

Cinética da reação de redução de nitrato a nitrito por actinomicetos isolados de solo

I — Influência da concentração
Hidrogênio-Iônica *

S. Joly

Instituto Zimotécnico

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz»

(*) Recebido para publicação em 5/7/60.

1. — INTRODUÇÃO

Os Actinomicetos no solo participam, entre outros processos, do importante ciclo do nitrogênio. A redução do nitrogênio nítrico é uma reação que pertence à etapa final do ciclo. O nitrogênio na forma nítrica pode, ao se reduzir, assumir um dos seguintes aspectos: a) desnitrificação direta, regenerando o nitrogênio na sua forma molecular; b) desnitrificação indireta, que pode ser por redução a nitrito ou a amônia, conforme se pode ilustrar pelo Esquema do ciclo do nitrogênio no solo.

O N amoniacal sofre uma oxidação, passando então a nitrito; por uma nova oxidação chega a nitrato.

É admissível que, provavelmente, o nitrito é forma intermediária no processo de redução de nitrato a amônia (BONNE & GALSTON, 1952).

Os íônios de amônio ou seus sais são prontamente assimilados pelas bactérias nitrificantes, convertendo-os em nitrato e colocando-os assim novamente no ciclo do nitrogênio para outros organismos metabolizarem.

A forma principal de composto nitrogenado assimilável pelas plantas é sem dúvida o nitrato, ou no estado iônico ou de sais. Comumente, se encontra no solo no aspecto iônico.

O nitrito não é encontrado em quantidades apreciáveis no tecido das plantas, porque elas reduzem o nitrato nas raízes ou ao nível das folhas, sendo daí transportado para os diferentes órgãos sob a forma de aminoácidos (BONNE & GALSTON, 1952).

Não é, portanto, colaboração de utilidade imediata às plantas o processo dessa redução por microrganismos, senão de modo indireto, no conjunto harmonioso da biopedologia. Contudo, a presença de uma microflora com essa típica característica é, além de complemento da existência conjunta da flora nitrificante (BARJAC, 1954), participante das fases do ciclo do nitrogênio.

Considerando, pois, este fato, decidimos fazer pequeno estudo dessa atividade de alguns Actinomicetos isolados de solo, observando a velocidade dessa reação sob determinado aspecto.

Em 1900, BEIJERINCK observou primeiro a capacidade dos Actinomicetos de reduzir nitrato, usando-a como característica taxonômica.

Mais tarde, KRAINSKY (1914) chamara a atenção para um fato que reputava importante: supunha que poucas espécies eram capazes de operar essa redução e muitas outras, produzindo pouco nitrito o consumiam em seu metabolismo apenas terminada a reação.

Depois, WAKSMAN (1919), estudou essa capacidade dos Actinomicetos, constatando que alguns "strains" reduzem o nitrato com

qualquer fonte de carbônio e outros com certas fontes de carbônio. Em qualquer desses casos, o que assume importância é a quantidade desse composto acumulado e não apenas formado e consumido.

GHOSH e colaboradores (1930), atribuindo uma tal importância a essa característica, houveram por bem dividir os Actinomicetos em três grupos, de acordo com a quantidade de nitrito produzida, isto é, redução nula ou pequena, média ou moderada e forte.

2. — MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhamos com 20 cepas de Actinomicetos procedentes de um solo Latosol vermelho amarelo, isolados alguns no verão, outros no outono, outros no inverno e, finalmente, outros na primavera, de acordo com o quadro I.

Usamos um meio nutritivo sintético, cuja fórmula foi por nós estabelecida, usando a glucose como fonte de carbônio.

Preferimos substituir o meio clássico usado para testar redução de nitrato por microrganismo, porque naquele é empregada a peptona como um de seus constituintes, o que pode dar causa de erro, pois, se parte então de outra etapa do ciclo do nitrogênio.

Fórmula do meio nutritivo adotado

KNO ₃	0,1	g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	2,5	
KH ₂ PO ₄	1,25	
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,003	
Glucose	5	
Sol. de TRELEASE (7)	1	ml
H ₂ O destilada, Q. S.	1000	ml

Realizamos o experimento com três pH diferentes.

1.º tratamento: pH 4,5

2.º tratamento: pH 5,5

3.º tratamento: pH 6,5

Embora se saiba que o pH ótimo para esses organismos seja próximo à neutralidade, sabe-se também que há um limite muito amplo em variação, segundo a tolerância desses seres e segundo as espécies consideradas. MASUMOTO, segundo SHINOBU, (1958), encontrou uma variação entre pH 4,0-9,0, sendo que poucos "strains" preferem os extremos desse limite de concentração hidrogênio-iônica.

Adotamos, pois, variações próximas do pH encontrado no solo de origem dessas culturas, isto é, 5,5.

Após inoculação, incubaram-se os frascos a 32°C, sendo retiradas amostras para titulação do nitrito produzido, com 1, 2, 3, 4, 5, e 8 dias de idade da cultura.

Realizamos o método clássico de titulação de nitrito, com o reativo de GRIESS, procedendo mensuração quantitativa pela densidade ótica em absorsômetro EVANS ELECTROSELENIUM, com comprimento de onda 4.900 A°.

QUADRO I

Época de isolamento de Actinomicetos de Solo			
	Estação do ano		Estação do ano
9	Verão	277	Primavera
33	»	278	»
89	Outono	281	»
91	»	285	»
92	»	288	»
94	»	293	»
126	»	316	»
130	»	327	»
183	Inverno	334	»
184	»	338	»

3. — RESULTADOS

A solução nutritiva foi distribuída em frascos Erlenmeyer de 50 ml de capacidade, com um conteúdo de 30 ml do meio líquido.

Os resultados da reação de redução de nitrato a nitrito estão expressos no quadro II.

As quantidades de nitrito produzido pelas cepas 33, 92, 94, 183, 184, 277, 288, 293 e 316 estão representados pelos gráficos de n.º I — X; apenas consideramos os resultados dos pH 5,5 e 6,5 porque com pH 4,5 nenhuma atividade se registrou. As demais cepas nada produziram de nitrito, mostrando absoluta inatividade nesta reação, em qualquer dos pH ensaiados.

A média das quantidades de NO₂ produzido, ao 5.º e ao 8.º dia, nos pH 5,5 e 6,5, está expressa no quadro III.

A velocidade da reação de redução de nitrato a nitrito está representada no gráfico X.

QUADRO II

REDUÇÃO DE NITRATO A NITRITO POR
ACTINOMICETOS DE SOLO

N.º da cepa	N.º de dias	pH			N. da cepa	N.º de dias	pH		
		4,5	5,5	6,5			4,5	5,5	6,5
		NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml			NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml
9	1	—	—	—	92	1	—	—	3,460
	2	—	—	—		2	—	—	5,320
	3	—	—	—		3	—	—	10,422
	4	—	—	—		4	—	—	10,422
	5	—	—	—		5	—	—	10,422
33	8	—	—	—	94	8	—	—	10,422
	1	—	—	—		1	—	8,730	—
	2	—	—	10,800		2	—	13,896	7,642
89	3	—	—	16,443	3	—	13,896	13,510	
	4	—	—	16,870	4	—	17,300	14,353	
	5	—	—	16,870	5	—	17,772	25,318	
	8	—	—	16,870	8	—	24,694	35,200	
	1	—	—	—	126	1	—	—	—
	2	—	—	—		2	—	—	—
3	—	—	—	3		—	—	—	
4	—	—	—	4		—	—	—	
5	—	—	—	5		—	—	—	
8	—	—	—	8		—	—	—	
91	1	—	—	—	130	1	—	—	—
	2	—	—	—		2	—	—	—
	3	—	—	—		3	—	—	—
	4	—	—	—		4	—	—	—
	5	—	—	—		5	—	—	—
	8	—	—	—		8	—	—	—
183	1	—	5,404	—	288	1	—	10,267	7,150
	2	—	7,334	—		2	—	18,335	7,150
	3	—	9,148	—		3	—	20,077	13,898
	4	—	11,965	—		4	—	29,915	14,957
	5	—	15,150	—		5	—	45,500	14,957
	8	—	21,773	—		8	—	45,500	24,511
184	1	—	4,014	12,231	293	1	—	3,460	10,267
	2	—	6,320	17,792		2	—	13,124	27,020
	3	—	11,965	18,268		3	—	14,668	35,898
	4	—	13,458	19,841		4	—	16,484	36,694
	5	—	14,475	20,848		5	—	44,790	36,690
	8	—	22,230	24,077		8	—	44,790	36,692
277	1	—	—	—	316	1	—	6,871	14,494
	2	—	18,841	20,535		2	—	7,874	16,887
	3	—	18,841	23,425		3	—	34,740	20,267
	4	—	26,794	23,426		4	—	41,338	29,740
	5	—	30,050	23,422		5	—	44,600	30,912
	8	—	30,048	23,427		8	—	44,600	33,196

QUADRO II

REDUÇÃO DE NITRATO A NITRITO POR
ACTINOMICETOS DE SOLO

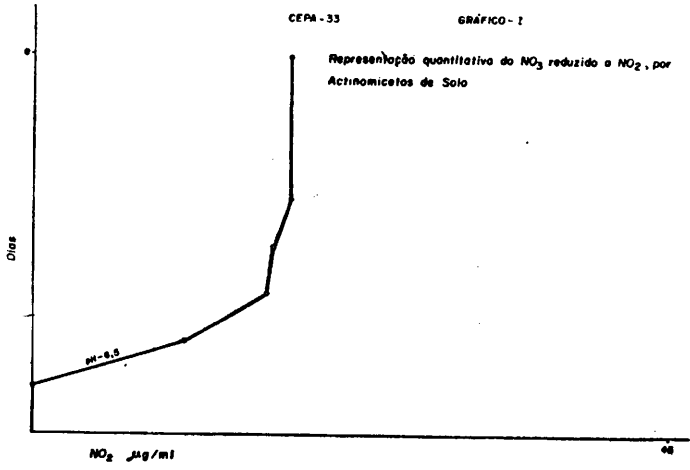
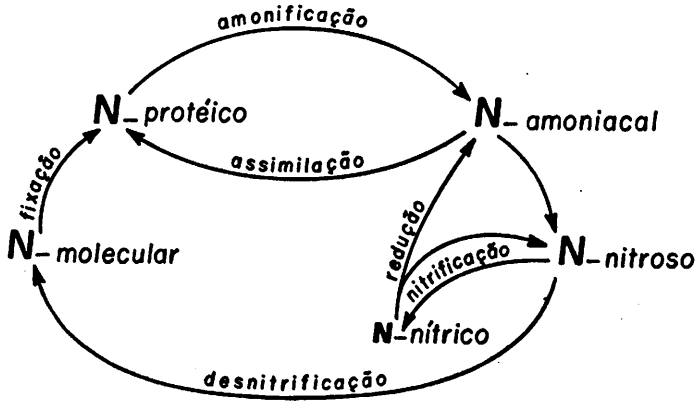
		pH					pH		
		4,5	5,5	6,5			4,5	5,5	6,5
N.º da cepa	N.º de dias	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml	N. da cepa	N.º de dias	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml	NO ₂ ,,g/ml
281	2	—	—	—		2	—	—	—
	3	—	—	—		3	—	—	—
	4	—	—	—		4	—	—	—
	8	—	—	—		8	—	—	—
	1	—	—	—		1	—	—	—
	2	—	—	—		2	—	—	—
	3	—	—	—		3	—	—	—
	4	—	—	—		4	—	—	—
285	5	—	—	—		5	—	—	—
	8	—	—	—		8	—	—	—
	1	—	—	—		1	—	—	—
	2	—	—	—		2	—	—	—
	3	—	—	—		3	—	—	—
	4	—	—	—		4	—	—	—
	5	—	—	—		5	—	—	—
	8	—	—	—		8	—	—	—

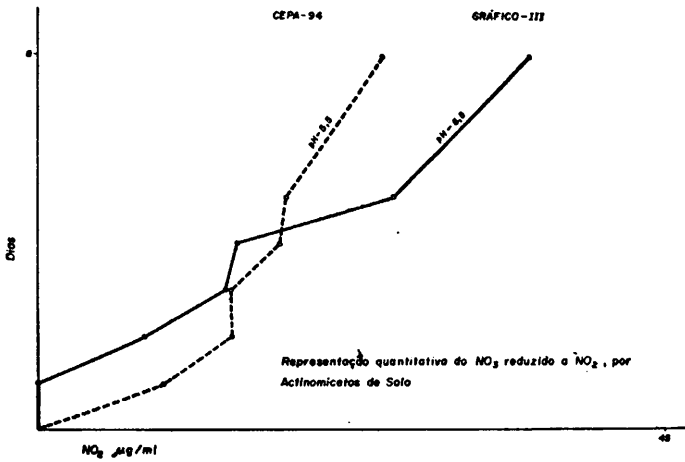
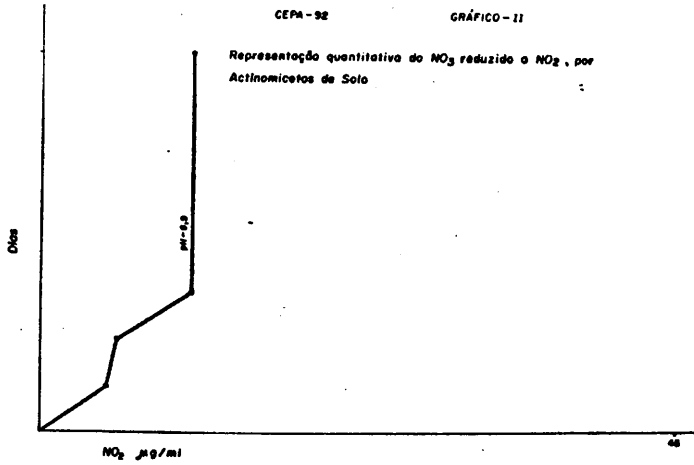
QUADRO III

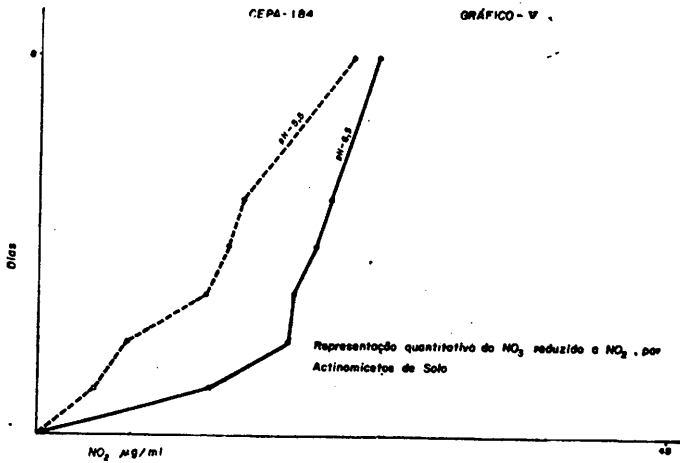
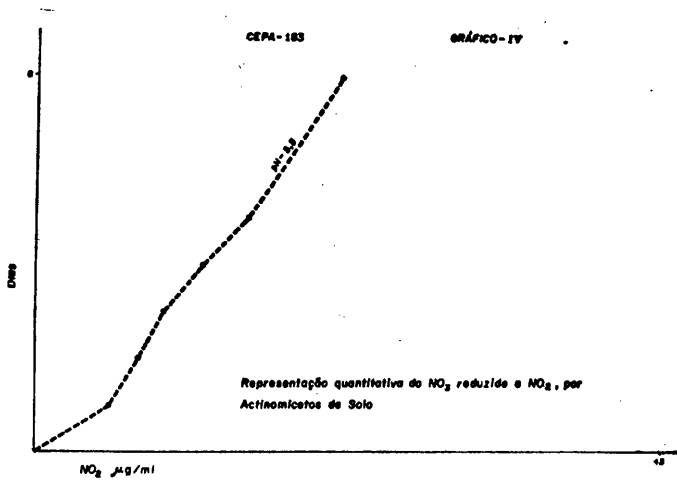
MÉDIA DAS QUANTIDADES DE NO₂ PRODUZIDO
PELAS 9 CEPAS ATIVAS, EM pH 5,5 e 6,5, AO 5.º e AO 8.º DIAS

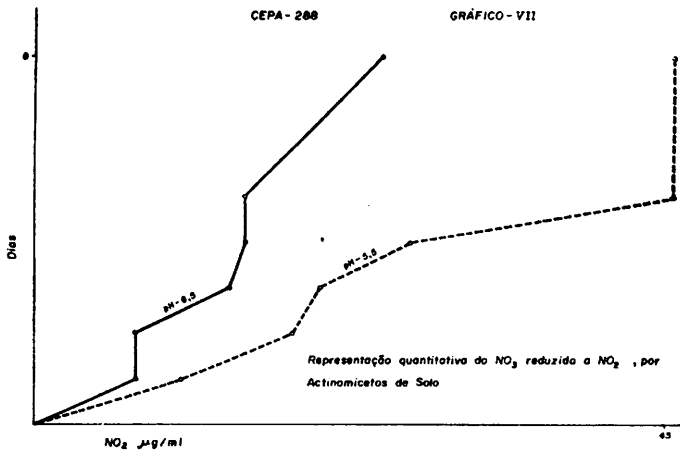
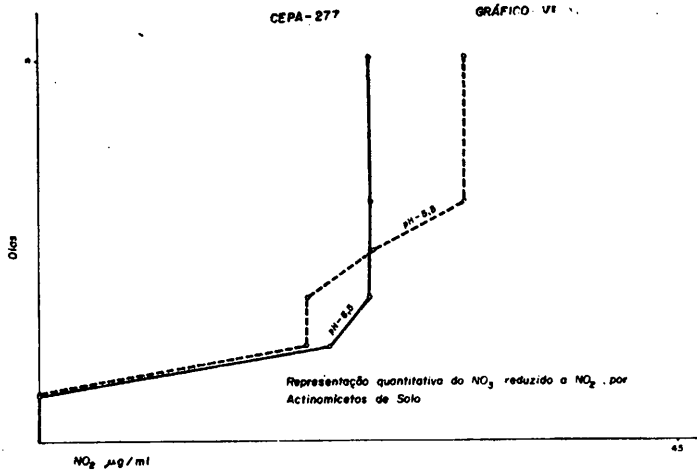
Nº da cepa	5º dia		8º dia	
	pH		pH	
	5,5	6,5	5,5	6,5
	µg NO ₂		µg NO ₂	
33	—	16,870	—	—
92	—	10,422	—	—
94	—	—	24,694	35,200
183	—	—	21,773	—
184	—	—	22,230	24,077
277	30,050	23,422	—	—
288	45,500	—	—	—
293	44,790	36,690	—	—
277	164,600	87,204	68,697	116,984
316	44,600	—	—	33,196
Média	164,948	87,204	68,697	116,984
Total 9	18,32	9,689	7,633	12,998

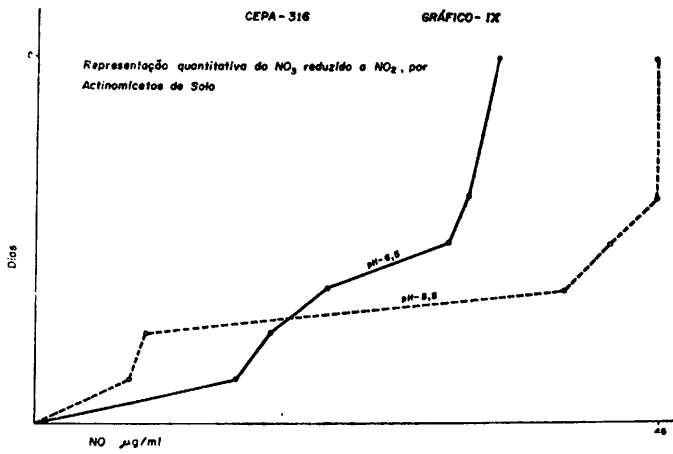
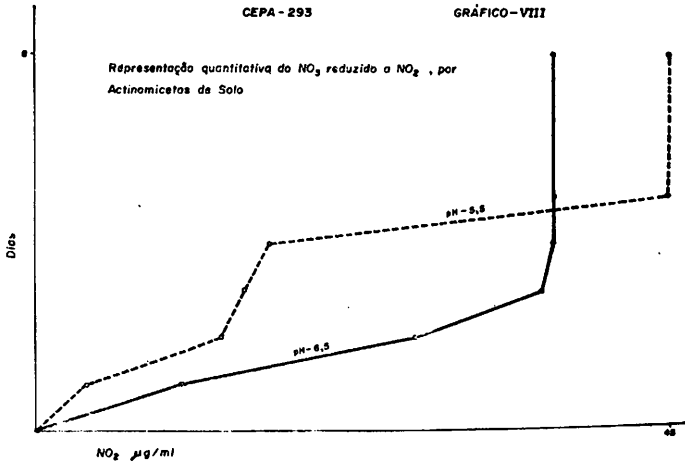
ESQUEMA DO CICLO DO NITROGÉNIO NO SOLO

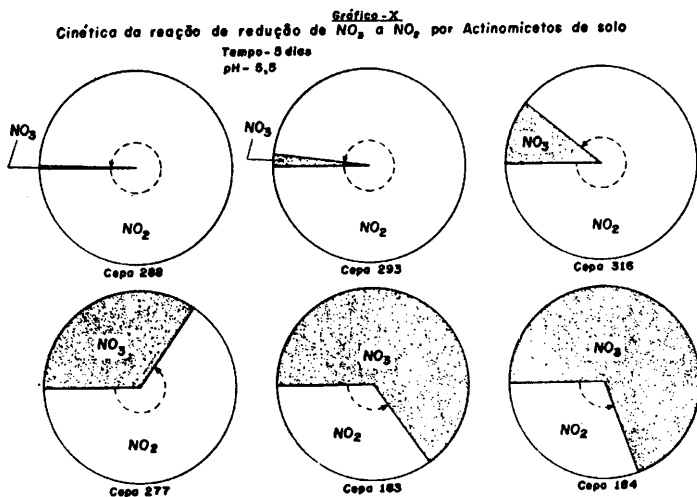












4. — DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O pH 4,5 mostrou-se desfavorável à produção de NO_2 por estas cepas ensaiadas: os pH 5,5 e 6,5 mostraram-se apropriados.

As cepas de n.ºs 9, 89, 91, 126, 130, 278, 281, 285, 327, 334 e 338 nada produziram em nenhuma das concentrações hidrogênio-iônicas experimentadas.

As cepas n.ºs 33, 92, 94, 183, 184, 277, 288, 293 e 316 foram as que reduziram o nitrato, em tempo e quantidade variáveis, conforme se verifica pelo exame do quadro II, com teor de acidez 5,5 e 6,5.

Portanto, somente 9 cepas revelaram habilidade para essa reação biológica, representando apenas 45% sobre o total.

Dentro do limite de tempo em que durou nossa experiência, 2 cepas foram ativas somente o pH 6,5; uma mostrou-se ativa somente com o pH 5,5. Outras ativas, reduziram o nitrato em ambos os pH.

Dentre 15 reações positivas, 7 se realizaram em pH 5,5 e 8 em pH 6,5. Com pH 5,5, registraram-se 4 reações com produção máxima ao 5.º dia e com pH 6,5, 5 reações com produção máxima ao 8.º dia. Esses valores não apresentam diferença representativa.

Examinando o quadro III percebemos que a média das quantidades de NO_2 produzido em pH 5,5 é superior aquela de NO_2 produzido em pH 6,5. Igualmente se verifica que a média das reações ao 5.º dia é superior aquela das reações ao 8.º dia.

Considerando que existia na solução nutritiva 0,1 g de KNO_3

correspondendo a 45,544 μg de NO_2 por ml após a redução, cabemos os seguintes comentários:

A cepa n.º 288, a de atividade mais enérgica, apresentou 45,500 μg de NO_2 por ml, em pH 5,5, no espaço de 5 dias, representando 99,9%, o que se pode considerar uma redução completa da quantidade total existente.

Segue-se a cepa n.º 293 que, em igualdade de condições, reduziu 44,790 μg de NO_2 por ml, representando 98,4% sobre o total e, depois, a cepa n.º 316, que reduziu 44,583 μg de NO_2 por ml, ou seja, 97,8% da quantidade inicial.

Após estas, coloca-se a cepa n.º 277, apresentando já uma queda da porcentagem que atingiu apenas 65,9%, diferindo, pois, bastante das três primeiras: reduziu somente 30,050 μg de NO_2 por ml.

As demais ativas, tiveram menor evidência.

Decorrente do exposto estamos habilitados a considerar que estas cepas de Actinomicetos realizam essa reação de redução no prazo de 5 dias, em pH 5,5.

Diante disso, podemos expressar a cinética dessa reação por um gráfico, o de n.º X, tomando em consideração o espaço de 5 dias e o pH 5,5.

É-nos lícito admitir, talvez, uma desnitrificação direta, com liberação do N molecular, tendo neste caso escapado à verificação, ou ainda, ocorrido outro aspecto da desnitrificação indireta, isto é, redução a amônia.

POCHON et al (1958), citam várias espécies de bactérias responsáveis pela desnitrificação indireta, ou seja, redução de NO_3 a NO_2 ou NH_4 , variando segundo o doador de H_2 . Entretanto, não menciona os Actinomicetos neste grupo.

São organismos heterotróficos: a intensidade dessa reação está, portanto, na dependência da matéria orgânica posta à sua disposição, se de mais fácil ou não decomposição.

Parece-nos admissível que as cepas de atividade nula ou de pequena capacidade de produção, em condições diferentes daquela que proporcionamos, possa manifestar essa capacidade, agora revelada nula ou limitada.

5. — CONCLUSÕES

As cepas ensaiadas que se mostraram ativas, alcançaram o máximo da produção em 5 dias com pH 5,5; êste é o pH do solo de origem desses organismos.

O pH 4,5 foi absolutamente impróprio para essa reação.

As cepas mais ativas são as da primavera, alcançando até 99,90% de redução do material pôsto à sua disposição.

Estes resultados nos permitem concluir que os Actinomicetos podem ser portadores dessa faculdade importante nas operações biopedológicas: são enconradiços em nossos solos e cuja velocidade de reação é rápida.

Dêste modo, os Actinomicetos são ativos participantes do ciclo do N no solo.

6. — SUMMAY

Among some strains of Actinomycetes isolated from Latosol red-yellow soil during the four seasons of the year only few strains had the capacity to reduce nitrate to nitrite. The stronger activity was shown by the strains isolated in springtime and at a pH of 5,5.

7. — LITERATURA CITADA

- 1 — BARJAC, H.-1954 — La microflora dénitrifiante: sa présence normale dans le sol, Ann. Inst. Pasteur, **87** (4): 440-444.
- 2 — BONNER, J., A. W Galston 1952 — Principles of Plant Physiology,, Freeman and Co., S. Francisco, p. 255.
- 3 — GHOSH, L. M. S. Shosh, N. R. Chatterjee and A. T. Dutt 1938 — Actinomycetes: their biochemical reaction as aids in their classification. I — Reduction of nitrates, J. Ind. Bot. Soc., **17**: 279-286
- 4 — KRAINSKY, A. 1914 — Die Aktinomyceten und ihre Bedeutung in the Natur, Centbl. Bakt. Abt. II, **41**: 639-688.
- 5 — POCHON, J. e H. de Barjac 1958 — Traité de Microbiologie des Sols. Applications Agronomiques, Dunod, 92, Rue Bonaparte (6.^o), Paris.
- 6 — SHINOBU, R. 1958 — Physiological and cultural study for the identification of soil Actinomycetes species — Memoirs of the Osak University of the Liberal Arts and Education, B. Natural Science N.^o 7.
- 7 — TRELEASE, S. F., and H. M. Trelease 1935 — Changes in hidrogen-ion concentration of culture solutions containing nitrate and ammonium nitrogen, Am. J. Bot., **22**: 520-542.
- 8 — WAKSMAN, S. A. 1919 — Studies in the metabolism of actinomycetes, J. Bact., **4**: 189-216.