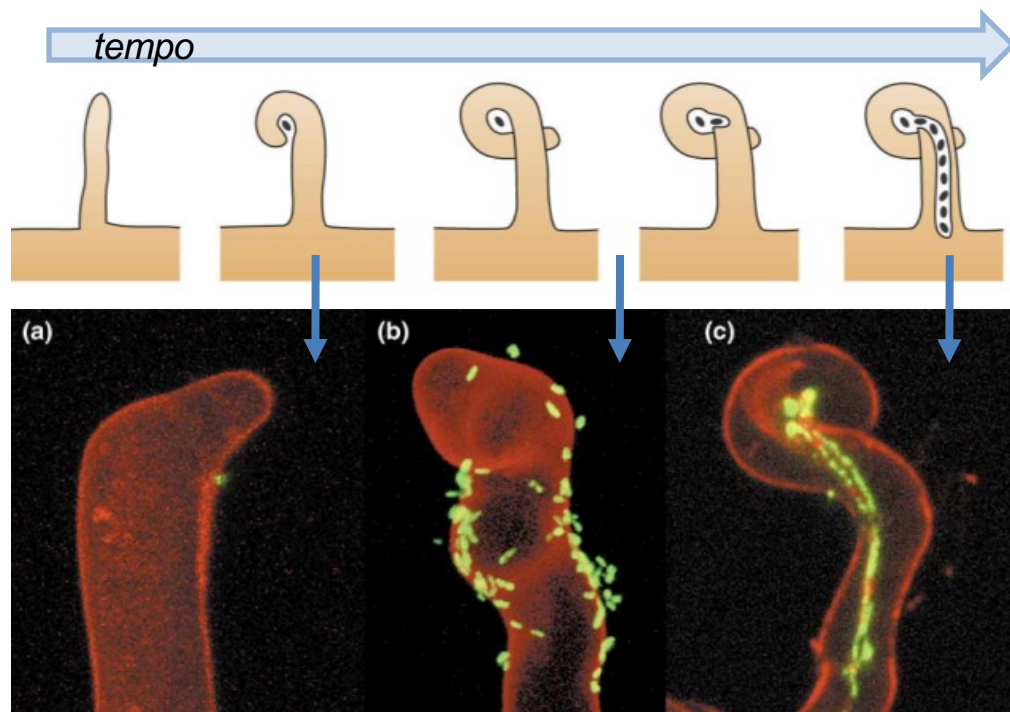
Aderência



Processo de fixação do nitrogênio



Processo de fixação do nitrogênio



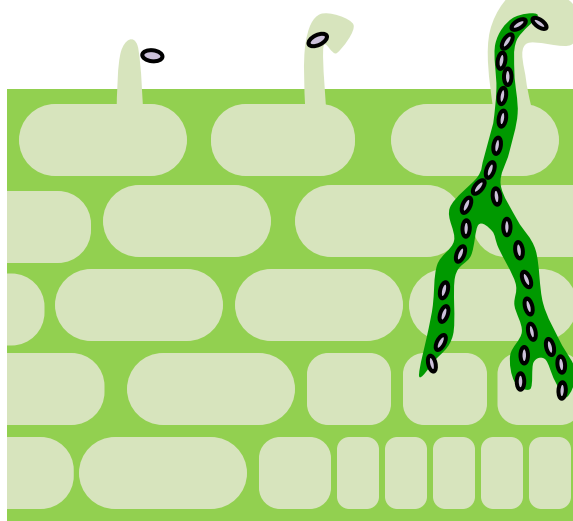
- Nod-factors são concentrados na parede celular e quase imóveis
- Nod-factors causa um redirecionamento no crescimento (figura a)
- Apenas algumas bactérias realmente redirecionam o crescimento dos pêlos radiculares com sucesso e ficam envolvidas em um fio de infecção

Modified from: Buchanan, B.B., Gruissem, W. and Jones, R.L. (2000) [Biochemistry and Molecular Biology of Plants](#). American Society of Plant Physiologists.

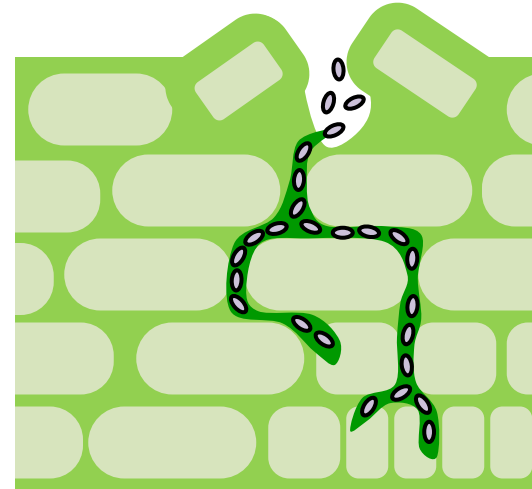


Processo de fixação do nitrogênio

Em 75% dos legumes nodulantes, as bactérias penetram pelos pêlos radiculares



Nos restantes 25% (p. Ex., Amendoim), as bactérias entram através de fendas na epiderme, por vezes promovidas pela formação de raízes laterais

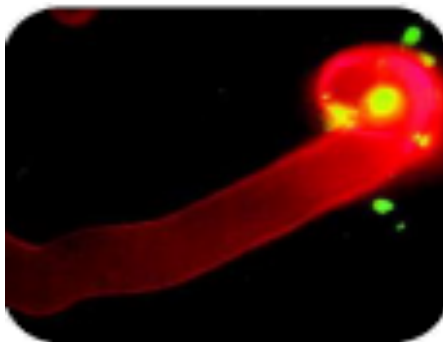


Adapted from Oldroyd, G.E.D., and Downie, J.A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: [519-546](#).



Processo de fixação do nitrogênio – desenvolvimento do nódulo

2. Processo de infecção



Encurvamento do pêlo radicular



Crescimento do cordão de infecção

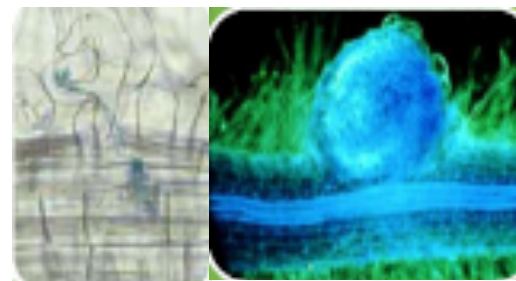


Processo de fixação do nitrogênio – desenvolvimento do nódulo

3. Processo de formação do nódulo



Ramificação do cordão e
hiperplasia das células
infectadas

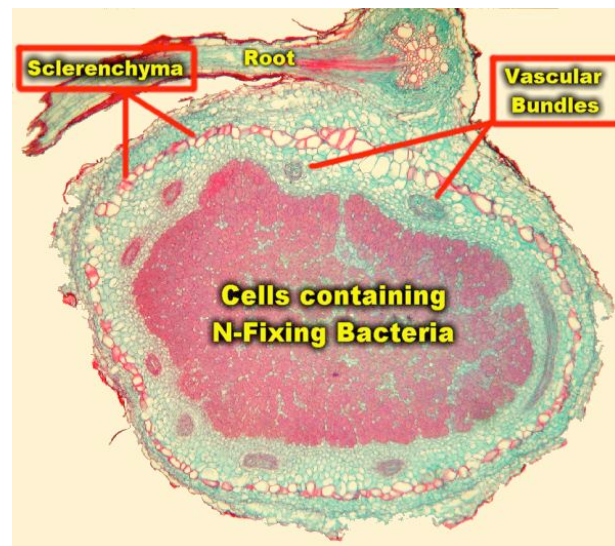


Multiplicação das bactérias,
diferenciação em bacteroides e
formação da membrana
peribacteroide



Processo de fixação do nitrogênio – desenvolvimento do nódulo

4. Estabelecimento da estrutura nodular

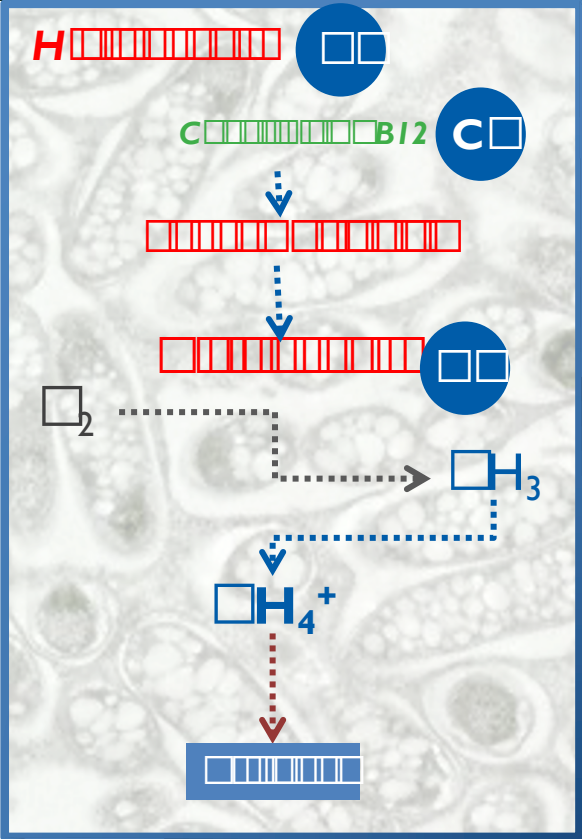


Estrutura do nódulo



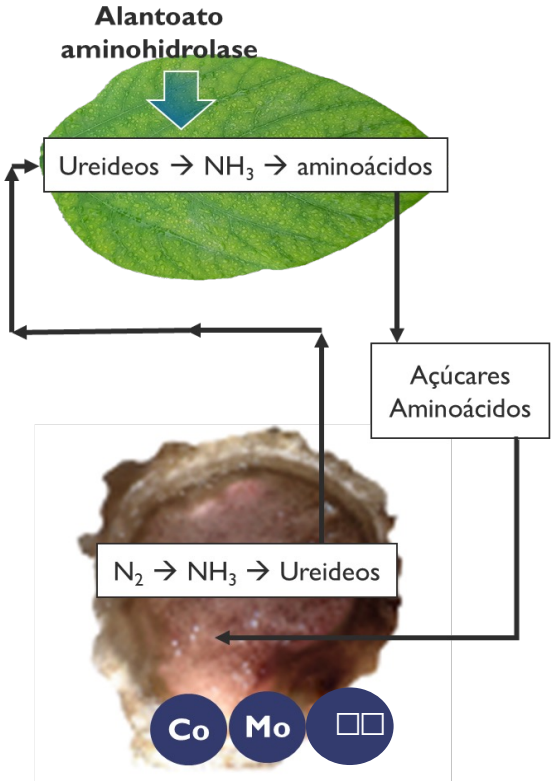
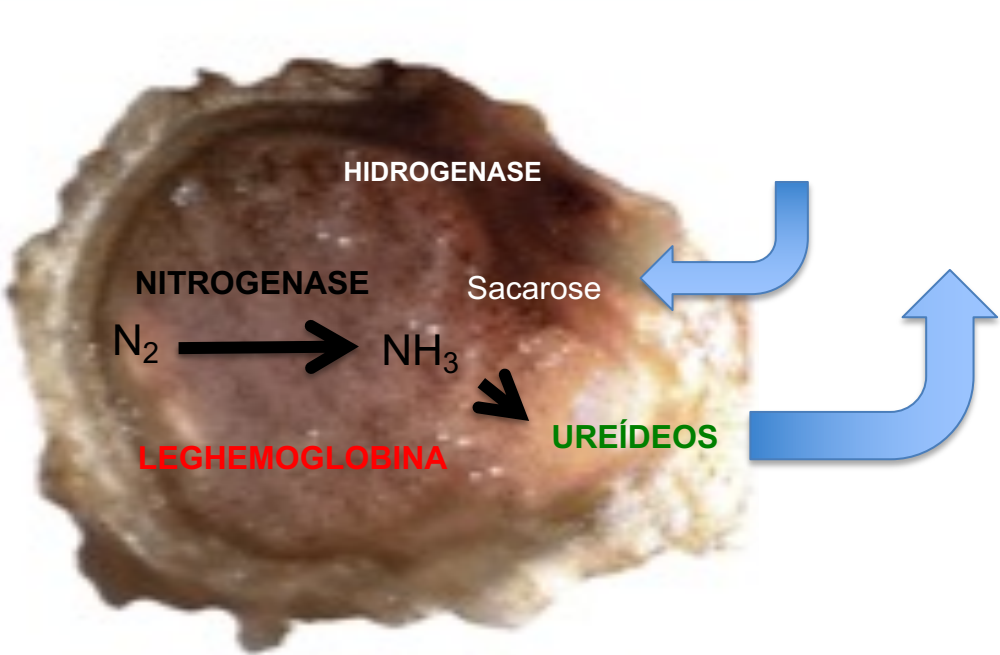
Processo de fixação do nitrogênio – desenvolvimento do nódulo

5. Atividade nodular

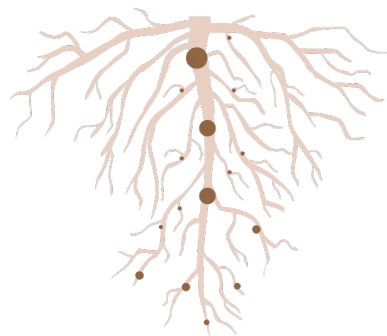


Processo de fixação do nitrogênio

www.esalq.usp.br

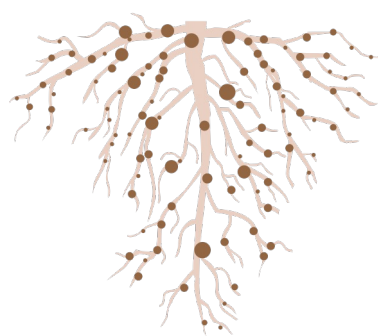


Fatores que afetam a fixação biológica do N



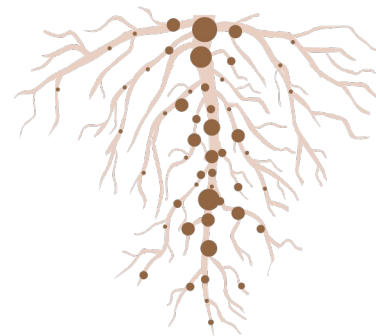
Nodulação fraca

- ✓ < 4 nódulos na raiz principal
- ✓ Nodulação secundária em raízes mais profundas



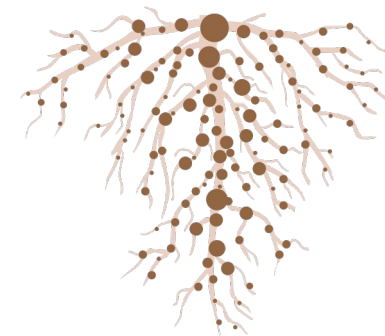
Nodulação raízes secundária

- ✓ Poucos nódulos na raiz principal
- ✓ Presença de nódulos na raízes secundárias



Nodulação em formação

- ✓ 5 a 10 nódulos na raiz principal
- ✓ Bastante nódulos pequenos nas raiz principal e secundária



Nodulação estabelecida

- ✓ 10 a 15 nódulos na raiz principal
- ✓ Nodulação abundante nas raízes secundárias

Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante

Inoculante, por definição legal, tal como se encontra na legislação do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, é “todo o produto que contenha microrganismos favoráveis ao crescimento de plantas”.



Inoculante líquido



Inoculante turfoso



Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante

Bactéria	Leguminosa
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> <i>Bradyrhizobium elkanii</i> <i>Sinorhizobium fredii</i>	Soja
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , biovar <i>phaseoli</i> <i>Rhizobium tropici</i> <i>Rhizobium etli</i>	Feijão
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , biovar <i>viciae</i>	Lentilha, ervilha
<i>Rhizobium leguminosarum</i> , biovar <i>trifolii</i>	Trevos
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Alfafa, trevo carretilha
<i>Mesorhizobium loti</i>	Lotus corniculatus
<i>Bradyrhizobium spp.</i>	Amendoim, leguminosas tropicais (centrosema, mucuna, caupí, etc.).



Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante

Além da divisão em gênero e espécie, as bactérias se subdividem em estirpes. Estas estirpes se diferenciam entre si pela maior ou menor capacidade de fixar o nitrogênio e transferi-lo para as plantas. Selecionar estirpes de rizóbios para que as mais produtivas sejam incorporadas ao inoculante.

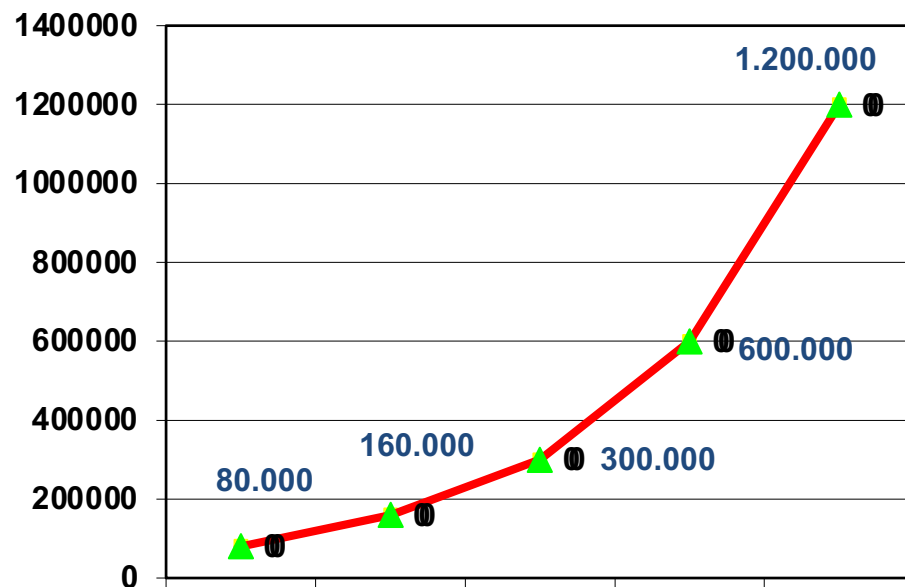
- Masterfix[®] L Gramíneas: inoculante líquido para milho e trigo produzido pela Stoller do Brasil Ltda, tendo como garantia a bactéria *Azospirillum brasilense* (cepas AbV5 e AbV6), na concentração de 1×10^7 UFC mL⁻¹;

- Masterfix[®] L Soja: inoculante líquido para soja, produzido pela Stoller do Brasil Ltda, tendo como garantia as bactérias *Bradyrhizobium elkanii* (cepa Semia 5019) e *Bradyrhizobium japonicum* (cepa Semia 5079), na concentração de 5×10^9 UFC mL⁻¹.



Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante

Este número era de 80.000 ha 15 anos, depois aumentou para 160.000, mais tarde para 300.000, para 600.000 e, atualmente, a recomendação da RELARE e da Reunião de Pesquisa de Soja é de 1.200.000 bactérias por semente, embora na legislação ainda permaneça o número de 600.000 bac/sem.



Cálculo do número de bactérias por semente:

$$\text{Bac/sem.} = \frac{\text{Conc. Inoculante} \times \text{dosagem}}{350.000}$$

350.000 = Número médio de sementes em uma saco de 50 kg.



Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante



Máquinas para tratamento de sementes



Equipamentos para aplicação no sulco



Fatores que afetam a fixação biológica do N - inoculante



Tratamento das sementes

Dose: 4 ml/kg de semente

Após os defensivos, micronutrientes e bioreguladores

Evitar exposição das sementes ao sol

Período máximo entre TS e semeadura: 18 horas



Sulco de plantio

Dose mínima: 300 mL/ha

Volume de calda mínimo: 30-50 L/ha

Para mistura com outros produtos, consultar empresa Inoculante

Tanque com proteção térmica

Utilizar calda no máximo até 12 horas após o preparo



Fatores que afetam a fixação biológica do N - planta



Redução Fotossíntese

Nitrogênio

Carbono

Redução FBN

Redução da
produtividade



Fatores que afetam a fixação biológica do N – ambiente

Cultura antecessora: sinalização planta x bactéria (ex. cana-de-açúcar)

Quantidade de Nitrogênio: excesso de nitrogênio inibe a FBN (Max. 20 kg N/ha)

Disponibilidade de Cobalto, Molibdênio e Níquel: **Co** para o funcionamento da Leghemoglobina, **Mo** da Nitrogenase e **Ni** para hidrogenase

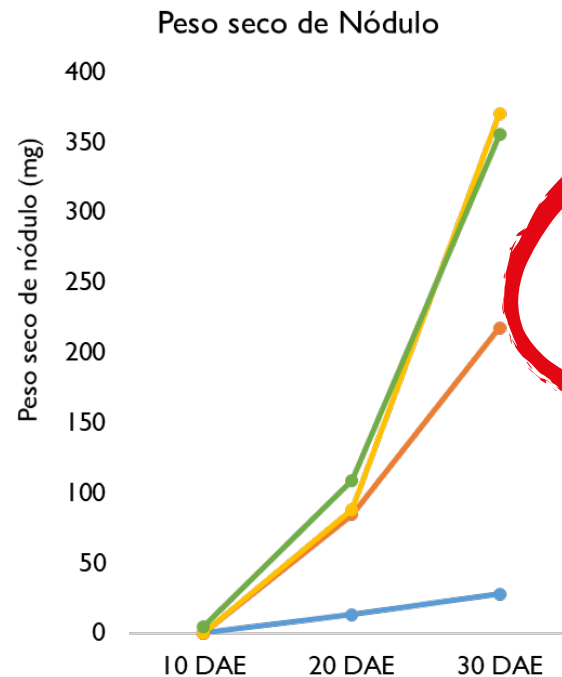
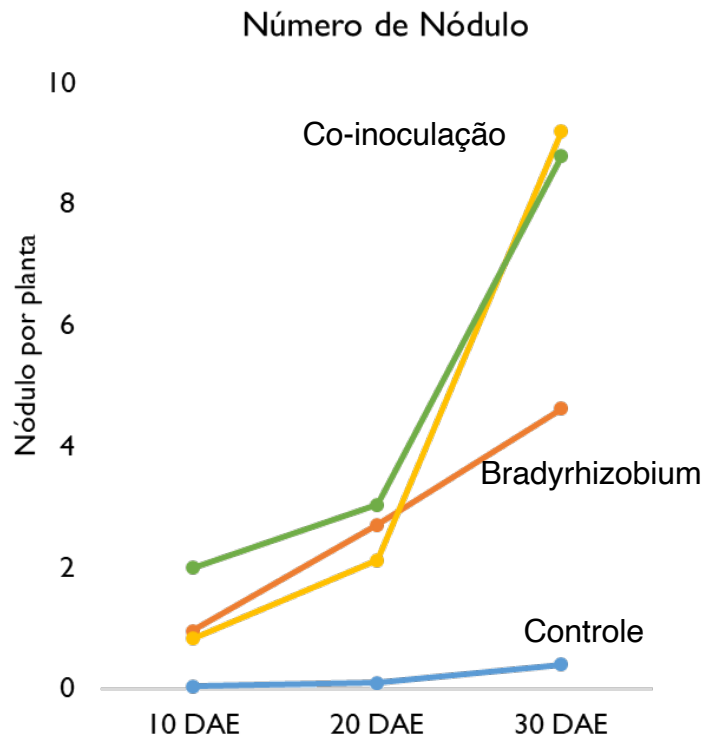
Temperaturas extremas: ideal em torno de 28°C.

Disponibilidade hídrica: a desidratação da bactéria no meio é o principal fator detrator.

Nebulosidade: afeta a fotossíntese e conseqüentemente a simbiose. (nódulos verdes).



Fatores que afetam a fixação biológica do N – Co-inoculação



Co-inoculação: Nódulos melhores e mais precoce o Bradyrhizobium



Benefícios da FBN

- **Rotação de culturas com leguminosas**
- **Fornecimento de N para a cultura sucessora**



Benefícios da FBN



Benefícios da FBN

Associação *Gluconacetobacter* - cana-de-açúcar

- ✓ *G. diazotrophicus* é uma bactéria endofítica isolada do colmo de cana-de-açúcar
- ✓ É uma bactéria acidófila (cresce em meio com pH 3) e tolerante a altas concentrações de açúcar
- ✓ Cana-de-açúcar pode obter até 60% de sua necessidade de N da FBN (aproximadamente 164 kg N fixado ha⁻¹ ano⁻¹). Outras bactérias endófitas ocorrem em cana, tais como *Herbaspirillum seropedicae*.
- ✓ Transferência via toletes



Benefícios FBN

Inoculante para cana-de-açúcar

- ✓ Desenvolvido pela EMBRAPA
- ✓ Mistura de *Gluconacetobacter diazotrophicus*
Herbaspirillum seropedicae
Herbaspirillum rubrisubalbicans
Azospirillum amazonense
Burkholderia tropica
- ✓ Recomendado para cana de primeiro ano (inoculante + 30 kg N por ha)



**“A planta sempre está certa,
o que pode estar errado é a
interpretação humana”**

José Peres Romero e Eurípedes Malavolta

Obrigado!

Prof. Dr. Tiago Tezotto
tiago.tezotto@usp.br



ESALQ
