

CONHECIMENTOS ATUAIS SÔBRE O PROBLEMA DA NITRIFICAÇÃO (*)

E. MALAVOLTA e J. D. P. ARZOLLA

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 nitrato 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; êles 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 de 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

(*) Parte de um plano de trabalhos efetuado com ajuda do Conselho Nacional de Pesquisas (Rio de Janeiro) e da Fundação Rockefeller, N. York.

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, facilmente 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.

Embora sejam algo tolerantes para a acidez do meio, o pH ótimo para *Nitrosomonas* é 8,0 e 7,7 para *Nitrobacter*; no pH 6,5 ainda se desenvolvem apreciavelmente; no pH 9,5, porém, há pouca atividade.

As bactérias nitrificadoras, autotróficas como são, crescem em meio exclusivamente mineral. As necessidades de macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio e enxofre) são estabelecidas; não, porém, as exigências para micronutrientes. O ferro é usado nos meios de cultura de *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*; ALEEM & ALEXANDER (1960) mostraram que quando a concentração de Fe subia de 0,0 a 0,07 p.p.m. a oxidação de nitrito ia de 1.050 a 3.050 p.p.m. ZAUARZIN (1958), por sua vez, verificou um efeito benéfico do molibdênio na mesma bactéria, postulando daí a participação de uma molibdoflavoproteína na reação produtora de energia.

Embora *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* não necessitem de fornecimento de formas de carbono já reduzido para viver, não há dúvida que alguns compostos, pelo menos, podem suplementar a economia bioquímica desses organismos, do que

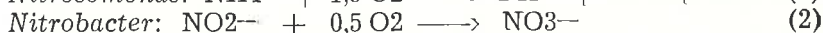
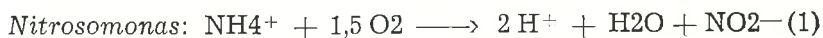
resulta estímulo no crescimento (LEES, 1955, pág. 53). A crença de que "os compostos orgânicos são veneno para os nitrificadores", fundada em velhos experimentos de WINOGRADSKY & OMELIANSKY (1899) não tem razão de ser: KINGMA BOLJES (1935) mostrou que *Nitrosomonas* cresce em meio mineral contendo 4 por cento de glicose. Aliás, MEYERHOF (1916, 1917), usando técnicas manométricas já mostrara que, além da glicose, glicerol, manitol, acetato, butirato e valerato não tinham nenhum efeito tanto em *Nitrosomonas* como em *Nitrobacter*. Peptona, dependendo dos aminoácidos nela encontrados, inibe o desenvolvimento dos organismos em meio de cultura; manose é surpreendentemente tóxica para *Nitrosomonas* (inibição completa na concentração M/80). Esses efeitos inibitórios devem ser encarados como produto de interferência no metabolismo global da célula e não na reação primordial de oxidação.

HOFFMAN (1953) analisou hidrolisados de células de *Nitrosomonas* no que se refere a aminoácidos e carboidratos. O espectro dos primeiros mostrou-se normal, não tendo sido detectados aminoácidos não usais. Foram identificados galactose, ribose, ramnose e xilose; entretanto, glicose não foi encontrada. Uma análise semelhante para *Nitrobacter* ainda não foi feita

Embora hoje já se tenha uma soma de provas experimentais mostrando que os nitrificadores possuem aspectos metabólicos semelhantes aos de microrganismos — e até mesmo ao das plantas superiores — o panorama geral permanece ainda largamente desconhecido. As dificuldades para cultivá-los, as baixas colheitas obtidas normalmente tornam o problema mais difícil. Não foi possível, por exemplo, demonstrar ainda consumo de oxigênio por células intactas usando-se intermediários do ciclo dos ácidos di ou tricarbóxicos como substrato; das substâncias ensaiadas manométricamente por SILVER (1960) — nitrito, nitrato, formato, acetato, lactato, glicose e citrato — apenas NO_2^- e formato estimularam o consumo de oxigênio; esses dois compostos também provocaram redução dos citocromos celulares (590, 551 e 513m μ). A ausência de oxidação notada para alguns dos ácidos mencionados é, provavelmente, devida a questões de permeabilidade: extratos de *Nitrobacter* mostraram-se capazes de oxidar acetato, piruvato e alfa ceto glutarato (MALAVOLTA & DELWICHE, 1960, não publ.).

Bioquímica. Os estudos iniciais de GODLEWSKI (1895)

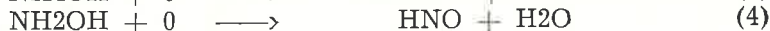
e de MEYERHOF (1917) levou-os a formular a oxidação da amônia por *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* da maneira seguinte:



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

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

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



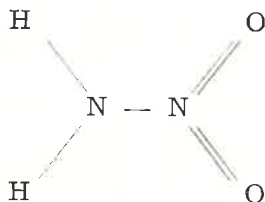
Só recentemente, porém, é que se ganhou provas experimentais dando indicações sobre possíveis intermediários. LEES (1952) obteve evidência da oxidação da hidroxilamina em baixas concentrações. Ainda mais: na presença de hidrazina como inibidor a hidroxilamina se acumula no meio da cultura; na presença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

Nada se conhece sobre a oxidação a partir da hidroxilamina. O radical nitroxilo sugerido pela sequência de KLUYVER & DONKER (1926) 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

Composto	Valência do nitrogênio
NO_3^- (nitrato)	+ 5
NO_2^- (nitrito)	+ 3
(HnO) (nitroxilo)	+ 1
(HNO) ₂ (hiponitrito)	+ 1
N_2O (óxido nitroso)	+ 1
N_2 (nitrogênio gasoso)	0
NH_3 (amônia)	- 3

Tabela I — Níveis de valência do nitrogênio

hiponitrito por dimerização o qual se decompõe dando N_2O . 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 N_2O . 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).



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).

Os trabalhos mais recentes com extratos livres de células não trouxeram esclarecimento algum a respeito dos compostos nitrogenados intermediários na oxidação de amônia a nitrato; algo se aprendeu, porém, dos cofatores para a reação.

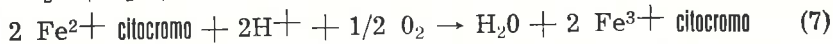
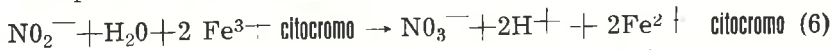
IMCHENETSKI et al. (1955) relataram a oxidação da amônia a nitrito por extratos isentos de células de *Nitrosomonas* nada esclarecendo, porém, a respeito dos intermediários; o fato de que as preparações não perdem a atividade quando submetidas a curta ebulição (!) levou IMCHENETSKI et al. (1956) a sugerir que os sistemas oxidantes de *Nitrosomonas* é semelhante às peroxidases. Com extratos de *Nitrosomonas* obtidos por tratamento das células com ultrassons, ENGEL & ALEXANDER (1959) demonstraram uma lenta oxidação de NH_4^+ e uma vigorosa oxidação de NH_2OH (tabela II); a enzima (ou enzimas), que não sedimenta a $144.000 \times G$, é inibida por cianeto e por fervura; vários corantes — o azul de metileno entre eles — são reduzidos pela preparação em presença de hidroxilamina; o que não ocorre, porém, com nucleóti-

dos de piridina. O sistema para oxidação de nitrito a nitrato extraído de *Nitrobacter*, ao contrário daquele de *Nitrosomonas*, aparece em partículas sedimentadas por alta centrifuga-

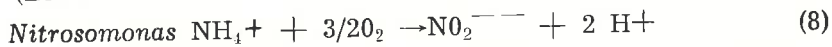
Reagentes	μ NO ₂ -N / ml		
	0 hr	12 hr	72 hr
Enzima + NH ₄	0,1	0,3	1,1
Fervida + NH ₄	0,1	0,1	0,1
Enzima + NH ₂ OH	0,1	0,1	2,2
Fervida + NH ₂ OH	0,1	0,2	0,7

Tabela II — Oxidação de amônia e hidroxilamina por extratos de *Nitrosomonas europaea*

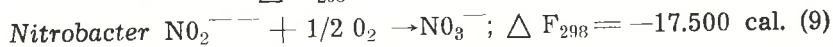
ção (ALEEM & ALEXANDER, 1958). De acordo com ALEEM & NASON (1960), a adição de NO₂⁻ às partículas resulta no aparecimento de máximos de absorção em 550 e 520 m μ o que corresponde aos picos alfa e beta do citocromo c (ou semelhante), bem como em 585-590 e 438 m μ , representando um citocromo do tipo a. O ferro, mas não nucleótidos de piridina ou de flavina, parece estar implicado no transporte eletrônico. As reações (6) e (7) mostram como se pode dar o transporte eletrônico.



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):



$$\Delta F_{298} = -66.500 \text{ cal.}$$



Parte, pelo menos, da energia que se torna disponível nessas reações de oxidação é armazenada como ligação fosfatada do trifosfato de adenosina; com extratos de *Nitrosomonas*, BURGE e MALAVOLTA (1960, não publ.) verificaram uma relação P/O igual a 0,25. Por sua vez no caso de *Nitrobacter*, MALAVOLTA et al. (1960) e ALEEM & NASON (1960) no-

taram relações P/O iguais a 0,5 e 0,2, respectivamente, quando nitrito era o substrato para a oxidação fosforilativa; a tabela III é típica dos resultados obtidos pelos primeiros.

Fixação do carbono. 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. É evidente em qualquer caso que a oxidação produz energia suficiente para dar conta das reações de síntese que devem ocorrer.

Tratamento	Micromoles de NO ₂ oxidado	Micromoles de PO ₄ esterificado
Completo	4,75	2,37
Fervido	0,12	0,00
Menos PO ₄ ³⁻	3,21	0,05
Menos NO ₂ ⁻	0,10	0,00
Menos ADP	4,56	0,56
Menos Mg ⁺ +	4,80	0,15
Menos F ⁻	4,77	0,00
Menos citocromo C	2,88	0,23
Mais DNP	4,50	0,10

Tabela III — Fosforilação por extratos de *Nitrobacter*

Completo: 2,5ml extrato (= 0,8mg N/ml); 1ml KH₂PO₄ 0,005 M; 1ml KNO₂ 0,005 M; 0,1ml de ADP (difosfato de adenosina) 0,05 M; 0,2ml de M Cl₂ 0,05M; 0,2ml de KF 0,075 M e 0,1ml de citocromo c a 0,5 por cento; volume final: 10ml; DNP (2,4-dinitrofenol) = 1ml de uma solução 0,001 M.

O caminho seguido na redução do CO₂ por *Nitrobacter* com a energia obtida na oxidação de nitrito foi elucidado recentemente por MALAVOLTA & al. (1960); as células foram incubadas com nitrito e carbonato marcado com C¹⁴; os produtos da incorporação da C¹⁴O₂ foram extraídos e separados por radiocromatografia e, em seguida, identificados; verificou-se que durante o período de incubação 100 micromoles de NO₂⁻ foram oxidados havendo a fixação de 1 micromole de CO₂; 75 por cento do radiocarbono fixado se achava no

extrato alcoólico do material; os seguintes compostos radioativos puderam ser identificados: hexose di e monofosfatos, fosfopiruvato, triose fosfato e fosfoglicerato: este último produto apresentava 60 por cento da atividade aplicada originalmente no papel de filtro — é lícito, pois, admitir que o ácido fosfoglicérico seja o primeiro produto da fixação do CO_2 por *Nitrobacter*; a natureza dos outros compostos identificados sugere, por outro lado, que a marcha do carbono seja idêntica à conhecida para a fotossíntese pelas plantas superiores. Com extratos livres de células foi depois possível demonstrar fixação do CO_2 não só via carboxidismutase — a enzima crucial para a marcha do carbono na fotossíntese como também por caminhos heterotróficos (MALAVOLTA et al., 1969 não publ.).

FUNGOS NITRIFICADORES

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, só há dois fungos conhecidos, *Aspergillus flavus* e *A. wentii*, capazes de realizar a série completa de reações que vai de amônia a nitrato (MALAVOLTA et al., 1955). Assim, a conversão oxidativa do NH_4^+ a NO_3^- 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 (DELWICHE & MALAVOLTA, 1957).

Algumas das condições que afetam o crescimento e a produção de nitrato pelos fungos nitrificadores foram estudadas por ARZOLLA (1959) e SCHMIDT (1960) podendo ser assim resumidas:

a) surpreendentemente, as culturas não agitadas mostram uma intensidade de oxidação de amônia a nitrito e nitrato muito mais alta do que a daquelas submetidas a aeração constante: 245 μ g de N-NO_3^- por ml de meio contra apenas 25;

b) o pH, que afeta tão acentuadamente as bactérias nitrificadoras, não o faz de modo muito marcado nos fungos; na

faixa de pH 5-8 a produção de nitrato não variou mais do que 10 por cento tendo sido máxima no lado alcalino; o crescimento do fungo não foi influenciado pelo pH;

c) a temperatura ótima para a nitrificação revelou-se 30°C, não havendo desenvolvimento apreciável em 40 ou 50°C; abaixo de 20°C, a produção de nitrato foi difícil de ser detectada;

d) comparando-se a nitrificação em presença de sulfato de amônio ou de peptona (como fontes de N), verificou-se ser ela no último caso 10 vezes mais acentuada; o sulfato de amônio, entretanto, não teve um efeito tão acentuado no crescimento (medido como peso do micélio seco), que foi reduzido à metade; a curva de produção de nitrato em meio contendo só peptona ou peptona + sulfato de amônio (cada um desses compostos contribuindo com metade da dose de nitrogênio) mostrou aspecto tipicamente adaptativo; o que não aconteceu com as curvas representando crescimento;

e) o consumo de glicose do meio foi mais acentuado em presença de sulfato de amônio do que com peptona — o que não se traduziu, contudo em aumento no peso de micélio; é, possível, porém que o carboidrato tivesse sido fornecido em condições sub-ótimas, de modo que a peptona funcione como fornecedora de material energético;

f) alguns aminoácidos da peptona são consumidos pelo fungo muito mais rapidamente que outros, revelou a análise cromatográfica; como a menor eficiência do sulfato de amônio para o crescimento e a nitrificação não pode ser explicada em termos de abaixamento no pH, é possível que a superioridade da peptona reflita o fornecimento de alguns aminoácidos necessários ao crescimento e (ou) à síntese das enzimas implicadas na nitrificação.

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 vezes 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 a *Nitrosomonas* e *Nitrobacter* pode indicar apenas que não se descobriu um meio ótimo pa-

ra 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

- ALEEM, M. I. H. & M. ALEXANDER, 1958 — *J. Bacteriol.* 76: 510.
- ALEEM, M. I. H. & M. ALEXANDER, 1960 — *Appl. Microbiol.* 8: 80.
- ALEEM, M. I. H. & A. NASON, 1960 — *Fed. Proc.* 19: 34.
- ALEEM, M. I. H. & A. NASON, 1960 — *Proc. Natl. Acad. Sci.* 46: 763.
- ARZOLLA, J. D. P., 1959 — Tese (Piracicaba).
- BAAS-BECKING, L. G. M. & G. S. PARKS, 1927 — *Physiol. Rev.* 7: 85.
- BACILA, M. & E. MALAVOLTA, 1956 — *Com. Rev. An. S. B. P. C. Ouro Preto.*
- BOEMECKE, H., 1951 — *Arch. Mikrobiol.* 15: 414.
- BREED, R. S., E. G. D. MURRAY & H. P. HITCHENS, 1948 — *Em Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6 th ed.
- CUTLER, D. W. & L. M. CRUMP, 1933 — *Ann. Appl. Biol.* 20: 291.
- DELWICHE, C. C., 1956 — *Em Inorganic nitrogen metabolism*, The Johns Hopkins Press, Baltimore.
- DELWICHE, C. C. & E. MALAVOLTA, 1957 — Não publ.
- ENGEL, M. S. & M. ALEXANDER, 1959 — *J. Bacteriol.* 78: 796.
- 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 & O. D. BOUZINA,
1955 — *Mikrobiologiya* 24: 539.
- IMCHENETSKI, A. A., E. L. ROUBANE & L. I. ARTEMOVA,
1956 — *Mikrobiologiya* 25: 12.
- 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.
- LEES, H., 1955 — *Em Biochemistry of autotrophic bacteria.*
Butterworths Sci. Publ., London.
- LEWIS, D., 1951 — *Biochem. J.* 49: 19.
- MALAVOLTA, E., R. CAMARGO & H. P. HAAG, 1955 —
Inst. Zimotécnico U.S.P., Bol. 13.
- MALAVOLTA, E., C. C. DELWICHE & W. D. BURGE, 1960
— *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2: 445.
- MEYERHOF, O., 1916 — *Pfluegers Arch. ges. Physiol.* 164:
353.
- MEYERHOF, O., 1917 — *Pfluegers Arch. ges. Physiol.* 166: 240.
- SCHMIDT, E. L., 1960 — *J. Bacteriol.* 79: 553.
- SILVER, W. S., 1960 — *Nature* 185: 555.
- WINOGRADSKY, S., 1891 — *Ann. Inst. Pasteur* 5: 92, 577.
- WINOGRADSKY, S., 1893 — *C. R. Acad. Sci. Paris* 116: 1385.
- WINOGRADSKY, S. & V. O. OMELIANSKY, 1899 — *Zbl.*
Bakt. (2 Abt.) 5: 329, 377, 429.
- ZAVARZIN, G. A., 1958 — *Mikrobiologiya* 27: 542.