UNIDADE IV – NUTRIÇÃO MINERAL DE PLANTAS - AS PLANTAS E O NITROGÊNIO

5. AS PLANTAS E O NITROGÊNIO

5.1. O CICLO DO NITROGÊNIO

5.2. ASSIMILAÇÃO DO NITROGÊNIO

5.3. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

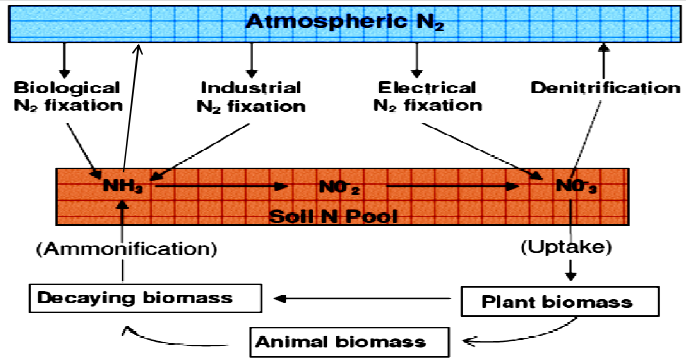


Figura 13 – O ciclo do nitrogênio, ilustrando o relacionamento entre o pool de nitrogênio: atmosfera, solo e biomassa (Hopkins, 2000).

- **Fixação biológica: 170 milhões de ton/ano;**
- **Fixação elétrica: 20 milhões de ton/ano;**
- **Fixação industrial: 80 milhões de ton/ano;**
- **Volatilização da NH_3: 100 milhões de ton/ano;**
- **Desnitrificação: 170 milhões de ton/ano.**

Transformação do nitrogênio no solo

Amonificação

- O nitrogênio orgânico é convertido para amônia (NH_3) por uma variedade de microorganismos;

- Parte da amônia retorna para a atmosfera (100 milhões de toneladas por ano) por volatilização, porém a maioria é convertida em nitrato pelas bactérias presentes no solo.

Nitrificação

- A 1ª etapa na formação de nitrato é a oxidação de NH_3 para NO_2^- (nitrito) pelas bactérias do gênero *Nitrossomonas* e *Nitrococus*.

- Em seguida, NO_2^- é oxidado para NO_3^- (nitrato) pelas bactérias do gênero *Nitrobacter*.

Desnitrificação

- Algumas bactérias anaeróbicas reduzem o NO_3^- para nitrogênio gasoso (N_2, NO e N_2O), o qual é perdido para a atmosfera (170 milhões de toneladas por ano).

- Estas bactérias utilizam o NO_3^-, no lugar do O_2, como receptor final de elétrons para a respiração.

- Este processo é comum em ambientes pobres em oxigênio (como em solos inundados ou compactados).

Fixação não biológica do nitrogênio
(80 milhões de ton/ano)

Fixação industrial (artificial)

• **O processo de Haber-Bosch, desenvolvido na Alemanha (durante a 1ª guerra mundial) e até hoje usado pelas industrias de fertilizantes, é o ponto inicial para a fabricação de produtos nitrogenados industriais e agrícolas.**

$$N_2 + 3\,H_2 \xrightarrow[200\ atm]{200^oC} 2\,NH_3$$

Fixação elétrica (20 milhões de ton/ano)(natural)

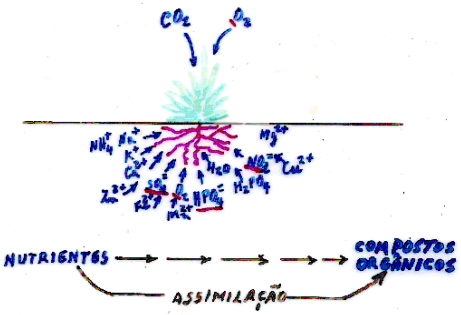
• **As descargas elétricas, que ocorrem durante as tempestades, produzem radicais OH^-, H^+ e O que são bastante reativos.**

$$N_2 + 2\,O \rightarrow 2\,NO + 2\,O \rightarrow 2\,NO_2^- + 2\,O \rightarrow 2\,NO_3^-$$

$2\,OH^-$ e $2\,H^+$ → $2\,HNO_3$

Com as precipitações pluviométricas: NO_2^-, NO_3^- e HNO_3 são levados para o solo.

Assimilação de nutrientes inorgânicos



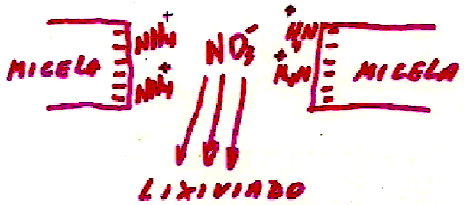
A assimilação de alguns nutrientes, particularmente, nitrogênio e enxofre, requer uma série complexa de reações bioquímicas, que estão entre as reações de maior demanda energética dos organismos vivos:

- **$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+ \rightarrow$ glutamina (12 ATP/N);**
- **$N_2 \rightarrow 2\ NH_4^+ \rightarrow$ 2 glutamina (24 ATP/2 N);**
- **SO_4^{-2} (+6) $\rightarrow$ S^{-2} (-2) $\rightarrow$ CISTEÍNA (14 ATP/S).**

Assimilação de nutrientes inorgânicos

CARBONO (C):	**PROCESSO FOTOSSINTÉTICO**
OXIGÊNIO (O):	**OXIGENAÇÃO (FOTORRESPIRAÇÃO)**
HIDROGÊNIO (H):	**HIDROGENAÇÃO ($NAD^+ + 2\ e^- + H^+ \rightarrow$ NADH)**
FÓSFORO (P):	**FOSFORILAÇÃO ($ADP + Pi \rightarrow ATP + H_2O$)**
ENXOFRE (S):	**SO_4^{-2} (+6) $\rightarrow$ S^{-2} (-2) $\rightarrow$ CISTEÍNA**
SILÍCIO (Si):	**SÍLICA AMORFA (SiO_2nH_2O)**
CÁTIONS:	**LIGAÇÕES ELETROSTÁTICAS E COORDENADAS**

A planta absorve do solo o nitrogênio nas formas de NO_3^- e NH_4^+. O nitrogênio sob a forma de NO_3^- é facilmente lixiviado, enquanto que na forma NH_4^+ não é lixiviado. Por que?



Em algumas situações:

NH_4^+ —(nitrificação / bactérias)→ $HNO_3 \rightarrow H^+ + NO_3^-$

$H^+ \rightarrow$ acidifica o solo

Lixiviado

(não disponível para a planta)

- **O NO_3^- não é tóxico para as plantas;**

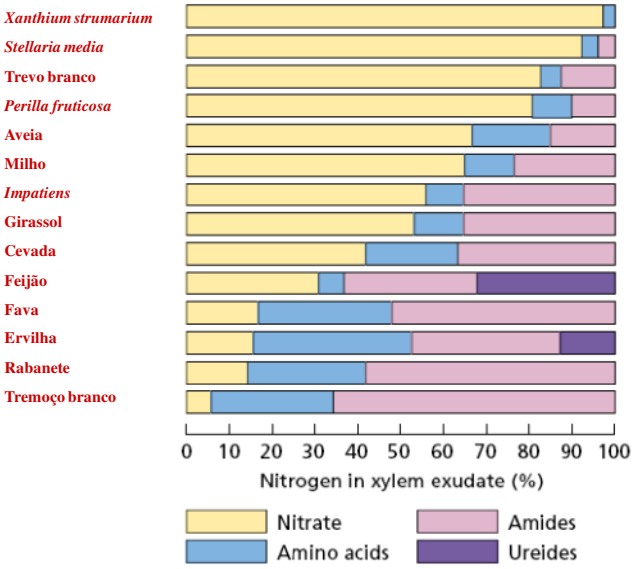
- **Porém, o NO_3^- em excesso, em animais e no homem, provoca uma doença chamada metemoglobinemia (transformação do NO_3^- em NO_2^- no fígado, formando um complexo com a hemoglobina que impede a ligação do O_2);**

- **Homem e animais também convertem o NO_3^- em nitrosaminas, que são carcinogênicas;**

- **Como o NO_2^- é altamente reativo e potencialmente tóxico para as células ele é rapidamente transportado para os plastídios, onde é reduzido à amônia;**

- **A amônia é tóxica para plantas e animais, portanto, sofre rápida incorporação em compostos orgânicos.**

Quantidades relativas de nitrato e outros compostos nitrogenados em exsudados do xilema de várias espécies vegetais.



Redução metabólica do nitrato

redutase

$NO_3^- + NAD(P)H \rightarrow NO_2^- + H_2O$

do nitrato

CITOSOL

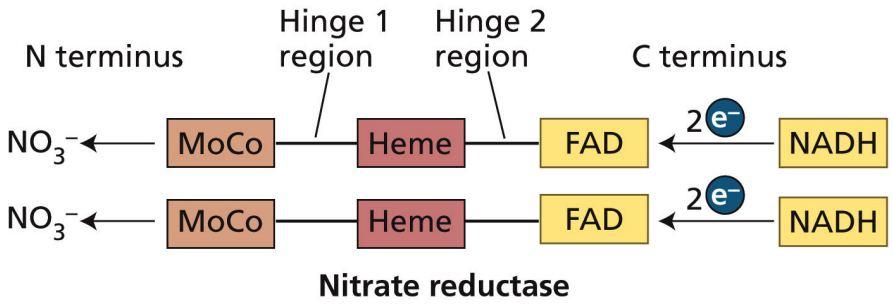
redutase

$NO_2^- + 8\ H^+ \rightarrow NH_4^+ + 2\ H_2O$

$6\ Fd_{red}$ do nitrito $6\ Fd_{oxi}$

CLOROPLASTO (FOLHA)
OU
PROPLASTÍDEO (RAIZ)

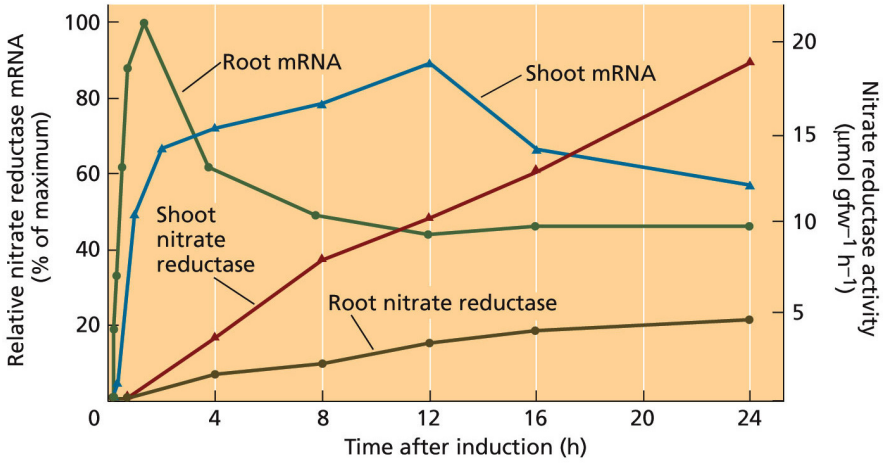
$(+5)\ NO_3^- \rightarrow (+3)\ NO_2^- \rightarrow (-3)\ NH_4^+$



Nitrate reductase

Modelo do dímero da redutase do nitrato (200 kDa), indicando os três domínios de ligação, cujas sequências de polipeptídios são similares nos eucariotos: FAD, grupo heme e o complexo molibdênio. O NADH liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade e inicia a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), através de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O nitrato é reduzido no complexo do molibdênio próximo à região amino terminal. As sequências dos polipeptídios das regiões *hinge (dobrada)* são altamente variáveis entre as espécies.

Aumento da atividade da redutase do nitrato resultante da transcrição do mRNA (induzida por NO_3^-) em partes aéreas e raízes (cevada).



Modulação pós-traducional da redutase do nitrato

ATIVAÇÃO:

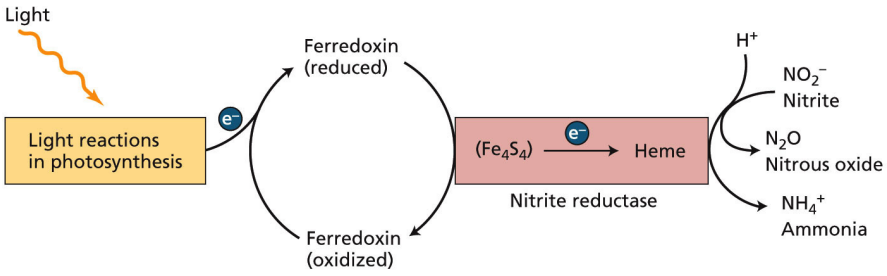
- **Luz e alto teor de carboidrato estimulam uma fosfatase que desfosforila vários resíduos de serina na redutase do nitrato, promovendo sua ativação.**

INATIVAÇÃO:

- **Agindo na direção inversa, escuro e alto teor de Mg^{2+} estimulam uma proteína quinase, a qual fosforila os mesmos resíduos de serina, inativando a redutase do nitrato.**

Esta regulação, através da desfosforilação/fosforilação, possibilita um controle mais rápido do que o obtido através da síntese/degradação da enzima.

Redutase do nitrito



Modelo do acoplamento do fluxo de elétrons da fotossíntese, via ferredoxina, com a redução do nitrito pela redutase do nitrito. Esta enzima possui dois grupos prostéticos, Fe_4S_4 e heme, que participam na redução do nitrito à amônio.

❖**Massa molecular de 63.000 daltons (monômero);**

❖ **Grupos prostéticos (2):**

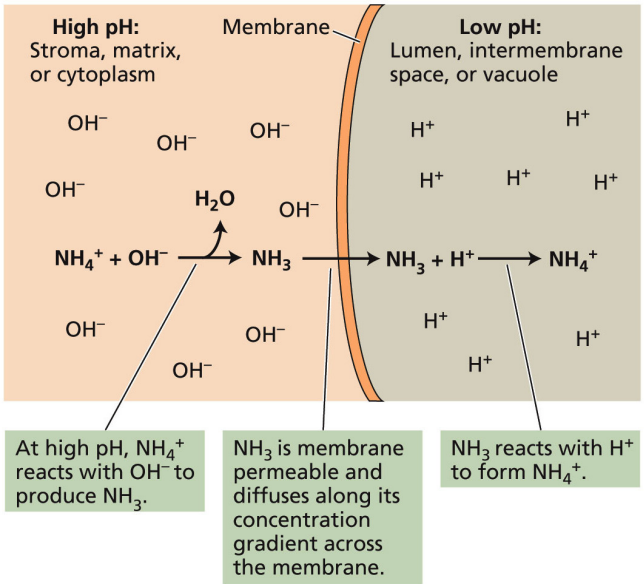
Grupo heme e o complexo protéico ($Fe_4 S_4$).

REAÇÃO GERAL:

$$NO_2^- + 6\ Fd_{red} + 8\ H^+ \rightarrow NH_4^+ + 6\ Fd_{oxi} + 2\ H_2O$$

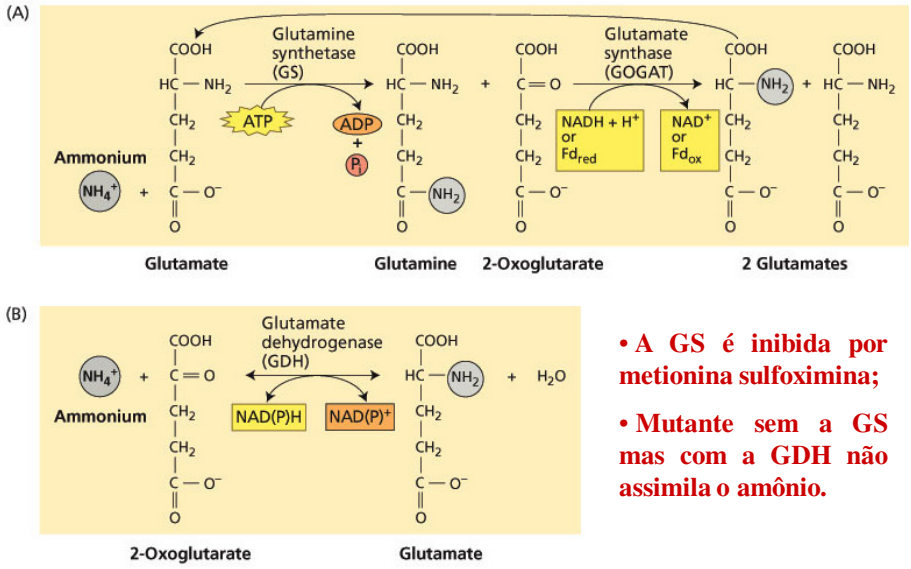
• **A sua síntese é induzida pela luz e NO_3^-, sendo a asparagina e a glutamina repressores da transcrição.**

O EFEITO TÓXICO DA AMÔNIA ***(Dissipa o gradiente de pH)***



N-AMONIACAL: $NH_4^+ + OH^- \leftrightarrow NH_3 + H_2O$

Estrutura e rotas de síntese de compostos envolvidos no metabolismo do amônio



- **A GS é inibida por metionina sulfoximina;**
- **Mutante sem a GS mas com a GDH não assimila o amônio.**

SINTETASE DA GLUTAMINA (GS)

Duas formas: (Massa molecular: 350 kDa)

CITOSÓLICA: Presente em sementes germinantes e feixes vasculares de raízes e de caules (função: transporte intracelular de N)

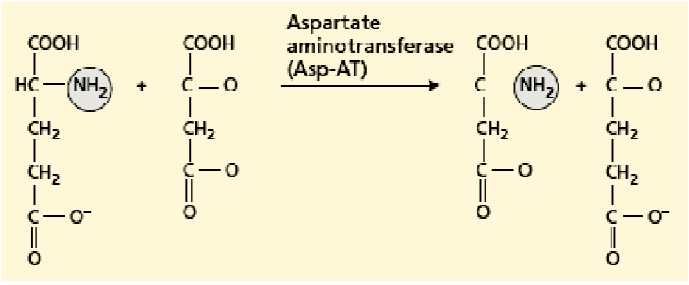
PLASTIDIAL: Presente em cloroplastos de folhas e proplastídeos de raízes (função: gerar N-amídico para consumo local). Luz e teor de carboidratos alteram a expressão gênica desta forma da enzima.

SINTASE DO GLUTAMATO (GOGAT)

Duas formas:

FERREDOXINA-GOGAT: Presente em cloroplastos com massa molecular de 165 kDa (função: metabolismo do N na fotorrespiração). A quantidade e a atividade desta forma aumentam com o nível de luz.

NADH-GOGAT: Presente em plastídeos de tecidos não fotossintéticos (função: assimilação de NH_4^+ absorvido pelas raízes) e em feixes vasculares de folhas em desenvolvimento (função: assimilação de glutamina transportada das raízes e folhas senescentes).

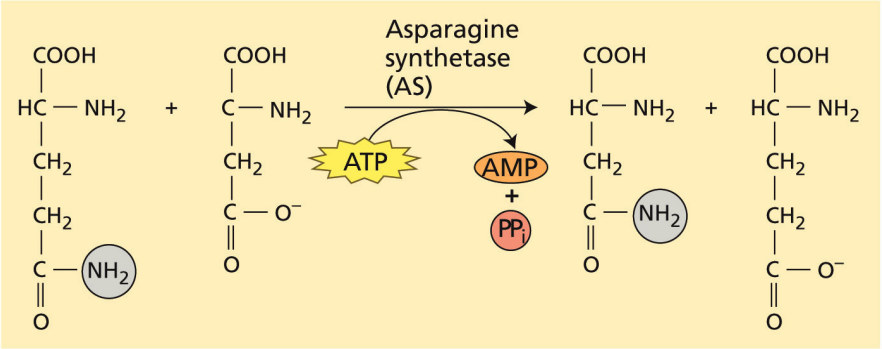


Glutamate | Oxaloacetate (Glioxilato, Piruvato, Hidroxipiruvato) | Aspartate (Glicina, Alanina, Serina) | 2-Oxoglutarate

Localização: Citosol, cloroplastos, mitocôndrias, peroxisomos e glioxissomos.

As aminotransferases de cloroplasto tem papel importante na síntese de vários aminoácidos (glutamato, aspartato, alanina, serina e glicina).

Outra importante enzima é a sintetase da asparagina (AS):



A asparagina e a glutamina unem o metabolismo do carbono e do nitrogênio

- **Altos níveis de luz e de carboidratos estimulam a GS e a Fd-GOGAT e inibem a expressão dos genes que codificam a sintetase da asparagina (AS) e a sua atividade.**

- **A regulação antagônica destas rotas competitivas auxilia no balanço do metabolismo do carbono e do nitrogênio nas plantas.**

- As condições de alta energia estimulam a via GS-GOGAT e inibem a AS, favorecendo a assimilação do nitrogênio em glutamina e em glutamato, compostos ricos em carbono;

- Por comparação, em condições limitadas de energia ocorre inibição da via GS-GOGAT e estimulação da AS, resultando na assimilação de nitrogênio na asparagina, um composto rico em nitrogênio.

Fixação biológica do nitrogênio (170 milhões de ton/ano)

Na fixação biológica de nitrogênio, o N_2 é convertido para NH_3 que pode ser incorporado em compostos orgânicos (assimilação).

A fixação biológica do N pode ser feita tanto por bactérias de vida livre (fixadores de nitrogênio de vida livre) como por bactérias que formam associações com plantas superiores (fixação simbiótica do nitrogênio).

Exemplos de organismos que podem realizar a fixação do nitrogênio

Fixação simbiótica do nitrogênio

Planta hospedeira	Simbiontes fixadores de N
Leguminosas e *Parasponia*	*Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium*
Actinorrízicas: *Alnus* (árvore), *Ceanothus* (arbusto), *Casuarina* (árvore), *Datisca* (arbusto)	*Frankia*
Gunnera	
Azolla (pteridófita aquática)	*Nostoc*
Cana-de-açúcar	*Anabaena*
	Acetobacter

Fixadores de nitrogênio de vida livre

Tipo	Gêneros fixadores de N
Cianobactérias (algas azuis-esverdeadas)	*Anabaena, Calothrix, Nostoc*
Outras bactérias	
Aeróbias	*Azospirillum, Azotobacter, Beijerinckia, Derxia*
	Bacillus, Klebsiella
Facultativas	
Anaeróbias	*Clostridium,Methanococcus (Arqueobactéria)*
Não-fotossintetizantes	*Chromatium, Rhodospiriilum*
Fotossintetizantes	

Equação geral da fixação do N (Nitrogenase é inativada por O_2)

$$N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- \longrightarrow 2\ NH_3 + H_2$$

Fixação de nitrogênio de vida livre (N_2)

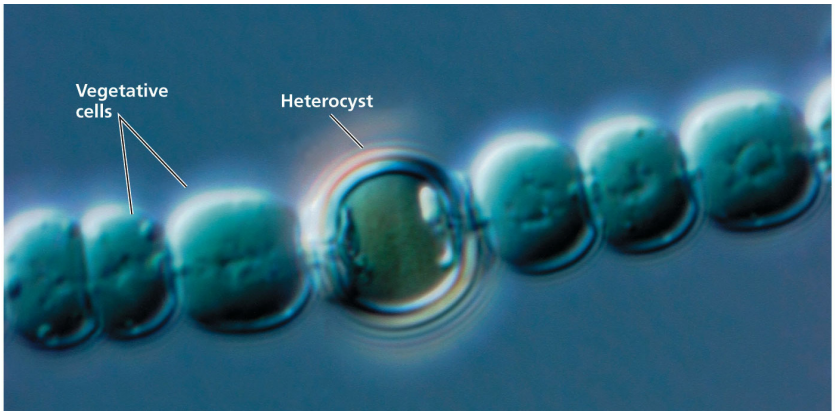


FIGURE 12.9 A heterocyst in a filament of the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena*. The thick-walled heterocysts, interspaced among vegetative cells, have an anaerobic inner environment that allows cyanobacteria to fix nitrogen in aerobic conditions. (© Paul W. Johnson/ Biological Photo Service.)

Fixação simbiótica do nitrogênio

Do ponto de vista agrícola, o sistema mais importante é o da associação *Rhizobium* – raiz de leguminosa (formação de nódulos).

Neste tipo de associação, a leguminosa fornece carboidratos para a bactéria, que quando oxidados produzem os elétrons necessários para a redução do N_2, em troca a bactéria fornece à leguminosa o nitrogênio já fixado (NH_3).

A simbiose entre uma leguminosa e a bactéria não é obrigatória. Porém, sob condições de limitação de N, os simbiontes se atraem mutuamente, através de um elaborado sistema de sinais:

Associações entre plantas hospedeiras e rizóbios

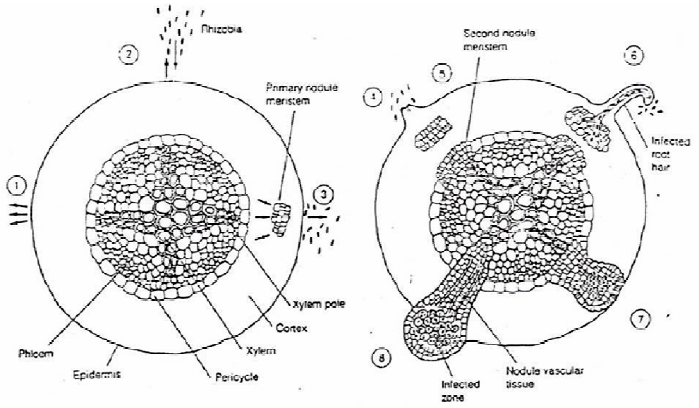
Planta hospedeira	Rizóbios simbiontes
Parasponia (não-leguminosa, antigamente chamada de Trema)	*Bradyrhizobium* spp.
Soja (*Glycine max*)	*Bradyrhizobium japonicum* (tipo com crescimento lento); *Sinorhizobium fredii* (tipo com crescimento rápido)
Alfafa (*Medicago sativa*)	*Sinorhizobium meliloti*
Sesbania (leguminosa)	*Azorhizobium* (forma nódulos nas raízes e no caule; no caule se desenvolvem raízes adventícias)
Feijão (*Phaseolus*)	*Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli; Rhizobium tropicii; Rhizobium etli*
Trevo (*Trifolium*)	*Rhizobium leguminosarum bv. trifolii*
Ervilha (*Pisum sativum*)	*Rhizobium leguminosarum bv. Viciae*
Aeschenomene (leguminosa)	*Photorhizobium* (rizóbios fotossinteticamente ativos, que formam nódulos no caule, provavelmente associados a raízes adventícias)

Equação geral da Nitrogenase (inativada por O_2)

$$N_2 + 8\ H^+ + 8\ e^- \rightarrow 2\ NH_3 + H_2$$

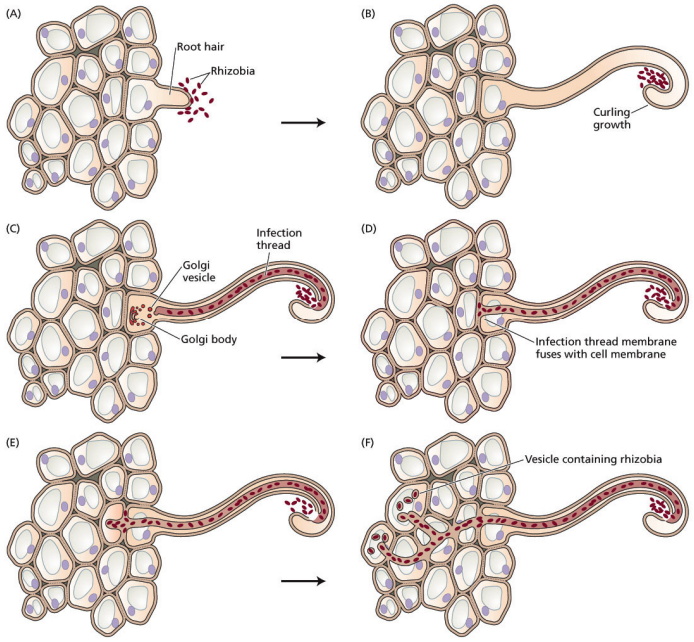
O estágio inicial na formação da simbiose é a migração da bactéria em direção à planta hospedeira. Esta migração é uma resposta quimiostática mediada por atraentes químicos (Isoflavonóides, homosserina e betaínas que são aleloquímicos) secretados pelas raízes da planta.

A sinalização, o processo de infecção e o desenvolvimento dos nódulos (organogênese) envolvem genes específicos tanto da planta hospedeira quanto da bactéria infectante.



1. **As plantas secretam atraentes químicos: Isoflavonóides, homosserina e betainas (aleloquímicos);**
2. **As bactérias produzem fatores de nodulação (lipoquitinas) e liberam sinais mitogênicos que induzem a divisão celular nas plantas (formação do primórdio nodular);**
3. **Os receptores das leguminosas para os fatores de nodulação parecem ser lectinas específicas.**

Processo de infecção durante a organogênese do nódulo



Nódulos de infecção em raízes de soja

FIGURE 12.8 Root nodules on soybean. The nodules are a result of infection by *Rhizobium japonicum*. (© Wally Eberhart/Visuals Unlimited.)

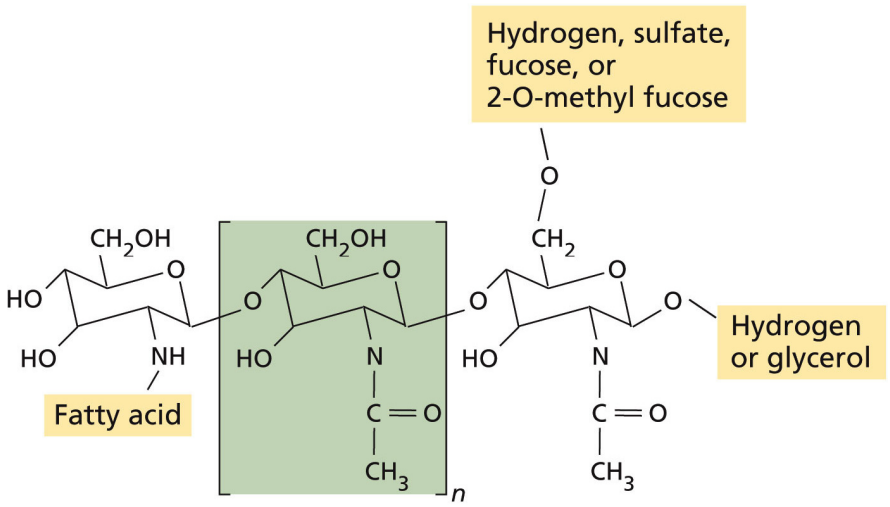


FIGURE 12.10 Nod factors are lipochitin oligosaccharides. The fatty acid chain typically has 16 to 18 carbons. The number of repeated middle sections (*n*) is usually 2 to 3. (After Stokkermans et al. 1995.)

CARACTERÍSTICAS DA NITROGENASE

Constituída por duas proteínas:

1. **Denominada de molibdênio–ferro proteína (Mo-Fe-proteína):**

- **Massa molecular: 180 – 235 kDa;**
- **4 sub-unidades protéicas;**
- **28 átomos de Fe-S e 2 átomos de Mo.**

2. **Denominada de ferro proteína**

- **Massa molecular: 30 – 72 kDa;**
- **2 sub-unidades protéicas;**
- **4 átomos de Fe-S (Fe_4-S_4);**
- **Bastante sensível ao O_2 (sofre inativação).**

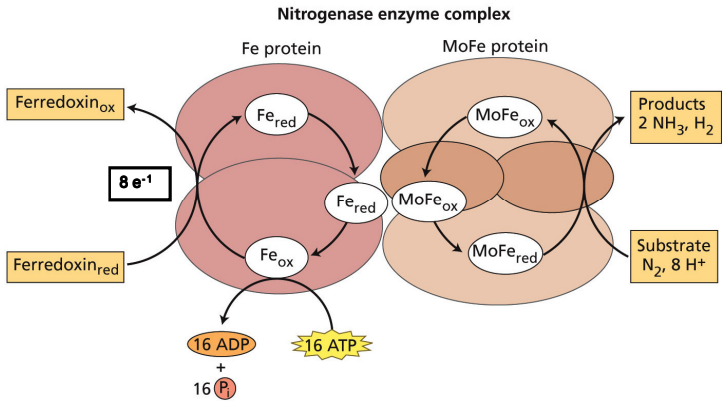


FIGURE 12.12 The reaction catalyzed by nitrogenase. Ferredoxin reduces the Fe protein. Binding and hydrolysis of ATP to the Fe protein is thought to cause a conformational change of the Fe protein that facilitates the redox reactions. The Fe protein reduces the MoFe protein, and the MoFe protein reduces the N_2. (After Dixon and Wheeler 1986, and Buchanan et al. 2000.)

ΔG' = - 200 kj/mol

TABLE 12.4
Reactions catalyzed by nitrogenase

$N_2 \rightarrow NH_3$	Molecular nitrogen fixation
$N_2O \rightarrow N_2 + H_2O$	Nitrous oxide reduction
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Azide reduction
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Acetylene reduction
$2\ H^+ \rightarrow H_2$	H_2 production
$ATP \rightarrow ADP + P_i$	ATP hydrolytic activity

Source: After Burris 1976.

Obs: Uma proteína presente nos nódulos, a leghemoglobina (K_m de 0,01 µM de O_2, funciona como transportadora de O_2 necessário à respiração, sem afetar a atividade da nitrogenase.

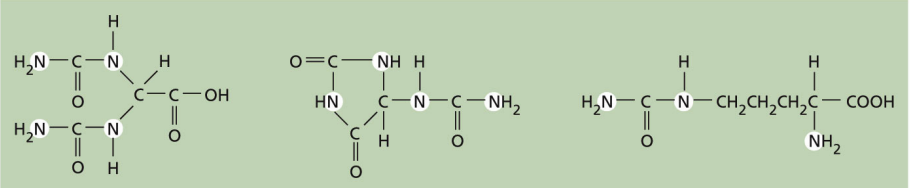
Relação C:N nos principais compostos nitrogenados transportados pelo xilema

Leguminosas de clima temperado (tais como fava, ervilha, lentilha e trevo) transportam amidas:

- **Glutamina: 5C:2N;**
- **Glutamato: 5C:1N;**
- **Asparagina: 4C:2N;**
- **Aspartato: 4C:1N;**

Leguminosas de clima tropical (tais como amendoim, feijão-de-corda, soja e feijão) transportam ureídeos:

- **Alantoína: 4C:4N (Sintetizado no peroxissomo);**
- **Ácido alantóico: 4C:4N (Sintetizado no retículo endoplasmático);**
- **Citrulina: 6C:3N (Local de síntese desconhecido).**



Allantoic acid | Allantoin | Citrulline