

NITRIFICAÇÃO (*)

E. MALAVOLTA

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de S. Paulo — Piracicaba

INTRODUÇÃO

A palavra "nitrificação" é usada para designar o processo pelo qual formas reduzidas de nitrogênio, representadas pela amônia principalmente, são convertidas em nitrito ou nitrato no solo ou em outros meios. O nitrogênio incorporado ao terreno, seja por fixação ou por decomposição da matéria orgânica apresenta-se em geral combinado na forma de amônia ou de outros produtos reduzidos. Os nitratos, entretanto, são a forma de nitrogênio predominantemente absorvida pelas plantas superiores: a oxidação prévia da amônia a nitrato no solo corre por conta dos organismos nitrificadores, autotróficos ou heterotróficos.

A primeira demonstração da natureza biológica dessa oxidação foi dada por SCHLOESING & MUNZ em 1877; eles encheram um tubo com areia esterilizada e forçaram água de esgoto contendo amônia a correr através do mesmo; por vários dias o percolado continha amônia; depois de três semanas, porém, apareceu nitrato em lugar da amônia. A esterilização da areia com clorofórmio ou pelo calor destruía a sua capacidade de converter amônia em nitrato, mas a inoculação com água barrenta restaurava a atividade. WINOGRADSKY (1891, 1893) isolou os organismos implicados na reação e foi o seu trabalho combinado com aquele de FRANKLAND & FRANKLAND (1890) que estabeleceram a natureza autotrófica da mesma. As culturas ativas, isoladas com o uso de placas solidificadas por sílica gel, continham dois tipos de bactérias, fá-

(*) Parte de um trabalho sobre nitrificação efetuado com ajuda do C. N. Pq. e da Fundação Rockefeller. Apresentado no Simpósio sobre Fisiologia de Microrganismos da Soc. Bras. Progr. Ciência (Rio de Janeiro, Julho de 1957).

cilmente separáveis: *Nitrosomonas*, responsável pela conversão de amônia a nitrito e *Nitrobacter* capaz de oxidar nitrito a nitrato.

Para uma excelente revisão da literatura no problema da nitrificação veja-se DELWICHE (1956).

BACTÉRIAS NITRIFICADORAS

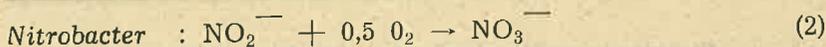
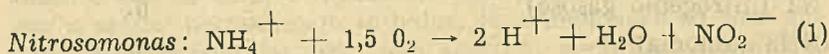
Classificação. O Manual de BERGEY (BREED et al., 1948) relaciona cinco gêneros de organismos capazes de oxidar o íon amoniacal em nitrito; entre eles estão *Nitrosomonas* que BOEMECKE (1951) dividiu em duas espécies, *N. europaeae* e *N. oligocarbogens*; *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrocystis* e *Nitrogloea*; entre os organismos capazes de oxidar nitrito a nitrato estão: *Nitrobacter* do qual parecem existir pelo menos duas espécies, *N. winogradskyi* e uma forma móvel, *N. agile* e *Nitrocystis*.

Fisiologia. As bactérias nitrificadoras têm um número de propriedades fisiológicas que as tornam particularmente interessantes do ponto de vista bioquímico. São autotróficas obrigatórias e portanto incapazes de crescer em meio orgânico. Essa toxidez dos compostos orgânicos tem sido largamente estudada (MEYERHOF, 1916; KINGMA BOLTJES, 1935); a glicose particularmente deprime o crescimento: concentrações tão baixas como 0,0025 já causam uma inibição detectável; essa concentração de glicose não tem efeito na intensidade de oxidação da amônia ou do nitrito e, em geral, a influência dos compostos orgânicos parece ser específica para o crescimento e não para a nitrificação. Os efeitos inibitórios da glicose e de outros compostos orgânicos são menos acentuados em solos ou culturas em areia do que nos meios líquidos; isto, evidentemente, é correlacionado com o fato de que os organismos vivem no terreno embora este contenha ordinariamente uma certa porcentagem de matéria orgânica (BONNER, 1950).

Essa flagrante incapacidade dos nitrificadores para sobreviver em substratos orgânicos é de interesse particular quando considerada à vista dos processos metabólicos prováveis. É uma característica padrão da maioria das formas vivas o possuir algum tipo de material para armazenamento o qual pode ser usado como substrato em condições adversas ou que é normalmente consumido nas reações endergônicas que levam à formação dos constituintes celulares. O fato de que *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* não serem capazes de se utilizar dos subs-

tratos orgânicos usuais sugere alguma irreversibilidade nas reações de síntese ou pelo menos ausência de mecanismo conhecido para deles extrair energia. As células parecem conter aminoácidos e carboidratos mais ou menos típicos mas o caminho para a sua biossíntese é completamente desconhecido. Neste particular é interessante dizer que, embora a *galactose* e *ramnose* e a *xilose* estejam presentes em *Nitrosomonas*, ainda não se encontrou glicose (HOFMAN, 1953). Na verdade é ainda apenas presunção a existência de compostos fundamentais como os fosfatos ricos de energia no metabolismo desses organismos. Foi observada uma baixa respiração endógena em *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* na ausência dos seus substratos inorgânicos costumeiros; parece, então, que eles possuem ao menos alguma capacidade para oxidar compostos orgânicos.

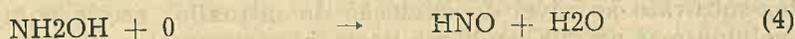
Bioquímica. Os estudos iniciais de GODLEWSKI (1895) e de MEYERHOF (1917) levou-os a formular a oxidação da amônia por *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* da maneira seguinte:



HOFFMAN & LEES (1952) em estudos manométricos confirmaram a formulação de MEYERHOF para *Nitrosomonas*.

A oxidação do íon amoniacal ao nível de nitrito implica numa mudança da valência do nitrogênio de -3 a $+3$ de modo que um total de 6 eletrônios são removidos na oxidação completa por *Nitrosomonas*; na reação executada por *Nitrobacter* mais dois eletrônios são transferidos para chegar à valência $+5$ (ver Tabela 1).

KLUYVER & DONKER (1926) postularam que a oxidação do NH_4^+ tem lugar em três passos cada um implicando dois eletrônios:

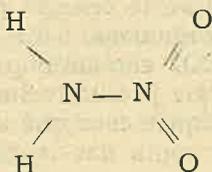


Só recentemente, porém, é que se ganhou provas experimentais dando indicações sobre possíveis intermediários. LEES (1952) obteve evidência da oxidação da hidroxilamina em baixas concentrações. Ainda mais: na presença de hidrazina como inibidor a hidroxilamina se acumula no meio de cultura; na presença de aliltiouréia a oxidação da amônia é impedida enquanto a da hidroxilamina não o é.

Composto	Valência do nitrogênio
NO ₃ — (nitrato)	+ 5
NO ₂ — (nitrito)	+ 3
(HNO) (nitroxilo)	+ 1
(HNO) ₂ (hiponitrito)	+ 1
N ₂ O (óxido nitroso)	+ 1
N ₂ (nitrogênio gasoso)	0
NH ₃ (amônia)	- 3

Tabela 1 — Níveis de valência do nitrogênio

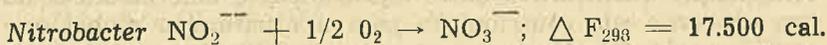
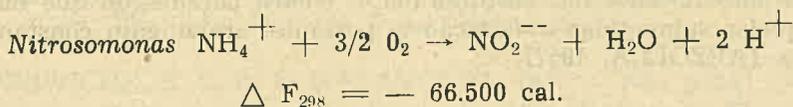
Nada se conhece sobre a oxidação a partir da hidroxilamina. O radical nitroxilo sugerido pela sequência de KLUYVER & DONKER não deve ser excluído das possibilidades; mas pelo que se sabe das suas propriedades químicas, pode-se concluir que a sua existência é improvável. Se presente em quantidade suficiente é razoável admitir que produza hiponitrito por dimerização o qual se decompõe dando N₂O. Como nunca foi relatada a produção desse gás na reação de nitrificação, sua formação em proporções significativas é difícil de conceber. O outro composto com esse nível de oxidação, a nitramida, necessitaria também de dimerização. Em concentrações hidrogeniônicas fisiológicas a nitramida livre é ainda mais instável que o hiponitrito e também se decompõe para formar N₂O. Por essa razão acredita-se que um complexo enzima-substrato ao nível de oxidação do nitroxilo esteja aqui envolvido mas não há nenhuma prova experimental que forneça indicação sobre sua natureza (DELWICHE, 1956).



IMCHENETSKI et al. (1955) relataram a oxidação da amônia a nitrito por extratos isentos de células de *Nitrosomonas* nada esclarecendo, porém, a respeito dos intermediários; o fato de que as preparações não perdem a atividade quando submetidas a curta ebulição (!) levou IMCHENETSKI et al. (1956) a sugerir que os sistemas oxidantes de *Nitrosomonas* é semelhante às peroxidases.

A reação de oxidação de nitrito a nitrato, é inibida pelo íon clorato e, ao que parece, o fenômeno envolve um complexo nitrito-enzima ou outro derivado de nitrito. A prova disso é que as células incubadas com nitrito e clorato e lavadas a seguir permanecem inibidas; já a incubação só com clorato seguida pela lavagem não acarreta nenhuma diminuição na capacidade de oxidar nitrito (LEES & QUASTEL, 1945).

Energia. Tanto no caso de *Nitrosomonas* como no de *Nitrobacter* o crescimento e a formação de novo material celular são à custa do CO₂ e a energia necessária para a redução deste é obtida na oxidação da amônia ou do nitrito. As duas oxidações produzem energia nas seguintes quantidades (BAAS-BECKING & PARKS, 1927):



No caso de *Nitrosomonas* uma molécula de CO₂ é reduzida para 35 de nitrogênio oxidadas, enquanto para *Nitrobacter* a relação é perto de 1/100. Admitindo-se que todo o CO₂ seja reduzido a glicose (energia livre de formação = 118.000 cal./mol de CO₂ reduzido) pode-se calcular a eficiência das duas

reações como fornecedoras de energia para a redução do CO₂. Acha-se que para *Nitrosomonas*, 5,9% da energia libertada é usada na redução do CO₂ enquanto para *Nitrobacter* o valor é 7,9%. O resto da energia presumivelmente se perde como calor. E' evidente em qualquer caso que a oxidação produz energia suficiente para dar conta das reações de sínteses que devem ocorrer. Nada se sabe, porém, do mecanismo de transferência da energia oxidativa e nem do caminho da redução do CO₂.

NITRIFICAÇÃO HETEROTRÓFICA

Há numerosos exemplos de formação de nitrito e nitrato por organismos heterotróficos (LEWIS, 1951). Algumas dessas reações parecem ser diferentes daquelas implicadas em *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*. Entre as reações heterotróficas conhecidas a formação de nitrito a partir de amônia é de ocorrência muito mais geral que a oxidação do último a nitrato. CUTLER & CRUMP (1933) relataram que mais de cem espécies são capazes de executar a primeira reação. Entretanto, pelo menos alguns heterotróficos são capazes de executar a reação completa de amônio a nitrato (MALAVOLTA et al., 1955). Assim, a conversão oxidativa do NH₄⁺ a NO₃⁻ por *Aspergillus wentii* isolado do solo pode ser seguida tanto química como manométricamente (BACILA & MALAVOLTA, 1956); com extratos cetônicos obtidos do mesmo fungo já se conseguiu provas de nitrificação (5-15 por cento do nitrogênio adicionado) embora os resultados sejam difíceis de reproduzir (DEWICHE & MALAVOLTA, 1957). Curioso é que a intensidade de oxidação do nitrogênio orgânico da peptona é sensivelmente mais intensa nas culturas de *A. wentii* paradas do que naquelas submetidas a agitação e, portanto, arejamento constante (ARZOLLA, 1957).

E' impossível, à luz dos conhecimentos atuais, fazer uma comparação quantitativa entre autotróficos e heterotróficos no que concerne sua contribuição para a nitrificação global que se dá no solo. Os primeiros parecem ser 2-10 vêzes mais ativos quando examinados em condições de laboratório; entretanto, devido ao seu grande número, os heterotróficos capazes de oxidar amônia podem dêsse modo, compensar a falta de eficiência individual. Devemos também admitir que a menor nitrificação pelos heterotróficos representados por *A. flavus* e *A. wentii* relativamente *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* pode indicar ape-

nas que não se descobriu um meio ótimo para a sua atividade. O problema é particularmente interessante nas nossas condições de solo onde o pH baixo dificulta a vida dos autotróficos.

Não sabemos se a oxidação heterotrófica da amônia a nitrato produz energia útil.

LITERATURA CITADA

- ARZOLLA, J. D. P., 1957 — Não publ.
- BAAS-BECKING, L. G. M. & G. S. PARKS, 1927 — *Physiol Rev.* 7: 85.
- BACILA, M. & E. MALAVOLTA, 1956 — *Comun. Reu. An. S.B.P.C., Ouro Preto*: no prelo.
- BOEMECKE, H., 1951 — *Arch. Mikrobiol.* 15: 414.
- BONNER, J., 1950 — *Em Plant Biochemistry*, Academic Press, New York.
- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY & H. P. HITCHENS, 1948 — *Em: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th Ed.
- CUTLER, D. W. & L. M. CRUMP, 1933 — *Ann. Appl. Biol.* 20: 291.
- DELWICHE, C. C., 1956 — *Em: Inorganic nitrogen metabolism*, The John Hopkins Press, Baltimore.
- DELWICHE, C. C. & E. MALAVOLTA, 1957 — Não publ.
- FRANKLAND, P. F. & G. FRANKLAND, 1890 — *Phil. Trans. Roy. Soc. B* 181: 107.
- GODLEWSKI, E., 1895 — *Bull. Intern. Acad. Sci. Cracovie*: 178.
- HOFMAN, T., 1953 — *Biochem. J.* 54: 293.
- HOFMAN, T. & H. LEES, 1952 — *Biochem. J.* 52: 19.

- IMCHENETSKI, A. A., E. L. ROUBANE & L. I. ARTEMOVA, 1956 — *Mikrobiologiya* 25: 12. (*Bull. Inst. Pasteur* 54: 3596, 1956).
- IMCHENETSKI, A. A., E. L. ROUBANE & O. D. BOUZINA, 1955 — *Mikrobiologiya* 24: 539. (*Bull. Inst. Pasteur* 54: 3595, 1956).
- KINGMA BOLTJES, T. Y., 1935 — *Arch. Mikrobiol.* 6:79.
- KLUYVER, A. J. & H. J. C. DONKER, 1926 — *Chem. Zelle* 13: 134.
- LEES, H. 1952 — *Nature* 169: 156.
- LEES, H. & J. H. QUASTEL, 1945 — *Nature* 169: 156.
- LEWIS, D., 1951 — *Biochem. J.* 49: 149.
- MALAVOLTA, E., R. CAMARGO & H. P. HAAG, 1955 — *Inst. Zimotécnico Bol.* 13.
- MEYERHOF, O., 1916 — *Pfluegers Arch. ges. Physiol.* 164: 353.
- MEYERHOF, O., 1917 — *Pfluegers Arch. ges. Physiol.* 166: 240.
- WINOGRADSKY, S., 1891 — *Ann. Inst. Pasteur* 5: 92, 577.
- WINOGRADSKY, S., 1893 — *C. R. Acad. Sci. Paris* 116: 1385.