

Cristina Maria Teixeira Militão

ESTUDO DO CICLO DO AZOTO

UMA APLICAÇÃO PARA O ENSINO



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto – 2004

Cristina Maria Teixeira Militão

ESTUDO DO CICLO DO AZOTO

UMA APLICAÇÃO PARA O ENSINO



FACULDADE DE CIÊNCIAS
UNIVERSIDADE DO PORTO

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto – 2004

Cristina Maria Teixeira Militão

ESTUDO DO CICLO DO AZOTO

UMA APLICAÇÃO PARA O ENSINO

Dissertação de Mestrado em *Biologia para o Ensino*
submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Departamento de Botânica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Porto – 2004

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, não podia deixar de agradecer a todos aqueles que, de uma ou outra forma, contribuíram para a sua elaboração:

À Prof. Dra. Ana Maria Parente Delgado, pela orientação deste trabalho, pela disponibilidade e incentivo.

Ao Prof. Dr. António Gil Pereira de Castro, pela co-orientação deste trabalho.

Aos amigos, pela disponibilidade e apoio.

Aos meus Pais, pelo apoio, compreensão e confiança sempre presentes ao longo da minha vida. Sem eles, nada seria possível.

Ao Ricardo, por tudo.

RESUMO

RESUMO

O ciclo do azoto desempenha um papel fundamental na manutenção do equilíbrio da biosfera. O azoto molecular é o gás mais abundante na atmosfera terrestre, porém, as formas combinadas de azoto são relativamente escassas no solo e na água. O azoto é um constituinte importante de proteínas, ácidos nucleicos e coenzimas. Poucos seres vivos, no entanto, podem usar o azoto atmosférico directamente como fonte de azoto. Assim, a disponibilidade dos compostos azotados nos ecossistemas está largamente dependente das actividades metabólicas dos microrganismos que realizam as transformações cíclicas do azoto, permitindo a sua reciclagem no ambiente. Este ciclo reveste-se assim de um enorme interesse, dada a sua importância na manutenção da qualidade de vida do nosso planeta. Ao longo dos anos, o ciclo do azoto tem vindo a sofrer diversas alterações em consequência das actividades humanas. Uma vez que os compostos azotados são essenciais para os seres vivos e a sua disponibilidade é fundamental para o funcionamento dos ecossistemas, o impacto humano representa um sério perigo. A sociedade tem de ser sensibilizada para este problema, o que passa obrigatoriamente pela compreensão da importância do ciclo do azoto. Esta acção de sensibilização deve ter como parceiro privilegiado a escola. A escola pode promover em toda a comunidade escolar a compreensão da intensa actividade dos ecossistemas e dos diversos processos que contribuem para o seu equilíbrio dinâmico.

No presente trabalho, foram aprofundados os conhecimentos acerca das actividades desenvolvidas pelos microrganismos nos principais processos que definem o ciclo do azoto, nomeadamente, a fixação do azoto atmosférico, a amonificação, a nitrificação, a desnitrificação e a oxidação anaeróbia do amoníaco. Microrganismos responsáveis por vários destes processos foram isolados ou detectados em amostras adequadas. Um especial relevo foi dado ao estudo da oxidação anaeróbia do amoníaco, bem como aos microrganismos responsáveis por este processo, que se sabe pertencerem aos Planctomycetes. A técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), utilizando uma sonda oligonucleotídica específica, permitiu a detecção de Planctomycetes na comunidade microbiana presente nas amostras de lamas primárias provenientes de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais. *Rhizobium* sp., bactéria responsável pela fixação simbiótica do azoto atmosférico foi isolada a partir de nódulos radiculares de *Ornithopus pinnatus*, uma planta leguminosa vulgarmente designada por serradela-delgada. *Nitrosomonas* sp. e *Nitrobacter* sp., bactérias nitrificantes responsáveis, respectivamente, pela oxidação do amoníaco e do nitrito, foram isoladas a partir

de amostras de solo, utilizando meios selectivos. O sistema de identificação API 20E permitiu identificar, a partir de amostras de solo, diversas bactérias envolvidas na redução desassimilatória do nitrato, nomeadamente *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pasteurella* e *Moraxella*, com capacidade de reduzir o nitrato a azoto molecular (desnitrificação), *Serratia* e *Escherichia coli*, com capacidade de reduzir o nitrato a nitrito e *Enterobacter*, que realiza a amonificação do nitrito.

Os resultados deste estudo, incluindo a parte teórica e experimental, foram usados para desenvolver uma proposta de aplicação em processos de ensino-aprendizagem, segundo as orientações curriculares para o 3ºCiclo do Ensino Básico e Secundário. Deste modo, foi elaborada uma proposta de aplicação, sob a forma de uma planificação a médio prazo do processo de ensino-aprendizagem, que procurou englobar diversos aspectos relevantes do ciclo do azoto, salientando as actividades desenvolvidas pelos microrganismos e a sua importância no equilíbrio dos ecossistemas.

ABSTRACT

ABSTRACT

The nitrogen cycle plays an important role in the maintenance of the balance of the biosphere. Molecular nitrogen is one of the most abundant gases in the earth atmosphere; however, the combined forms of nitrogen are relatively scarce in the soil and water. Nitrogen is an important component of proteins, nucleic acids and many coenzymes. However, very few living organisms can directly use atmospheric nitrogen as a nitrogen source. Therefore, the availability of nitrogenous compounds in the ecosystems is widely dependent on the metabolic activities of microorganisms involved in the nitrogen cycle. The understanding of the nitrogen cycle is of main interest, given its importance in the maintenance of the life quality in our planet. Since the nitrogenous compounds are essential for the living organisms and their availability is fundamental for the functioning of the ecosystems, the human impact represents a serious danger. In fact, the nitrogen cycle has been suffering several alterations associated with human activities. Thus, a sustained development promoting the balance of the ecosystems is required. Human beings should be familiar with this problem, and understand the importance of the nitrogen cycle. This action should have the school as a privileged partner. The school can promote in the whole school community the understanding of the intense activity of the ecosystems and of all the processes that contribute to its dynamic balance.

In the present work, we expanded our knowledge concerning the activities of microorganisms in the main processes that define the nitrogen cycle: namely the fixation of atmospheric nitrogen, the ammonification, the nitrification, the denitrification and the anaerobic ammonium oxidation. Microorganisms responsible for several of these processes had been isolated or detected in appropriated samples. The anaerobic ammonium oxidation has had a special highlight, as well as microorganisms responsible for it, belonging to Planctomycetes. The fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with specific oligonucleotide probe, allowed the detection of Planctomycetes among the bacterial community in samples of activated sludge from a wastewater treatment plant. *Rhizobium* sp., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium, was isolated from root nodules of *Ornithopus pinnatus*. *Nitrosomonas* sp. and *Nitrobacter* sp., nitrifying bacteria, respectively, responsible for the ammonium and nitrite oxidation, were isolated from soil samples, using selective culture media. The identification system API 20E allowed the identification, from soil suspensions, of several bacteria involved in the dissimilatory nitrate reduction, namely *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pasteurella* and *Moraxella*, which reduce nitrate to

molecular nitrogen (denitrification), *Serratia* and *Escherichia coli*, which reduces nitrate to nitrite and *Enterobacter*, which carry out the nitrite ammonification.

The results of this study, including the theoretical and experimental components, had been used to develop a proposal for the teaching-learning processes, according the curricular guiding for the “3º Ciclo do Ensino Básico e Secundário”. In summary, we develop a proposal of a teaching-learning process, including several relevant aspects concerning the nitrogen cycle, the activities developed by microorganisms and its importance to the balance of the ecosystems that should be implemented in the teaching core curriculum.

RÉSUMÉ

RÉSUMÉ

Le cycle de l'azote joue un rôle essentiel dans la manutention du équilibre de la biosphère. L'azote moléculaire est un des majeurs composés gazeux dans l'atmosphère terrestre; cependant, les formes combinées d'azote sont relativement rares dans le sol et eau. L'azote est un composant important de protéines, acides nucléiques et beaucoup de coenzymes. Cependant, très peu d'êtres vivants peuvent utiliser directement de l'azote atmosphérique comme une source de l'azote. Par conséquent, la disponibilité de composés azotés dans les écosystèmes est largement dépendante sur les activités métaboliques de micro-organismes que réalisent les transformations cycliques de l'azote et que permet son recyclage dans l'environnement. La compréhension du cycle de l'azote est de grand intérêt, donné son importance dans la manutention de la qualité de la vie dans notre planète. Le cycle de l'azote a souffert des plusieurs modifications associées avec les activités humaines. Comme les composés azotés sont essentiels pour les organismes et leur disponibilité est fondamentale pour le fonctionner des écosystèmes, l'impact humain représente un danger sérieux. Donc, un développement soutenu qui encourage la balance des écosystèmes est exigé. La société devrait être familier avec ce problème et comprend l'importance du cycle de l'azote. Cette action devrait avoir l'école comme un partenaire privilégié. L'école peut encourager dans la entière communauté scolaire la compréhension de l'intense activité des écosystèmes et de tous les processus qui contribuent à sa balance dynamique.

Dans le présent travail, nous avons approfondi notre connaissance à propos des activités de micro-organismes dans les principaux processus qui définissent le cycle de l'azote: à savoir la fixation d'azote atmosphérique, l'ammonification, la nitrification, la dénitrification et l'oxydation anaérobie de l'ammoniac. Micro-organismes responsable pour plusieurs de ces processus avait été isolé ou été détecté dans les échantillons appropriés. Un spécial relief a été donné à l'étude de l'oxydation anaérobie de l'ammoniac, ainsi qu'aux micro-organismes responsable pour lui, que se sait appartenir au Planctomycetes. La technique de hybridation *in situ* à fluorescence (FISH) avec sonde oligonucleotide spécifique a permis la détection des Planctomycetes dans la communauté bactérienne des échantillons de boues activées d'une installation de traitement des eaux résiduelles. *Rhizobium* sp., une bactérie que fixe d'azote atmosphérique en symbiose, a été isolé de nodosités racinaires de *Ornithopus pinnatus*. *Nitrosomonas* sp. et *Nitrobacter* sp., bactéries nitrifiant responsable, respectivement, pour l'oxydation de l'ammoniac et du nitrite, ont été isolés d'échantillons du sol, en utilisant des moyens de la culture sélectifs. Le système de l'identification API 20E a

permis l'identification de plusieurs bactéries impliquées dans la réduction dissimilative du nitrate, à savoir *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pasteurella* et *Moraxella*, qui réduit le nitrate en azote moléculaire (dénitrification), *Serratia* et *Escherichia coli*, qui réduisent le nitrate en nitrite et *Enterobacter*, qui réalise l'ammonification du nitrite.

Les résultats de cette étude, compris les composants theorical et expérimentaux, avaient été utilisés pour développer une proposition d'application pour processus de l'enseignement- apprentissage, en accordant le guider scolaire pour "3º Ciclo do Ensino Básico e Secundário". Dans résumé, nous développons une planification d'un processus de l'enseignement- apprentissage, y compris plusieurs aspects pertinents à propos du cycle de l'azote, les activités développées par micro-organismes et son importance dans l'équilibre des écosystèmes qui devraient être rendus effectif dans le programme scolaire.

ÍNDICE

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os desafios da Educação.....	3
1.2. Ciência e Educação.....	4
1.3. Importância do ciclo do azoto e do seu estudo.....	8
1.4. Enquadramento educativo do tema nas orientações curriculares do Ensino Básico (3º Ciclo) e do Ensino Secundário.....	9
1.5. Objectivos.....	11
2. O CICLO DO AZOTO.....	12
2.1. Fixação do azoto atmosférico.....	14
2.1.1. Sistema enzimático nitrogenase.....	17
2.1.2. Desenvolvimento da simbiose <i>Rhizobium</i> – plantas leguminosas.....	21
2.1.3. Fixação simbiótica do azoto atmosférico.....	25
2.2. Amonificação.....	26
2.3. Nitrificação.....	27
2.3.1. Bactérias nitrificantes.....	31
2.4. Redução assimilatória e desassimilatória do nitrato. Desnitrificação.....	32
2.5. Oxidação anaeróbia do amoníaco.....	36
3. ALTERAÇÕES ANTROPOGÉNICAS NO CICLO DO AZOTO – CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS.....	43
3.1. Impacto humano na fixação do azoto.....	44
3.2. Impacto na atmosfera.....	45
3.3. Impacto nos ecossistemas terrestres.....	47
3.4. Impacto nos ecossistemas aquáticos.....	48
3.5. Necessidade de um desenvolvimento sustentável.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1. Detecção de Planctomycetes.....	52
4.1.1. Fixação das amostras.....	52
4.1.2. Imobilização em lâminas.....	52

4.1.3. Sonda oligonucleotídica e corantes utilizados.....	53
4.1.4. Hibridização <i>in situ</i> com fluorescência (FISH).....	53
4.1.5. Coloração com DAPI.....	54
4.1.6. Microscopia.....	54
4.2. Isolamento de <i>Rhizobium sp.</i>	54
4.2.1. Obtenção de culturas puras de <i>Rhizobium sp.</i>	54
4.2.2. Coloração de Gram.....	55
4.3. Isolamento de bactérias nitrificantes.....	56
4.3.1. Obtenção de culturas puras de bactérias nitrificantes.....	56
4.4. Isolamento de bactérias com capacidade de reduzir o nitrato.....	57
4.4.1. Identificação de microrganismos com o sistema API 20E.....	57
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	59
5.1. Detecção de Planctomycetes.....	60
5.2. Isolamento de <i>Rhizobium sp.</i>	63
5.3. Isolamento de bactérias nitrificantes.....	64
5.4. Isolamento de bactérias com capacidade de reduzir o nitrato.....	65
6. APLICAÇÃO NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM.....	72
6.1. Uma aplicação para o ensino.....	79
7. CONCLUSÃO.....	81
8. BIBLIOGRAFIA.....	83

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Actualmente o ensino das Ciências visa a compreensão da Ciência e da Tecnologia, das suas inter-relações, das suas implicações na sociedade e, ainda, do modo como os conhecimentos sociais se repercutem nos objectos de estudo da Ciência. A Educação em Ciência, para além da aprendizagem de um conjunto de conhecimentos e de processos científicos, preocupa-se também em garantir que tais aprendizagens se tornem úteis no dia-a-dia, numa perspectiva de acção, no sentido de contribuírem para o desenvolvimento pessoal e social dos indivíduos, num contexto de sociedades tecnologicamente desenvolvidas que se querem abertas e democráticas. Trata-se de facto de valorizar objectivos educacionais e não objectivos instrucionais. Assim, é cada vez maior o apelo à abordagem de situações-problema que possam permitir a construção sólida de conhecimentos e a reflexão sobre os processos da Ciência e da Tecnologia, bem como as suas inter-relações com a Sociedade e o Ambiente. Este tipo de abordagem pretende facultar uma aprendizagem nos domínios científico e tecnológico que possibilite uma melhor informação para decidir e agir responsabilmente. Na verdade, trata-se de desmistificar a Ciência, ajudando o aluno a compreender os percursos da construção do conhecimento científico, bem como das suas múltiplas facetas. O aluno é colocado numa situação de cidadão activo que tem de desempenhar papéis e partilhar responsabilidades com os seus pares. Trata-se de olhar a educação científica não só *em* Ciência, mas também *através* da Ciência e *sobre* a Ciência, como promotora de culturas científicas, mais humanizada, mas também mais próxima da sociedade futura, num mundo tecnologicamente avançado e alfabetizado cientificamente. Tudo isto exige necessariamente uma grande segurança do professor, no que respeita aos conteúdos científicos envolvidos, para ser capaz de descodificar as respostas dos alunos, detectar obstáculos, ajudar a mudar, enfim, para estar disponível, o que justifica perfeitamente um necessário investimento na sua formação contínua.

A temática do ciclo do azoto, objecto de estudo deste trabalho, torna possíveis todos estes aspectos, permitindo abordagens inseridas no movimento Ciência-Tecnologia-Sociedade-Ambiente, quer pelos conteúdos pertinentes, nomeadamente os desenvolvimentos mais recentes da Ciência, quer pelo pluralismo metodológico que possibilita, nomeadamente a componente experimental envolvida, factores importantes para imprimir realismo ao processo de ensino-aprendizagem, essencial para a motivação dos alunos. Sendo assim, neste trabalho realizou-se pesquisa no âmbito do ciclo do azoto e, a

partir deste estudo, procedeu-se à elaboração de uma proposta de aplicação em processos de ensino-aprendizagem, de acordo com as orientações curriculares vigentes.

1.1. Os desafios da Educação

No despontar de um novo século, a educação é considerada como um instrumento indispensável à humanidade para que esta possa alcançar os tão desejados ideais de paz, liberdade e justiça social. A educação desempenha um papel fundamental no desenvolvimento contínuo das pessoas e das comunidades e deve ser encarada como uma via primordial para que esse desenvolvimento seja pleno e autêntico, de modo a fazer excluir a pobreza, a injustiça social, as opressões e as guerras. A educação deve, através do conhecimento, da experiência e da construção duma cultura pessoal, ensinar a viver melhor e tem como missão permitir que todos os indivíduos, sem excepção, desenvolvam os seus talentos e potencialidades criativas, de modo a que cada um seja capaz de se responsabilizar por si mesmo e pela realização do seu projecto pessoal. As políticas educativas devem ter como principais objectivos não só um permanente enriquecimento dos conhecimentos e da capacidade técnica, mas principalmente uma estruturação sólida da pessoa e das relações entre indivíduos, entre grupos e entre nações. Só desse modo poderão contribuir para um desenvolvimento humano sustentável, para a compreensão mútua entre os povos, ou seja, para a construção de um mundo melhor (Delors *et al*, 1998).

Apesar dos sistemas educativos formais darem prioridade à aquisição de conhecimentos em detrimento de outras formas de aprendizagem, a educação deve ser olhada como um todo. Nessa concepção, as reformas educativas devem procurar inspiração e orientação, tanto para a elaboração dos programas, como para a definição de novas políticas pedagógicas.

A educação deve organizar-se à volta de quatro pilares fundamentais: *aprender a conhecer*, em que se procura associar a uma vasta cultura geral a possibilidade de aprofundar os conhecimentos num pequeno número de matérias; *aprender a fazer*, a fim de se adquirir não só qualificação profissional, mas uma competência mais ampla que permita ao indivíduo enfrentar um grande número de situações e que facilite o trabalho em equipa; *aprender a viver em comunidade*, a fim de se desenvolver a compreensão pelo outro e a percepção de formas de interdependência, respeitando os valores do pluralismo, compreensão mútua e paz;

aprender a ser para um bom desenvolvimento da própria personalidade, capacidade de autonomia, avaliação e responsabilidade pessoal. Cada vez mais os instrumentos de aprendizagem e os conteúdos educativos devem possibilitar um melhor desenvolvimento de competências que permitam uma melhor qualidade de vida, capacidade de avaliação e tomada de decisões, tendo em conta o acesso a dimensões tão importantes da educação como a ético-cultural, científico-tecnológica e a económico-social. Por outras palavras, o direito e o dever de educação exprimem-se por uma efectiva acção formativa, destinada a promover o desenvolvimento da personalidade e valorização individual, a igualdade de oportunidades, a superação das desigualdades e o progresso social, com vista à consolidação de uma vivência colectiva livre, responsável e democrática. A educação deve promover o desenvolvimento do espírito democrático e pluralista, formando cidadãos capazes de julgarem, com espírito crítico e criativo, a sociedade em que se integram e de se empenharem activamente no seu desenvolvimento, em termos mais justos e sustentáveis. À educação cabe fornecer a cartografia de um mundo complexo e constantemente agitado e, simultaneamente, a bússola que permita navegar através dele.

1.2. Ciência e Educação

O ensino da Ciência está frequentemente centralizado nos produtos da Ciência, enfatizando a informação de factos. Trata-se de uma visão empirista da Ciência – a Ciência pronta – em que esta é considerada um processo de recolha de informação acerca dos fenómenos, elaborando-se leis e teorias, perenes e infalíveis. Assim, é feita ao aluno uma descrição desse conhecimento, como um produto, sem ter em conta os processos subjacentes à sua elaboração, por vezes complexos e sinuosos. Esta visão de Ciência é irrealista e está completamente ultrapassada, sendo necessário pôr em prática uma visão racionalista, construtivista e externalista de Ciência, de modo a reverter a insatisfação geral e ensinar Ciência como uma actividade sólida e realista de resolução de problemas (Cachapuz, 1992).

A visão da Ciência em construção enfatiza o processo de pesquisa, apresentando os problemas com que os cientistas se debateram e o modo como os resolveram, explicando o processo de resolução, um percurso não linear e nada místico, mas sim marcado pela invenção e criatividade. Qualquer contexto social, cultural ou político influencia o rumo da investigação científica. Sendo assim, o ensino da Ciência, especialmente da Biologia, não deve ficar confinado ao produto final. Não se transmite a verdadeira essência científica de um

modo exclusivamente teórico e livresco, enfatizando a memorização. O ensino da Ciência deve reflectir o seu carácter construtivo e dinâmico. A investigação científica implica a resolução de problemas e o mesmo deve verificar-se no ensino da Ciência. Assim, o aluno não deve ser um mero receptor de informação, mas antes ter um papel activo e construir o seu conhecimento, tal como os cientistas construíram o conhecimento científico. O aluno deve ser envolvido nos processos da Ciência, isto é, deve colocar questões, pesquisar, recolher dados, colocar hipóteses e reiniciar o processo sempre que necessário. A educação em Biologia só está completa quando envolve uma experiência em primeira mão com produção e aplicação de conhecimentos científicos (Chalmers, 2000). A resolução de problemas realistas facilita a compreensão de conceitos que de outra forma se tornam vagos e abstractos. Os alunos passam a perceber os conteúdos como meios necessários ao pensamento. Trata-se de mudar atitudes, de envolver cognitivamente e afectivamente os alunos, sem conduções muito marcadas pelo professor, garantindo que a aprendizagem se tornará útil no dia-a-dia numa perspectiva de acção. Esta metodologia coloca assim a ênfase na compreensão, quer de ideias científicas, quer de métodos de trabalho. A par da aprendizagem de conceitos, estimula-se assim o desenvolvimento do pensamento, de capacidades de raciocínio e de competências de comunicação verbal. Segundo esta pedagogia, só existe uma forma do aluno aprender Ciência: experimentando a natureza da construção do conhecimento científico. A abordagem de situações-problema do quotidiano permite reflectir sobre os processos da Ciência e da Tecnologia, bem como as suas inter-relações com a Sociedade e o Ambiente. As experiências de ensino Ciência-Tecnologia-Sociedade-Ambiente mostram ser esta uma via promissora em termos de maior motivação e melhor preparação dos alunos para darem uma resposta mais adequada aos problemas científico-tecnológicos do mundo contemporâneo (Cachapuz *et al*, 2001).

A sociedade de informação hoje instalada gera uma imensa corrente de informação que exige uma contínua consolidação e actualização de conhecimentos e apela à compreensão da Ciência. Deve promover-se o desenvolvimento de competências socio-cognitivas e de pesquisa de informação que permitam que o aluno se torne um elemento activo da sociedade, capaz de gerir a informação que recebe, capaz de tomar decisões e conduzir o seu destino num mundo onde a mudança é cada vez mais rápida. A literacia científica é fundamental para o exercício pleno da cidadania. A escola deve formar para a sociedade do conhecimento. A cultura geral que todos devem desenvolver pressupõe a aquisição de um certo número de conhecimentos e a apropriação de um conjunto de processos fundamentais enquadrados por uma perspectiva que coloca em primeiro plano o desenvolvimento de capacidades de

pensamento e de atitudes favoráveis à aprendizagem. A clarificação de competências sustenta-se num conjunto de valores e de princípios necessários à qualidade de vida pessoal e social de todos os cidadãos como a construção e a tomada de consciência da identidade pessoal e social; a participação na vida cívica de forma livre, responsável, solidária e crítica; o respeito e a valorização da diversidade dos indivíduos e dos grupos quanto às suas opções e pertenças; a valorização de diferentes formas de conhecimento, comunicação e expressão; o desenvolvimento do sentido de apreciação estética do mundo; o desenvolvimento da curiosidade intelectual, do gosto pelo saber, pelo trabalho e pelo estudo e a valorização das dimensões relacionais da aprendizagem e dos princípios éticos que regulam o relacionamento com o saber e com os outros (Cachapuz *et al*, 2001).

Esta nova perspectiva de ensino, centrada numa concepção epistemológica marcada pela Nova Filosofia da Ciência, valoriza assim metodologias de trabalho activas, de co-responsabilização, de participação e empenhamento, o trabalho inter-pares e de partilha. Preconiza-se o desenvolvimento de competências em diversos domínios, como o conhecimento, raciocínio, comunicação e atitudes. Segundo a perspectiva proposta, estas competências são desenvolvidas, quer pela análise e discussão de situações problemáticas, quer pelo trabalho em equipa, pela análise e debate de descobertas científicas, evidenciando-se os êxitos e fracassos e a influência da sociedade, quer pela resolução de problemas, tratamento de dados, planeamento de abordagens de trabalho, quer pela vivência de situações que desenvolvam capacidades de exposição de ideias, argumentação, partilha de informação, curiosidade, seriedade no trabalho, reflexão crítica e avaliação do mesmo (Cachapuz *et al*, 2001).

A Educação para os Valores em Ciência constitui um aspecto fundamental da nova perspectiva proposta. Trata-se de humanizar a Ciência e a Tecnologia. O professor tem de utilizar materiais que permitam fomentar a discussão e equacionar questões filosóficas, existenciais, éticas ou culturais capazes de mostrar aos alunos que as questões da sociedade lhes dizem respeito. A discussão em torno de questões desta índole ajuda a fortalecer laços de solidariedade entre os alunos, na busca de respostas comuns, ajuda a ver que nem todos pensam da mesma forma, em virtude de quadros culturais e sociais diversificados, ajuda a construir uma democracia mais participada, finalidade essencial da Escola numa sociedade propensa ao alheamento. Trata-se de ajudar os alunos a transformar a informação em conhecimento. Trata-se de mudar e reestruturar atitudes e comportamentos. É talvez o principal desafio desta perspectiva de ensino por pesquisa que procura metodologias para uma acção tolerante, lúdica, mas exigente e de rigor (Cachapuz *et al*, 2001).

Cabe ao professor abordar os conteúdos com base em situações e problemas do quotidiano, organizando e promovendo actividades de aprendizagem orientadas para o questionamento da realidade, a integração e troca de saberes, valorizando situações de interacção e de expressão oral e escrita, apoiando o aluno na descoberta das diversas formas de organização da sua aprendizagem. Deve ainda organizar o ensino prevendo a pesquisa, selecção e tratamento de informação que permita ao aluno fazer escolhas, confrontar pontos de vista e resolver problemas, desenvolvendo a autonomia, a responsabilização e a criatividade.

O professor deve ajudar os alunos a fazer a transição do contexto de turma enquanto um todo para pequenas equipas de aprendizagem, além de orientar as equipas à medida que elas trabalham. Num ambiente cooperativo, os alunos desenvolvem o respeito pelos outros e a apreciação mútua, aprendendo a aceitar pessoas com heranças culturais e condições de trabalho diferentes. A cooperação desenvolve a comunicação, promovendo a criação de ideias e a influência mútua, para que a partir de um pensamento individual seja possível um pensamento colectivo. As comunidades encontram-se interdependentes e, como tal, é necessário um elevado nível de cooperação entre os indivíduos, de modo a construir e manter a solidez democrática da sociedade (Arends, 1995).

As Ciências Naturais contribuem de forma particular para o desenvolvimento destas competências e atitudes. A mudança tecnológica acelerada e a globalização do mercado exigem indivíduos com uma capacidade de aprender ao longo da vida. A Ciência transformou não só o ambiente natural, mas também o modo como pensamos sobre nós próprios e sobre o mundo. Os processos que utiliza são um valioso contributo para o desenvolvimento do indivíduo. O papel da Ciência e da Tecnologia no nosso dia-a-dia exige uma população com conhecimento e compreensão suficientes para entender e seguir debates sobre temas científicos e tecnológicos e envolver-se em questões que estes temas colocam, quer para eles como indivíduos quer para a sociedade como um todo. O ensino *em* Ciência, *através da* Ciência e *sobre a* Ciência é assim fundamental.

1.3. Importância do ciclo do azoto e do seu estudo

O ciclo do azoto desempenha um papel importante na manutenção do equilíbrio da biosfera. Tem sido alvo de investigações desde o séc. XIX e os conhecimentos obtidos têm tido diversos interesses, desde a rentabilização das produções agrícolas até à compreensão e remediação de diversos problemas ambientais, como a poluição hídrica, a destruição da camada de ozono e o aquecimento global.

O azoto é o principal componente da atmosfera terrestre e é extremamente importante para os seres vivos. Enquanto que nos ciclos do oxigénio, carbono e hidrogénio intervêm microrganismos, plantas e animais, o ciclo do azoto está largamente dependente das actividades metabólicas de microrganismos. Apesar da possibilidade de fixação química de azoto para a produção de fertilizantes, a capacidade de fixação de azoto atmosférico para a assimilação em biomassa está restrita quase exclusivamente a um número limitado de microrganismos. São processos microbianos únicos que definem o ciclo do azoto e afectam directamente a disponibilidade dos diversos compostos azotados nos ecossistemas. Os microrganismos intervêm em todos os processos, permitindo a reciclagem do azoto no ambiente. Daí, o interesse no estudo das actividades desenvolvidas por tais microrganismos, dada a importância destes processos na manutenção da qualidade de vida no nosso planeta.

Ao longo dos anos as actividades humanas têm vindo a interferir com o ciclo do azoto. Uma vez que os compostos azotados são essenciais para os seres vivos e a sua disponibilidade é fundamental para a organização e funcionamento dos ecossistemas, o impacto humano representa um sério perigo. As actividades humanas são responsáveis pelo aumento global do azoto e também pela crescente mobilidade dos compostos azotados no solo e na água, originando em larga escala, consequências ambientais sérias.

Torna-se necessário sensibilizar cada vez mais a sociedade para a necessidade de um desenvolvimento sustentável, em equilíbrio com os ecossistemas. A escola deve participar activamente nesta necessidade, criando hábitos ambientais saudáveis que passam obrigatoriamente pela compreensão da importância do ciclo do azoto e dos microrganismos a ele associados. Os alunos devem compreender a intensa actividade dos ecossistemas, onde os seres nascem e morrem continuamente, onde os fluxos de energia e os ciclos da matéria ocorrem ininterruptamente e vários fenómenos e processos contribuem para o seu equilíbrio dinâmico, do qual transparece uma imutabilidade apenas aparente.

1.4. Enquadramento educativo do tema nas orientações curriculares do Ensino Básico (3º Ciclo) e do Ensino Secundário

A análise da estrutura curricular do Ensino Básico (3º Ciclo) e do Ensino Secundário e respectivos programas permite constatar que a temática do ciclo do azoto pode ser abordada nas disciplinas de Ciências Físicas e Naturais (3º Ciclo - Ensino Básico), Ecologia (10º ano - Ensino Secundário) e Biologia (12º ano - Ensino Secundário).

A área disciplinar de Ciências Físicas e Naturais, através dos conteúdos científicos que explora, incide em diversos campos do saber. Apela para o desenvolvimento de várias competências, sugerindo ambientes de aprendizagem diversos e pretende contribuir para o desenvolvimento da literacia científica dos alunos. O Currículo Nacional do Ensino Básico tem subjacente a ideia estruturante de que *Viver melhor no planeta Terra pressupõe uma intervenção humana crítica e reflectida, visando um desenvolvimento sustentável que, tendo em consideração a interacção ciência, tecnologia, sociedade e ambiente, se fundamente em opções de ordem social e ética e em conhecimento científico esclarecido sobre a dinâmica das relações sistémicas que caracterizam o mundo natural e sobre a influência dessas relações na saúde individual e comunitária* (Normas do Ministério da Educação, 2001). No fundo, pretende-se alargar os horizontes da aprendizagem, proporcionando aos alunos não só o acesso aos produtos da Ciência mas também aos seus processos, através da compreensão das potencialidades e limites da Ciência e das suas aplicações tecnológicas na Sociedade. Além disso, pretende-se uma tomada de consciência quanto ao significado científico, tecnológico e social da intervenção humana na Terra, o que poderá constituir uma dimensão importante em termos de uma desejável educação para a cidadania.

De acordo com as orientações curriculares desta área disciplinar, conclui-se que o investimento no estudo do ciclo do azoto pode efectuar-se ao nível dos temas organizadores *Sustentabilidade na Terra* e *Viver melhor na Terra*.

No tema *Sustentabilidade na Terra*, os alunos devem tomar consciência da importância de actuar ao nível do sistema Terra, de forma a não provocar desequilíbrios, contribuindo para uma gestão regrada dos recursos existentes. O ciclo do azoto enquadra-se no sub-tema *Ecossistemas (Interacções seres vivos-ambiente/Fluxo de energia e ciclo de matéria)*, podendo ser também focado nos sub-temas *Perturbações no equilíbrio dos ecossistemas* e *Gestão sustentável dos recursos*.

O tema *Viver melhor na Terra* visa a compreensão de que a qualidade de vida implica saúde e segurança numa perspectiva individual e colectiva. A biotecnologia, área relevante na sociedade científica e tecnológica em que vivemos, será um conhecimento essencial para a qualidade de vida. O ciclo do azoto ou qualquer das suas vertentes pode ser abordado como problemática na realização de projectos inseridos no sub-tema *Ciência e Tecnologia e qualidade de vida*.

O Ensino Secundário compromete-se com o aumento da qualidade das aprendizagens, no respeito pela pluralidade e equilíbrio dos seus fundamentos. Valoriza-se a aquisição de conhecimentos, o desenvolvimento das competências vocacionais, a capacidade de pensar cientificamente os problemas, a interiorização de uma cultura de participação e responsabilidade, a plena consciência das opções que potenciam a liberdade e o desenvolvimento dos alunos como indivíduos e como cidadãos. Deve proporcionar-se o desenvolvimento de projectos educativos e curriculares diversificados, de forma a encontrar soluções educativas ajustadas às aspirações e perfis de competências dos alunos (Normas do Ministério da Educação, 2003).

A disciplina de Ecologia insere-se na componente de formação científico-tecnológica do Curso Tecnológico de Ordenamento do Território e Ambiente. Ao longo do programa, verifica-se a preocupação de conduzir à consciencialização das consequências das acções do homem sobre o ambiente e o desenvolvimento de uma atitude crítica. Num contexto de rápidas mudanças económicas, sociais e culturais, em que a globalização é disso uma consequência, tem vindo a tornar-se cada vez mais premente a adopção de uma visão de desenvolvimento sustentável. Nesta perspectiva, pretende-se garantir que a satisfação das necessidades das gerações presentes não comprometam o futuro das gerações seguintes, desenvolvendo uma perspectiva ecológica promotora do equilíbrio natural.

De acordo com o programa da disciplina, conclui-se que a abordagem do ciclo do azoto pode efectuar-se ao nível da unidade didáctica *Estrutura e Funcionamento dos Ecossistemas*.

A disciplina de Biologia constitui uma das opções de formação específica do Curso Geral de Ciências Naturais. Considera-se que os propósitos da educação em Biologia devem ser dirigidos para a educação científica dos cidadãos. Importa que os jovens fiquem preparados para enfrentar com confiança as questões científico-tecnológicas que a sociedade lhes coloca, que sejam capazes de ponderar criticamente os argumentos em jogo, de modo a formularem juízos responsáveis e, assim, participarem nos processos de tomada de decisão. As finalidades do programa de Biologia do 12º ano decorrem das definidas para o próprio

ensino secundário, da adopção de referenciais de valor relativos a princípios orientadores do ensino das ciências e, também, do papel dos conhecimentos de Biologia no mundo actual.

De acordo com o programa da disciplina, conclui-se que a abordagem do ciclo do azoto pode efectuar-se ao nível da unidade didáctica *Preservar e Recuperar o Meio Ambiente*.

1.5. Objectivos

Com o presente trabalho pretendeu-se aprofundar os conhecimentos acerca das actividades desenvolvidas por microrganismos nos principais processos do ciclo do azoto, dando especial relevo ao processo de oxidação anaeróbia do amoníaco. Este processo apenas foi descoberto nos anos 90 e constitui assim uma recente área do conhecimento.

Face às questões ambientais que a sociedade enfrenta actualmente e à necessidade cada vez mais urgente de sensibilização para um desenvolvimento sustentável, considerou-se importante aprofundar os conhecimentos acerca das causas e consequências do impacto antropogénico no ciclo do azoto.

Pretendeu-se também detectar a presença de microrganismos do grupo dos Planctomycetes, onde se incluem os responsáveis pela oxidação anaeróbia do amoníaco, utilizando a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência, em amostras apropriadas, e ainda identificar microrganismos responsáveis por processos fundamentais do ciclo do azoto, nomeadamente a fixação de azoto atmosférico, a nitrificação e a desnitrificação.

Dado que este trabalho se insere no Mestrado em *Biologia para o Ensino*, procurou-se desenvolver formas de aplicação da pesquisa efectuada em processos de ensino-aprendizagem que permitam uma melhor compreensão do ciclo do azoto.

Deste modo, pretendeu-se realizar um trabalho numa área temática considerada de interesse para o ensino, aprofundando os conhecimentos e fazendo pesquisa científica, e usar esse estudo como proposta de ensino dentro das orientações curriculares em vigor.

2. O CICLO DO AZOTO

2. O CICLO DO AZOTO

O azoto molecular ou dinitrogénio (N_2) é o composto gasoso mais abundante na atmosfera terrestre, constituindo cerca de 80% da sua composição. Apesar de tal abundância, o azoto molecular é termodinamicamente muito estável, não sendo utilizado directamente pela grande maioria dos organismos como fonte de azoto. Apenas algumas espécies de procariotas possuem capacidade de fixar o azoto atmosférico. Os restantes seres vivos dependem da disponibilidade de formas combinadas deste elemento. O azoto é um constituinte essencial de proteínas, ácidos nucleicos e muitas coenzimas, de modo que as transformações cíclicas dos compostos azotados que definem o ciclo do azoto são de extrema importância. Os microrganismos realizam um papel primordial no ciclo do azoto, definido por processos microbianos únicos que afectam directamente a disponibilidade dos diversos compostos azotados nos ecossistemas.

Durante muitos anos foram considerados e estudados vários processos fundamentais do ciclo do azoto, tais como a fixação do azoto atmosférico, a amonificação, a nitrificação, a desnitrificação e as actividades desenvolvidas pelos microrganismos nesses processos. Porém, só recentemente foi descoberto e descrito um novo processo, designado por oxidação anaeróbia do amoníaco, bem como os microrganismos capazes de o realizar.

O azoto atmosférico pode ser fixado abioticamente por descargas luminosas ou eléctricas, por radiação ultravioleta, por combustão e pela produção industrial de fertilizantes azotados. Estes processos não biológicos possuem pouca representatividade na fixação total do azoto, pois cerca de 90% do azoto é fixado biologicamente. A fixação biológica do azoto atmosférico é realizada, tanto por bactérias que vivem livremente nos seus habitats, como por bactérias que estabelecem relações de simbiose com diversas plantas. Neste processo, o azoto atmosférico é reduzido a amoníaco o qual é então incorporado em compostos orgânicos.

A decomposição microbiana de compostos orgânicos azotados, resultantes do metabolismo animal, como a ureia e o ácido úrico, ou da morte dos seres vivos, resulta na libertação de amoníaco. Este processo designa-se amonificação. Parte deste amoníaco pode ser perdido por volatilização para a atmosfera ou pode, sob a forma de ião amónia (NH_4^+), ser assimilado por vários organismos. Em solos neutros e bem drenados, o amoníaco que não foi incorporado em compostos orgânicos pode ser oxidado a nitrato, processo designado nitrificação. A nitrificação é um processo aeróbio realizado por um grupo de bactérias, designadas bactérias nitrificantes, em duas etapas sucessivas, que são respectivamente, a oxidação do amoníaco a nitrito e a oxidação do nitrito a nitrato.

Algun nitrato produzido por nitrificação, por não ser adsorvido pelas partículas do solo, pode ser rapidamente removido, no entanto, parte deste nitrato é assimilado por plantas, fungos e muitas bactérias. Neste processo, designado redução assimilatória do nitrato, o nitrato é reduzido a amoníaco e usado para o crescimento.

Em condições de anaerobiose, certas bactérias são capazes de usar o nitrato como aceitador final de electrões. Neste processo de redução desassimilatória do nitrato, o nitrato pode ser reduzido a azoto gasoso (N_2) e/ou óxidos de azoto gasosos (NO , N_2O), processo designado desnitrificação, que ocorre frequentemente em solos alagados, onde a difusão de oxigénio é limitada. Porém, algumas bactérias anaeróbias facultativas apenas reduzem o nitrato a nitrito, o qual pode então ser convertido em amoníaco por outros procariotas. Este processo designa-se amonificação do nitrito.

Recentemente, um novo processo foi descoberto e designado por oxidação anaeróbia do amoníaco (*Anaerobic Ammonium Oxidation* – “anammox”). Neste processo, o amoníaco é oxidado a azoto molecular, sendo o nitrito o aceitador de electrões.

São estes processos microbianos únicos que definem o ciclo do azoto e que vão ser em seguida desenvolvidos com mais pormenor.

2.1. Fixação do azoto atmosférico

A fixação biológica do azoto atmosférico consiste na redução de azoto molecular (N_2) a amoníaco (NH_3), o qual é convertido numa forma orgânica. Este processo é realizado tanto por bactérias que vivem livremente nos seus habitats, como por bactérias que estabelecem relações de simbiose com diversas plantas.

As bactérias fixadoras de azoto de vida livre constituem um grupo diversificado que inclui anaeróbios obrigatórios (*Clostridium spp*, *Desulfovibrio spp* e *Pseudomonas aotogenis*), anaeróbios facultativos (*Bacillus asterosporus*, *Bacillus azophila*, *Enterobacter* e *Klebsiella*), aeróbios (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas insolita*, *Aerobacter aerogenes*, *Derxia gummosa* e *Beijerinckia*) e fototróficos (*Chromatium vinosum*, *Chlorobium thiosulfatophilum*, *Rhodomicrobium vannielii* e *Rhodospirillum rubrum*). No entanto, estas bactérias contribuem apenas para uma pequena porção do azoto fixado anualmente (Lim, 1998). Algumas destas bactérias como *Azotobacter*, *Azomonas* e *Derxia* são

comuns em solos e águas com pH neutro ou alcalino, em regiões temperadas, enquanto que outras como *Beijerinckia* são ácido-tolerantes e são consideradas as bactérias fixadoras de azoto de vida livre predominantes no solo (Atlas, 1997).

A fixação do azoto atmosférico também pode ser realizada por bactérias que estabelecem relações de simbiose com plantas leguminosas. É o caso de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. A fixação simbiótica do azoto realiza-se a taxas duas a três vezes superiores às taxas de fixação registadas por bactérias de vida livre. A relação de simbiose estabelecida entre estas bactérias e as plantas leguminosas é muito importante para a manutenção da fertilidade dos solos. As bactérias penetram a raiz das plantas e induzem a formação de nódulos radiculares (Figura 2.1) aonde ocorre a fixação de azoto atmosférico (Atlas, 1997).



Figura 2.1: Raiz nodulada de *Trifolium subterraneum* (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

Cerca de 90% das plantas leguminosas apresentam capacidade de nodulação, no entanto, existe uma marcada especificidade entre as espécies de plantas leguminosas e as espécies bacterianas. Várias espécies de *Rhizobium* são capazes de estabelecer simbioses com legumes (Tabela 2.1). O grupo de espécies de *Rhizobium* com capacidade de infectar um grupo de legumes relacionados é designado grupo de inoculação cruzada. Esta especificidade é determinada por um conjunto de genes bacterianos, designados genes *nod*.

Tabela 2.1: Exemplos de diversas espécies de *Rhizobium* e respectivas plantas hospedeiras

Espécie de <i>Rhizobium</i>	Planta hospedeira
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>Pisum</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Vicia</i>
<i>Rhizobium phaseoli</i>	<i>Phaseolis vulgaris</i> , <i>P. multiflorus</i> , <i>P. angustifolius</i>
<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>Trifolium spp</i>
<i>Rhizobium lupini</i>	<i>Lupinus spp</i> , <i>Ornithopus sp</i>
<i>Rhizobium japonicum</i>	<i>Vigna sp</i>
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Melilotis spp</i> , <i>Medicago spp</i> , <i>Trigonella spp</i>

Outra associação simbiótica ocorre entre *Actinomycetes* do género *Frankia* e plantas actinorrizais como, por exemplo, *Alnus* (amieiro), *Casuarina* (pinheiro australiano), *Elaeagnus* (oliveira outonal), *Ceanothus* (lilás da Califórnia) e *Myrica* (loureiro), sendo actualmente conhecidas mais de 180 espécies. As bactérias do género *Frankia* são bactérias filamentosas, de Gram-positivo, constituídas por hifas septadas com 0,5-2,0 µm de diâmetro e que produzem numerosos esporos. Determinadas porções das hifas diferenciam-se em células especializadas na fixação de azoto que são denominadas vesículas. As bactérias invadem o hospedeiro através dos pêlos radiculares, induzindo a formação de nódulos radiculares, designados actinorrizas (Figura 2.2). Estas bactérias também possuem capacidade de formar vesículas e fixar azoto quando vivem livremente no solo.

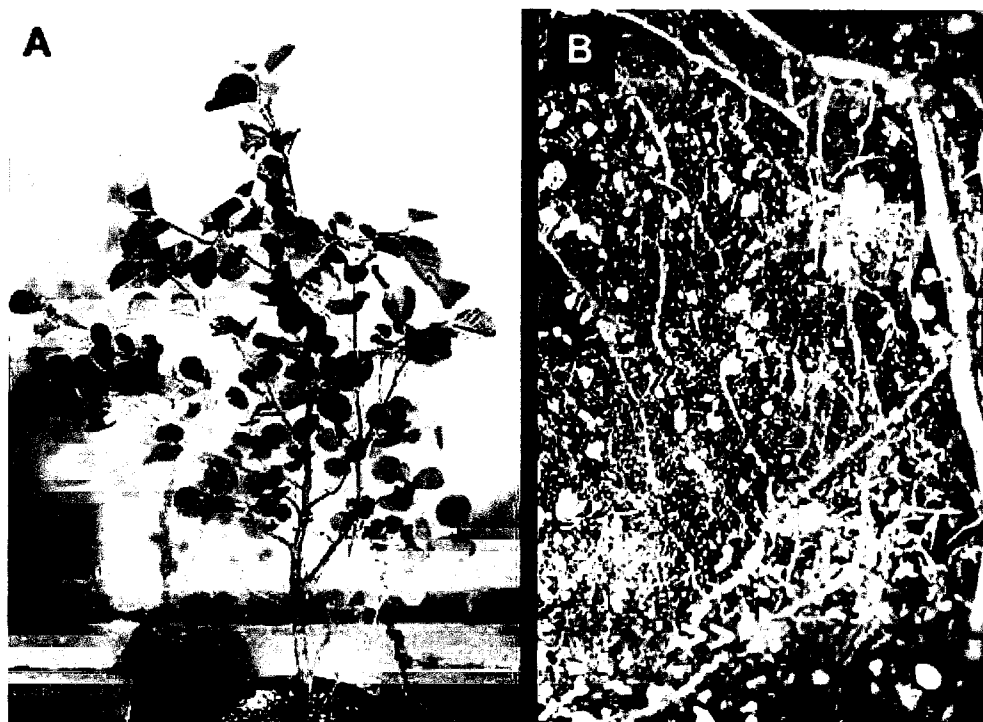
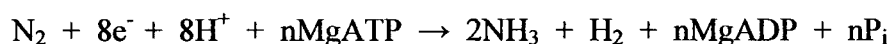


Figura 2.2: Um exemplar jovem de amieiro (*Alnus glutinosa*) (A). Parte do sistema radicular evidenciando actinorrizas (B) (adaptado de Stanier *et al*, 1987).

Uma outra simbiose é a que ocorre entre a cianobactéria *Anabaena azollae* e o feto de água *Azolla*. Esta associação simbiótica tem sido usada, há vários séculos, para o enriquecimento de solos de cultivo do arroz, com o objectivo de aumentar o teor em compostos azotados disponíveis para assimilação por estas plantas. *Anabaena* produz células especializadas, designadas heterocistos, aonde ocorre a fixação do azoto, a taxas de fixação cerca de dez vezes superiores às registadas por bactérias de vida livre. O feto desenvolve-se, utilizando o azoto fixado pela cianobactéria, e por morte dos componentes da simbiose ficam disponíveis no solo compostos azotados, que vão ser assimilados pelas plantas do arroz. A ocorrência deste processo em cada estação de cultivo permite elevados níveis de produção sem necessidade da aplicação de fertilizantes azotados (Lim, 1998).

2.1.1. Sistema enzimático nitrogenase

A fixação biológica do azoto atmosférico é catalisada pelo sistema enzimático nitrogenase, de acordo com a seguinte reacção



O sistema nitrogenase é constituído por duas metaloproteínas, designadas dinitrogenase ou proteína MoFe (220.000 daltons) e dinitrogenase redutase ou proteína Fe (64.000 daltons). A dinitrogenase é constituída por dois polipeptídeos distintos, $\alpha_2\beta_2$ (duas cadeias α e duas cadeias β) e contém dois grupos metálicos activos, designados grupo P e cofactor ferro-molibdénio (coFeMo). O grupo P é constituído por 8 átomos de ferro e 7-8 átomos de enxofre ($\text{Fe}_8\text{S}_{7-8}$). O cofactor ferro-molibdénio (coFeMo) é constituído por 7 átomos de ferro, 9 átomos de enxofre, um átomo de molibdénio e uma molécula de homocitrato ($\text{Fe}_7\text{S}_9\text{Mo}$ -homocitrato) (Figura 2.3). O grupo P funciona como aceitador intermediário de electrões que são transferidos para o grupo coFeMo, o qual funciona como o local de redução do azoto molecular.

A dinitrogenase redutase é constituída pelo polipeptídeo γ_2 (duas cadeias γ). Cada cadeia polipeptídica possui dois átomos de ferro e dois átomos de enxofre que se organizam num grupo designado Fe_4S_4 (Figura 2.3). A principal função da dinitrogenase redutase é a

hidrólise de Mg-ATP e a transferência de electrões do grupo Fe_4S_4 para o grupo P da dinitrogenase.

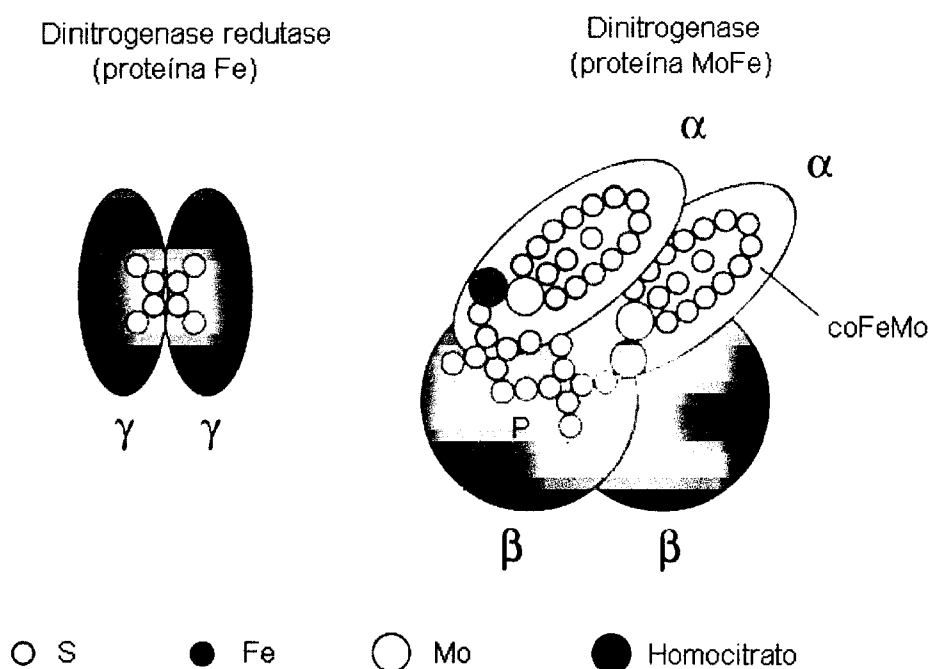


Figura 2.3: Representação esquemática do sistema enzimático nitrogenase (adaptado de Atlas, 1997).

A redução de azoto atmosférico exige, além de uma grande quantidade de ATP (devido aos vários ciclos de transferência de electrões para a redução da ligação tripla da molécula N_2), Mg^{2+} (para a hidrólise de ATP) e um agente redutor, que geralmente é a ferredoxina. Os electrões são transferidos da ferredoxina para o grupo Fe_4S_4 da dinitrogenase redutase. Esta transferência é seguida de hidrólise de ATP e transferência de electrões para a dinitrogenase. Por cada electrão transferido são hidrolisadas duas moléculas de Mg-ATP. Estas moléculas não sofrem hidrólise enquanto não se formar o sistema enzimático nitrogenase, ou seja, enquanto não houver ligação da dinitrogenase redutase com a dinitrogenase. Finalmente, os electrões são transferidos para o azoto molecular (N_2) que é reduzido a amoníaco (NH_3) (Figura 2.4). Este processo exige uma quantidade considerável de ATP (Lim, 1998).

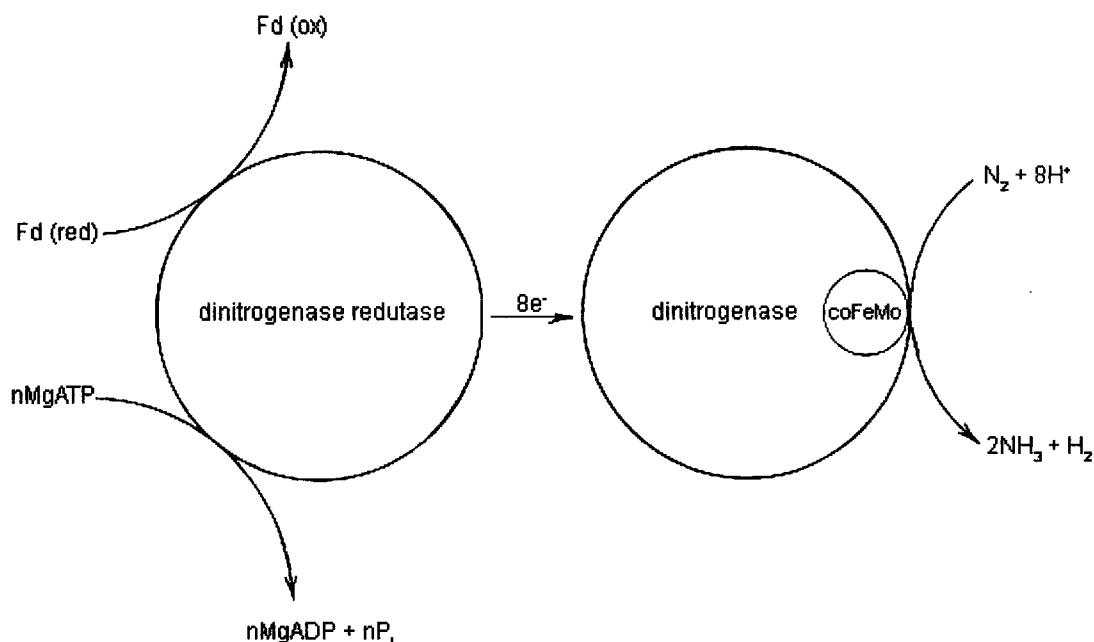


Figura 2.4: Diagrama do processo de redução de azoto atmosférico pelo sistema enzimático nitrogenase. Os electrões são transferidos da ferredoxina reduzida [Fd (red)] para a dinitrogenase redutase. Esta transferência é seguida de hidrólise de ATP e transferência dos electrões para a dinitrogenase (adaptado de Stanier *et al*, 1987).

O sistema nitrogenase é extremamente sensível ao oxigénio, sendo irreversivelmente inativado mesmo por exposição a baixas concentrações. Embora ambas as metaloproteínas possam ser inativadas pelo oxigénio, a dinitrogenase redutase é bastante mais sensível. Os mecanismos de protecção do sistema nitrogenase são diversos e específicos e variam de microrganismo para microrganismo. Frequentemente, mais do que um mecanismo pode ocorrer num mesmo microrganismo mas cada um deles depende das condições ambientais durante a fixação do azoto atmosférico. Alguns desses mecanismos de protecção do sistema nitrogenase podem resumir-se em:

i. Desenvolvimento em ambientes anaeróbios

Bactérias anaeróbias facultativas, como *Klebsiella* e *Enterobacter*, e anaeróbias estritas, como *Clostridium*, geralmente fixam o azoto em anaerobiose, mantendo assim activo o sistema nitrogenase.

ii. Barreiras físicas de protecção

Derxia gummosa, bactéria aeróbia fixadora do azoto que cresce em solos tropicais da Ásia, África e América do Sul, produz uma cápsula polissacarídica que restringe o fluxo de oxigénio para o interior da célula. *Azotobacter vinelandii* produz uma

cápsula de alginato, cuja síntese é condicionada pela concentração de oxigénio. A estrutura desta cápsula varia significativamente conforme as condições ambientais, tornando-se mais compacta de modo a formar uma barreira efectiva para impedir a difusão de oxigénio. Em *Anabaena* o sistema nitrogenase localiza-se em células especializadas, denominadas heterocistos. A baixa concentração de oxigénio mantida nos heterocistos deve-se à presença de um invólucro, constituído por glicolípidos, lipopolissacarídeos e polissacarídeos, que retarda a difusão do oxigénio para o interior da célula.

iii. Eliminação metabólica do oxigénio

Bactérias aeróbias e algumas bactérias anaeróbias facultativas diminuem os níveis de oxigénio, aumentando a actividade respiratória. *Azotobacter* possui uma elevada taxa respiratória, removendo assim rapidamente o oxigénio, de modo a impedir a inactivação do sistema nitrogenase e produzindo uma grande quantidade de ATP.

A presença de hidrogenases permite a oxidação do H_2 produzido durante a fixação de azoto, consumindo assim oxigénio e produzindo ATP.

iv. Protecção conformacional do sistema nitrogenase

Azotobacter vinelandii e *Azotobacter chroococcum* sintetizam uma proteína, designada Shethna ou FeSII. Esta proteína é um homodímero e contém dois grupos 2Fe-2S. A formação de um complexo entre o sistema nitrogenase e esta proteína evita a inactivação irreversível do sistema nitrogenase. Presume-se que o grupo 2Fe-2S e resíduos de lisina da proteína Shethna estejam implicados na interacção electrostática entre esta proteína e o sistema nitrogenase. A concentração elevada de oxigénio promove uma alteração conformacional da proteína Shethna, facilitando a sua ligação com o sistema nitrogenase e a formação de um complexo inactivo. Quando a concentração de oxigénio diminui, este complexo dissocia-se e o sistema nitrogenase recupera a actividade.

v. Síntese *de novo* do sistema nitrogenase, alterando o equilíbrio entre a inactivação e a síntese

A síntese *de novo* do sistema nitrogenase foi descrita em cianobactérias unicelulares e filamentosas e permite manter um equilíbrio entre a sua síntese e a inactivação pelo oxigénio (Soto-Urzúa *et al*, 2002).

2.1.2. Desenvolvimento da simbiose *Rhizobium* – plantas leguminosas

A simbiose entre *Rhizobium* sp. e as respectivas plantas hospedeiras envolve interacções moleculares complexas. No solo, as bactérias são atraídas para a proximidade do sistema radicular da planta hospedeira por substâncias presentes no exsudado radicular, nomeadamente, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos e flavonóides. A ligação entre as bactérias e os pêlos radiculares envolve uma proteína específica de adesão, designada ricadesina, que está presente na superfície das células bacterianas, e lectinas e complexos de cálcio presentes na superfície dos pêlos radiculares. Os flavonóides vão induzir a expressão de genes de nodulação nas bactérias, designados genes *nod*. Os produtos de expressão destes genes são enzimas envolvidas na síntese de lipoligossacarídeos específicos, denominados factores Nod. Estes compostos são libertados pelas células bacterianas e vão provocar o enrolamento dos pêlos radiculares e consequentemente envolver as bactérias (Figura 2.5).

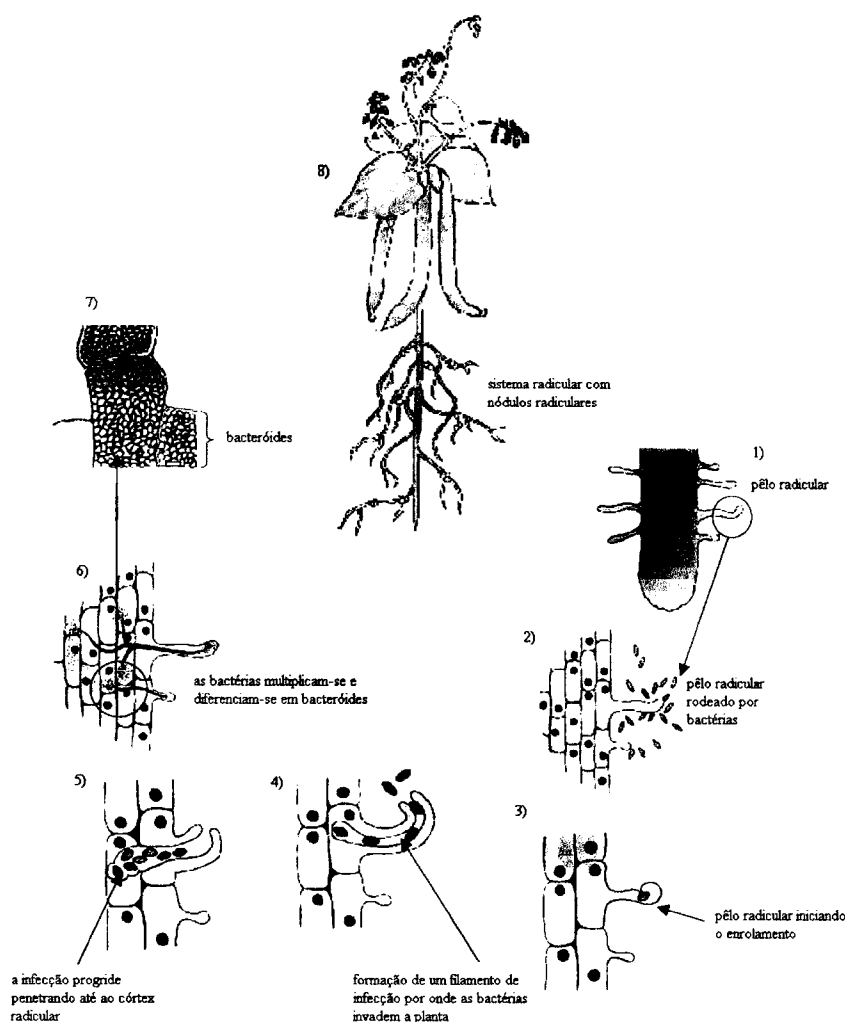


Figura 2.5: Representação esquemática do processo de formação de nódulos radiculares (adaptado de Pelczar *et al*, 1993).

A infecção da planta inicia-se com a penetração de um grupo de bactérias no pêlo radicular, em locais aonde a parede celular foi hidrolizada. Esta penetração é acompanhada da invaginação da membrana citoplasmática, formando-se assim um tubo que contém as bactérias e que é designado filamento de infecção (Figura 2.5). O filamento de infecção penetra o córtex radicular, atravessando as células corticais. Ao atravessar uma célula, o filamento de infecção ramifica-se e forma vesículas que contêm as bactérias. As paredes do filamento e das vesículas apresentam continuidade com a membrana citoplasmática da célula hospedeira. As bactérias são então libertadas no citoplasma, individualmente ou em pequenos grupos, sendo a membrana envolvente designada membrana peribacteróide.

O desenvolvimento do nódulo inicia-se quando o filamento de infecção atinge uma célula tetraplóide do córtex radicular. Esta célula e as células diplóides vizinhas são estimuladas a dividirem-se activamente, formando um tumor ou nódulo. As bactérias invadem apenas as células tetraplóides e o tecido diplóide não infectado vai constituir o córtex do nódulo. As bactérias dividem-se e diferenciam-se morfológica e fisiologicamente, originando formas irregulares, designadas bacteróides (Figuras 2.5 e 2.6) (Atlas, 1997).

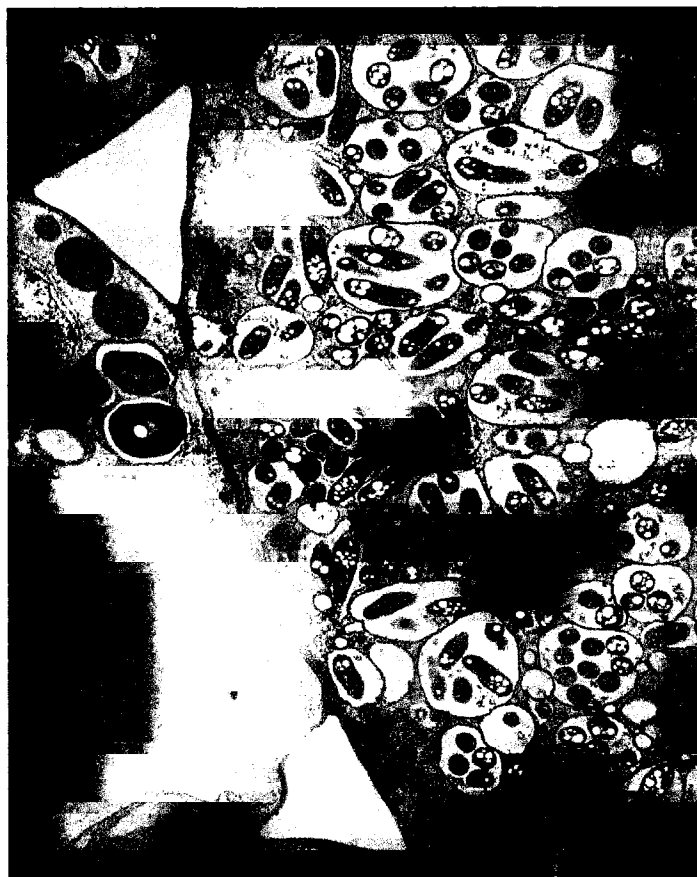


Figura 2.6: Bacteróides de *Bradyrhizobium japonicum* no interior de um nódulo radicular de soja (6000x) (adaptado de Atlas, 1997).

Os bacteróides não possuem capacidade de se dividirem, mas podem persistir metabolicamente activos por longos períodos. O crescimento e diferenciação dos bacteróides conduz ao desenvolvimento de formas fixadoras de azoto, designadas simbiosomas (Prescott *et al*, 2002). Componentes específicos dos nódulos, como o sistema enzimático nitrogenase e a leghemoglobina, proteína que protege este sistema enzimático relativamente ao oxigénio, são então sintetizados, completando o processo de nodulação (Stanier *et al*, 1987). A leghemoglobina é responsável pela coloração vermelha no interior dos nódulos e é sintetizada conjuntamente pela bactéria e pela planta hospedeira. O grupo heme é produzido nos simbiosomas e a globina é produzida pela planta. Quando o interior de um nódulo radicular apresenta uma coloração avermelhada isso significa que o nódulo está activo, pois esta coloração é indicadora da presença de leghemoglobina e consequentemente da capacidade de fixação do azoto atmosférico (Figura 2.7). O interior de nódulos jovens, se ainda não foi sintetizada a leghemoglobina, apresenta uma coloração branca acinzentada. Os nódulos envelhecidos e já inactivos apresentam o interior verde e acabam por se destacar do sistema radicular.

Na simbiose *Rhizobium* - plantas leguminosas, os mecanismos de protecção do sistema nitrogenase estão por um lado relacionados com a produção de leghemoglobina, que é responsável pelo fornecimento de O_2 aos simbiosomas de modo a manter activo o sistema nitrogenase, e por outro lado com os tecidos vegetais que funcionam como barreira física à difusão de O_2 . O acesso do oxigénio ao córtex interno do nódulo é restringido por uma camada de células com parede espessa e com poucos espaços intercelulares que constitui uma barreira de difusão. Por outro lado, as células infectadas do nódulo formam um tecido compacto, que reduz intensamente os níveis de O_2 (Soto-Urzúa *et al*, 2002).

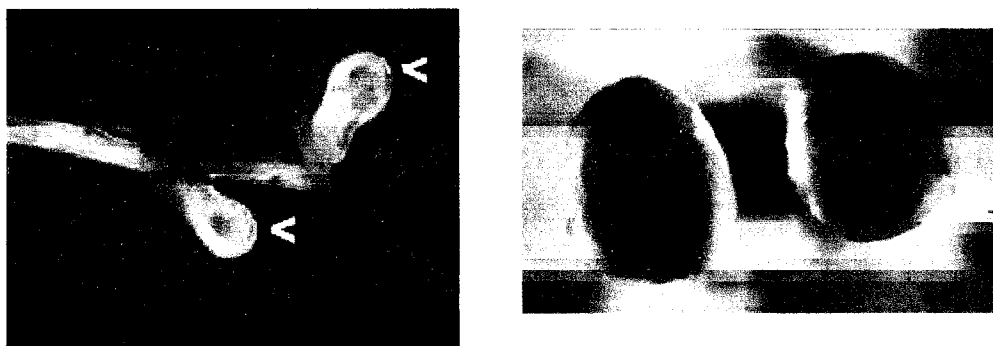


Figura 2.7: Nódulos radiculares de trevo (à esquerda) e de soja (à direita) evidenciando o interior rosado (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

O desenvolvimento da simbiose entre *Rhizobium* sp. e a planta leguminosa hospedeira tem sido intensamente estudado e sabe-se que envolve a expressão coordenada de diversos genes da bactéria e da planta. Os genes envolvidos na formação dos nódulos radiculares são colectivamente designados genes “*nodulin*”. Estes genes são essenciais para a infecção da raiz da planta e para a nodulação e dividem-se em duas classes. Uma classe inclui os genes responsáveis pela composição química da superfície da célula bacteriana, nomeadamente os genes responsáveis pela síntese de exopolissacarídeos (genes *exo*), lipopolissacarídeos (genes *lps*), polissacarídeos capsulares e β -1,2-glucanos (genes *ndv*). Os genes *exo* e os genes *lps* admite-se poderem determinar a especificidade da planta hospedeira. A outra classe de genes inclui os genes responsáveis pela nodulação (genes *nod*). Na maior parte das espécies de *Rhizobium* os genes *nod* localizam-se em plasmídeos, designados plasmídeos Sym, onde também se localizam os genes *nif* e os genes *fix*, que estão envolvidos na síntese do sistema nitrogenase. A maior parte dos genes *nod* apenas são induzidos na presença da planta, sendo necessária para a sua indução a excreção de flavonóides pela planta. Os genes *nod* codificam um conjunto de lipoligossacarídeos, designados factores Nod, que induzem várias respostas do sistema radicular da planta hospedeira. O gene *nodD* é o único gene *nod* expresso por *Rhizobium* no estado de simbiose ou de vida livre. A proteína NodD, resultante da expressão do gene *nodD*, em combinação com os flavonóides produzidos pela planta induz a expressão dos restantes genes *nod*.

A planta, como resultado da expressão dos genes *nod*, produz proteínas designadas nodulinas, que são responsáveis pelo desenvolvimento e fisiologia dos nódulos radiculares. Diferentes nodulinas são produzidas sequencialmente ao longo do processo de nodulação. Numa fase inicial, as nodulinas produzidas são responsáveis pela especificidade entre as bactérias e a planta hospedeira. Numa fase mais tardia, outras nodulinas estão envolvidas na síntese de proteínas específicas, tais como a leghemoglobina. Nodulinas como a uricase, a glutamina sintetase e a sacarose sintetase estão envolvidas na assimilação de azoto e de carbono, sendo muito importantes para o equilíbrio das trocas de nutrientes entre as bactérias e a planta (Atlas, 1997).

Apesar da maioria das plantas leguminosas formar nódulos fixadores de azoto nas suas raízes, algumas espécies desenvolvem este tipo de nódulos no caule (Figura 2.8). As leguminosas com nódulos caulinares ocorrem preferencialmente em regiões tropicais, onde os solos são deficientes em azoto, devido a lixiviação e intensa actividade biológica. Uma

associação deste tipo é a que corre entre *Sesbania rostrata* e *Azorhizobium caulinodans*. Esta planta existe em solos pantanosos ou sujeitos a inundações periódicas. Os nódulos formam-se geralmente na porção submersa do caule ou nas regiões imediatamente acima do nível da água. O processo de nodulação é semelhante ao que ocorre na formação de nódulos radiculares (Madigan *et al*, 1997).

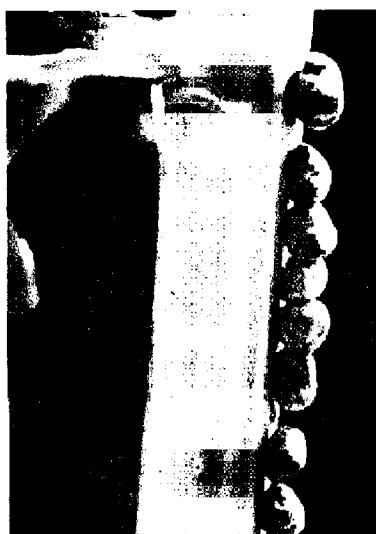


Figura 2.8: Nódulos caulinares em *Sesbania rostrata* (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

2.1.3. Fixação simbiótica do azoto atmosférico

A simbiose entre espécies de *Rhizobium* e as respectivas plantas hospedeiras é muito importante para os parceiros intervenientes, pois ambos beneficiam com esta associação.

Os bacteróides dependem completamente da planta para a obtenção de fontes de energia para a fixação de azoto atmosférico (N_2). A planta fornece aos bacteróides os compostos orgânicos necessários para a produção de ATP. Os principais compostos orgânicos transportados para os bacteróides são intermediários do ciclo do ácido cítrico, particularmente o succinato, o malato e o fumarato, que são usados como dadores de electrões para a produção de ATP (Figura 2.9).

Como resultado da fixação do azoto atmosférico (N_2) é produzido amoníaco (NH_3). Apesar dos bacteróides possuírem capacidade de assimilação do amoníaco em compostos orgânicos azotados, os níveis das enzimas assimilatórias são bastante baixos. Pelo contrário, estas enzimas estão presentes em níveis elevados no citoplasma das células vegetais. Assim, o amoníaco transportado do bacteróide para a planta é assimilado nas células vegetais como glutamina pelo sistema glutamina sintetase/glutamato sintetase. No entanto, substâncias como

alantoína, ácido alantóico, asparagina e 4-metilenoglutamina são também sintetizadas pela planta e transportadas para os tecidos (Madigan *et al*, 1997).

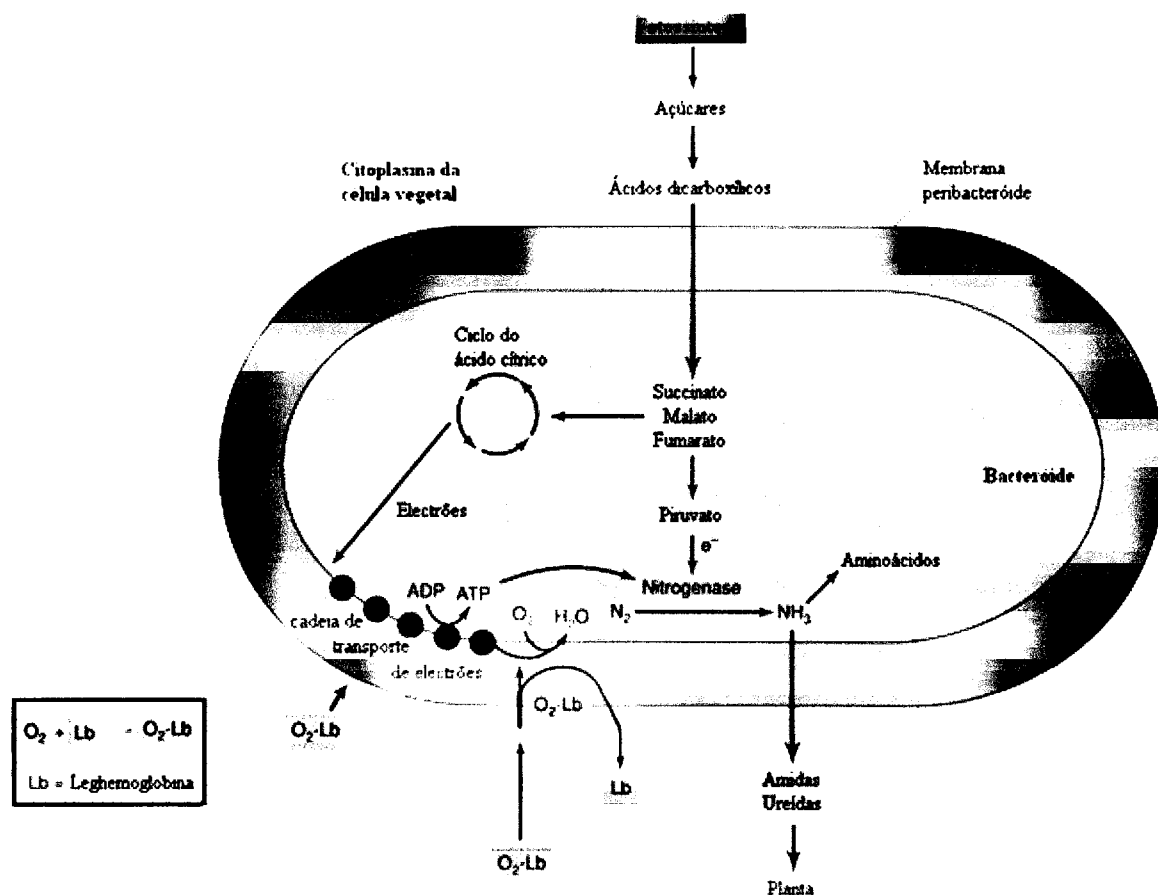


Figura 2.9: Diagrama das principais reacções metabólicas e trocas de nutrientes que ocorrem no bacteróide (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

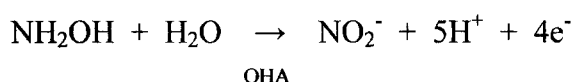
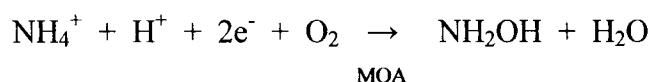
2.2. Amonificação

A decomposição microbiana de compostos orgânicos azotados, resultantes da morte dos seres vivos ou do metabolismo animal, como a ureia e o ácido úrico, resulta na libertação de amoníaco. Este processo é designado amonificação. A primeira fase deste processo é a hidrólise de proteínas e ácidos nucleicos. A proteólise é mediada por enzimas produzidas por muitos fungos e algumas bactérias como *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Bacillus*, libertando aminoácidos. Estes compostos são depois degradados por processos de respiração ou fermentação (Pelczar *et al*, 1993).

2.3. Nitrificação

Nos solos o amoníaco (NH_3), que não foi incorporado em compostos orgânicos por microrganismos e plantas ou que não é perdido por volatilização para a atmosfera, vai ser convertido em nitrato (NO_3^-) por bactérias, designadas bactérias nitrificantes. Este processo designa-se nitrificação.

A nitrificação realiza-se em duas etapas sucessivas que são respectivamente a oxidação do amoníaco (NH_3) a nitrito (NO_2^-) e a oxidação do nitrito (NO_2^-) a nitrato (NO_3^-). A oxidação de amoníaco a nitrito é mediada por duas enzimas, designadas respectivamente monoxigenase do amoníaco (MOA), que é uma enzima membranar, e oxidorredutase da hidroxilamina (OHA), que é uma enzima periplasmática. A monoxigenase do amoníaco catalisa a oxidação do amoníaco a hidroxilamina. A hidroxilamina é posteriormente convertida em nitrito numa reacção catalisada pela oxidorredutase da hidroxilamina:



Na reacção mediada pela monoxigenase do amoníaco são necessários dois electrões exógenos para a redução do oxigénio. Estes electrões resultam da oxidação da hidroxilamina e são fornecidos à monoxigenase do amoníaco a partir da oxidorredutase da hidroxilamina, via citocromo *c* e ubiquinona. Assim, por cada quatro electrões resultantes da oxidação de amoníaco a nitrito, apenas dois atingem a oxidase terminal (citocromo *aa*₃), libertando-se dois protões. Esta reacção estabelece uma força protão-motriz através da membrana e o ATP é produzido por quimiosmose (Figura 2.10). Durante esta etapa, ocorre um grande consumo de oxigénio (4,33 mg O_2 /mg NH_4^+ oxidado) (Madigan *et al*, 1997).

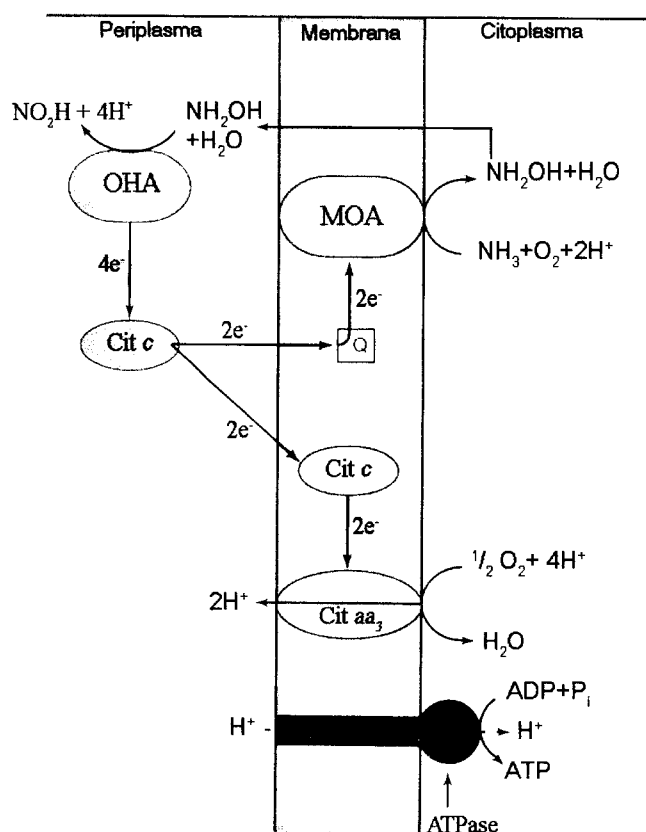
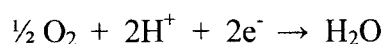
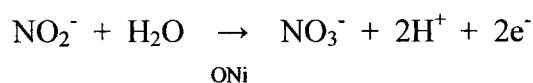


Figura 2.10: Representação esquemática do processo de oxidação do amoníaco. MOA - monoxigenase do amoníaco, OHA - oxidoreductase da hidroxilamina, Q - ubiquinona (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

A segunda etapa do processo de nitrificação é a oxidação de nitrito a nitrato. Esta reacção é catalisada pela enzima oxidase do nitrito (ONi):



Os electrões percorrem uma curta cadeia de transporte até à oxidase terminal. Os citocromos *c* e *a* estão presentes na cadeia de transporte de electrões destas bactérias. Por acção da citocromo *aa*₃ oxidase é estabelecida uma força próton-motriz, sendo o ATP produzido por quimiosmose (Figura 2.11) (Madigan *et al*, 1997).

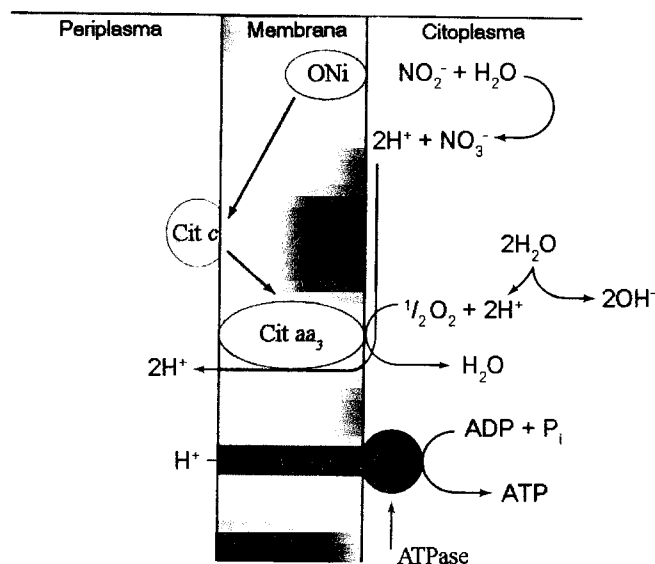


Figura 2.11: Representação esquemática do processo de oxidação do nitrito.

ONi - oxidase do nitrito (adaptado de Madigan *et al*, 1997).

No processo de nitrificação, o amoníaco e o nitrito são usados como dadores de electrões para a produção de ATP. No entanto, a oxidação destes compostos azotados inorgânicos produz quantidades relativamente baixas de ATP, sendo, portanto, necessárias grandes quantidades destes compostos para ocorrer o crescimento bacteriano. Consequentemente, a magnitude do processo de nitrificação é tipicamente muito elevada, enquanto que a taxa de crescimento bacteriano é geralmente baixa (Atlas, 1997). Esta limitação da quantidade de ATP produzida relaciona-se com os potenciais de redução dos dadores de electrões envolvidos no processo. O potencial do par $\text{NH}_2\text{OH}/\text{NH}_3$ é aproximadamente 0 v, enquanto que o potencial do par $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ é muito elevado, cerca de +0,43 v. Estes valores relativamente elevados implicam a entrada de electrões na cadeia de transporte, nas fases finais do processo, o que limita a quantidade de ATP produzida por cada par de electrões introduzido (Madigan *et al*, 1997).

Alguns dos factores ambientais que controlam a nitrificação e o crescimento bacteriano são o oxigénio, a temperatura e o pH. A nitrificação é um processo aeróbio, sendo inibida em anaerobiose. As bactérias nitrificantes crescem a temperaturas moderadas, entre 20° e 30°C, e a valores de pH entre 7,5 e 8,2.

A nitrificação é sem dúvida um processo com muita importância ecológica no solo, pois o nitrato é a forma azotada preferencialmente utilizada pelas plantas para a assimilação de azoto. O enriquecimento do solo em nitratos por este processo poderia reduzir a

necessidade de utilização de fertilizantes comerciais. No entanto, o nitrato possui carga negativa e não se liga às partículas do solo carregadas negativamente, sendo facilmente lixiviado, ao contrário dos íons amónia que possuem carga positiva e são retidos pelas partículas do solo (Figura 2.12).

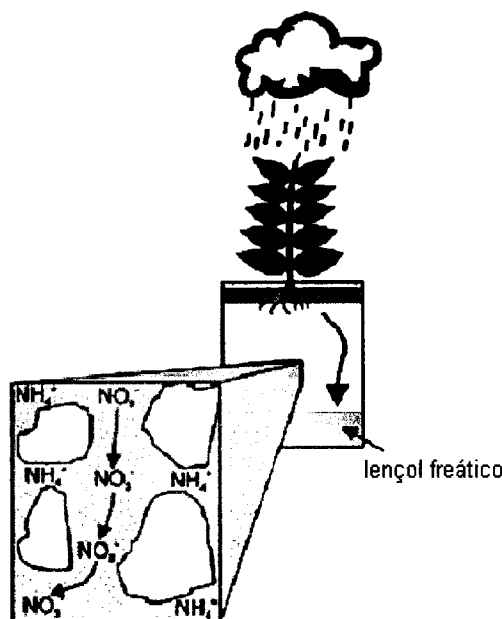


Figura 2.12: Representação esquemática do processo de lixiviação do íon nitrato (NO_3^-). Os íons amónia (NH_4^+) com carga positiva ligam-se às partículas do solo carregadas negativamente, sendo retidos. Os íons nitrato com carga negativa não se ligam às partículas do solo e são facilmente lixiviados (adaptado de Atlas, 1997).

Assim, a transferência de formas azotadas inorgânicas, como nitratos e nitritos, da superfície dos solos para reservatórios freáticos subterrâneos apresenta como consequências, por um lado, uma redução da produtividade (devido ao empobrecimento do solo em compostos azotados necessários para o crescimento das plantas) e, por outro lado, a ocorrência de problemas de Saúde Pública (devido ao enriquecimento dos lençóis freáticos em nitritos e nitratos). A ingestão de água com elevados níveis de nitritos e nitratos apresenta sérios riscos para o Homem. Os nitritos podem reagir com compostos aminados, originando nitrosaminas altamente carcinogénicas. Os nitratos podem ser reduzidos a nitritos no tubo digestivo, particularmente no estômago. O estômago de um adulto normal apresenta um pH ácido, o que minimiza a probabilidade de ocorrer tal redução. No entanto, o estômago dos bebés apresenta pH menos ácido, o que promove a redução de nitrato a nitrito. Os nitritos são absorvidos no intestino, provocando a conversão de hemoglobina em metemoglobina, ineficaz no transporte de oxigénio. Elevados níveis de metemoglobina provocam metemoglobinemia ou síndrome do bebé azul, que pode causar a morte (Atlas, 1997).

2.3.1. Bactérias Nitrificantes

Em 1890, Winogradsky conseguiu o isolamento de bactérias responsáveis pelo processo de nitrificação, comprovando que se trata de um processo microbiano. O isolamento destas bactérias revelou-se bastante difícil, principalmente pela abundância no solo de outros procariotas com taxas de crescimento mais elevadas. As bactérias nitrificantes são um grupo de bactérias de Gram-negativo, quimiolitotróficas obrigatórias que estão presentes nos solos e em habitats aquáticos e são, de ponto de vista ecológico, consideradas de grande importância.

As bactérias nitrificantes pertencem à família *Nitrobacteriaceae* e incluem dois grupos distintos, responsáveis pelas diferentes etapas do processo de nitrificação: *Nitrosomonas*, *Nitrosolobus*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* e *Nitrosovibrio* que realizam a oxidação de amoníaco a nitrito e *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* e *Nitrospira* que realizam a oxidação de nitrito a nitrato.

As bactérias envolvidas na oxidação do amoníaco a nitrito apresentam morfologia variada (esférica, elipsóide, em bastonete, espiralada ou lobular) e são móveis (Tabela 2.2). Todas as espécies são aeróbias e, de um modo geral, a temperatura ótima de crescimento é de 30°C e o pH ótimo situa-se no intervalo 7,5-8,0. Estas bactérias distribuem-se por uma grande variedade de solos, oceanos, rios, lagos e sistemas de tratamento de águas residuais (Atlas, 1997; Madigan *et al*, 1997).

Tabela 2.2: Características dos vários géneros de bactérias responsáveis pela oxidação do amoníaco a nitrito.

Características	<i>Nitrosomonas</i>	<i>Nitrosococcus</i>	<i>Nitrosolobus</i>	<i>Nitrospira</i>	<i>Nitrosovibrio</i>
Morfologia	Em bastonete	Esférica a elipsóide	Lobular	Fortemente espiralada	Em bastonete ligeiramente encurvado
Dimensões (µm)	0,7-1,5 x 1,0-2,4	1,5-1,8 x 1,7-2,5	1,0-1,5 x 1,0-2,5	0,3-0,8 x 1,0-8,0	0,3-0,4 x 1,1-3,0
Mobilidade	1 ou 2 flagelos polares	1 ou mais flagelos sub-polares	Flagelos peritricos	1 a 6 flagelos peritricos	1 flagelo polar ou subpolar
Organização das membranas intracitoplasmáticas	Sistema membranar periférico	Membranas periféricas ou vesículas	Células compartimentadas	—	Invaginações
Conteúdo GC do DNA (mol %)	45 - 53	49 - 50	54	54	54

As bactérias responsáveis pela oxidação do nitrito a nitrato apresentam forma esférica, em bastonete ou espiralada, podendo apresentar ou não mobilidade (Tabela 2.3). A temperatura óptima de crescimento é de 28°C e o intervalo de pH adequado ao crescimento é de 5,8-8,5, sendo o valor óptimo entre 7,6-7,8. Encontram-se distribuídas nos solos, habitats de água doce, oceanos, pântanos, sistemas de tratamento de águas residuais, monumentos históricos e rochas (Atlas, 1997; Madigan *et al*, 1997).

Tabela 2.3: Características dos vários géneros de bactérias responsáveis pela oxidação do nitrito a nitrato.

Características	<i>Nitrobacter</i>	<i>Nitrococcus</i>	<i>Nitrospina</i>	<i>Nitrospira</i>
Morfologia	Bastonetes curtos	Esférica	Bastonete longo	Ligeiramente espiralada
Dimensões (µm)	0,5-0,8 x 1,0-2,0	1,5	0,3-0,4 x 1,7-6,6	0,3-0,4 x 0,8-1,0
Mobilidade	1 flagelo polar	1 ou 2 flagelos sub-polares	—	—
Organização das membranas intracitoplasmáticas	Vesículas achatadas periféricas	Túbulos em arranjo aleatório	—	—
Conteúdo GC do DNA (mol %)	59 – 62	61	58	50

2.4. Redução assimilatória e desassimilatória do nitrato. Desnitrificação.

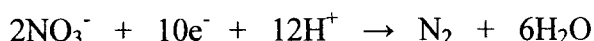
O nitrato produzido por nitrificação constitui a principal fonte de azoto disponível para assimilação pelas plantas, fungos e bactérias. Nas células, o nitrato é reduzido a amoníaco, o qual é então assimilado. Este processo designa-se redução assimilatória do nitrato. A magnitude deste processo é proporcional à necessidade de azoto para o crescimento, pois o amoníaco não é excretado.

Algumas bactérias anaeróbias facultativas podem utilizar o nitrato, em vez do oxigénio, como aceitador final de electrões. Neste processo desassimilatório, o nitrato é reduzido como resultado de respiração anaeróbia (respiração do nitrato). Certas bactérias,

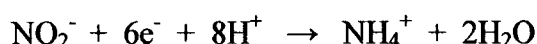
como *Escherichia coli*, apenas são capazes de reduzir o nitrato a nitrito, de acordo com a seguinte reacção:



Mas, outras bactérias, como certas espécies de *Pseudomonas*, *Pasteurella*, *Moraxella*, *Spirillum*, *Thiobacillus* e *Bacillus* reduzem o nitrato a óxido nitroso (N_2O) e N_2 . Este processo é designado desnitrificação:



Neste processo, também pode ocorrer acumulação de nitrito. Do ponto de vista ambiental, a acumulação de nitrito é preocupante por poder contribuir para a formação de nitrosaminas carcinogénicas. Porém, algumas bactérias, especialmente do género *Clostridium*, podem reduzir o nitrito a amoníaco, numa via de redução desassimilatória, sendo este processo designado amonificação do nitrito. Neste processo, o nitrito é reduzido a amoníaco, de acordo com a seguinte reacção:



Esta reacção é catalizada pela redutase do nitrito. Trata-se de uma enzima solúvel que contém cinco grupos heme *c*. Esta reacção é considerada um mecanismo de protecção, pois o nitrito para valores de pH inferiores a 6,0 pode ser convertido em ácido nitroso que possui efeitos mutagénicos (Madigan *et al*, 1997).

A desnitrificação é um processo que envolve uma sequência de reacções em que participam quatro enzimas, denominadas redutase do nitrato (RN), redutase do nitrito (RNi), redutase do óxido nítrico (RNO) e redutase do óxido nitroso (RN₂O). A pseudoazurina (PAZ) é uma pequena molécula com cobre que funciona como dador de electrões para as redutase do nitrito e do óxido nitroso (Figura 2.13). A actividade destas enzimas é severamente inibida na presença de oxigénio, daí a desnitrificação ser um processo anaeróbio.

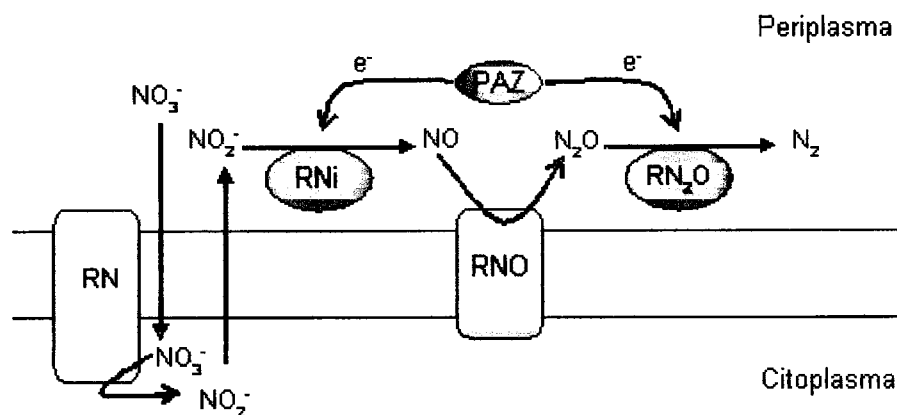


Figura 2.13: Representação esquemática do processo de desnitrificação. RN - redutase do nitrato, RNi - redutase do nitrito, RNO - redutase do óxido nítrico, RN₂O - redutase do óxido nitroso, PAZ - pseudoazurina.

O primeiro passo da desnitrificação é a redução de nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-), catalizada pela redutase do nitrato. Foram identificados dois tipos desta enzima, uma membranar, com três sub-unidades (120, 60 e 20 kDa), que utiliza a ubihidroquinona no transporte de electrões e cujo centro activo está orientado para o citoplasma, e uma enzima solúvel que se localiza no periplasma e é formada por duas sub-unidades (94 e 19 kDa). Assume-se que molibdénio funcione como centro activo na redução do nitrato a nitrito.

O segundo passo é a redução do nitrito (NO_2^-) a óxido nítrico (NO), catalizada pela redutase do nitrito. São conhecidos dois tipos desta enzima, uma que é um trímero e contém cobre como cofactor (dois átomos de cobre por monómero) e outra que é um dímero e contém um grupo heme *c* e um grupo heme *d_I* por cada monómero (Figura 2.14). Admite-se que a enzima com cobre seja também capaz da redução de óxido nítrico (NO) a óxido nitroso (N_2O).



Figura 2.14: Estrutura tridimensional do trímero da redutase do nitrito isolado de *Alcaligenes faecalis*. Os átomos de cobre estão representados como esferas verdes.

A redução de óxido nítrico (NO) a óxido nitroso (N₂O) é catalizada pela redutase do óxido nítrico, localizada na membrana citoplasmática. Esta enzima é constituída por uma sub-unidade de 16 kDa que possui um grupo heme *c* e por outra de 53 kDa que possui um grupo heme *b*. A última etapa da desnitrificação é a redução de óxido nitroso (N₂O) a azoto molecular (N₂). Esta reacção é catalizada pela redutase do óxido nitroso, localizada no periplasma. Esta enzima contém oito átomos de cobre distribuídos em dois monómeros de aproximadamente 70 kDa cada (Cervantes-Carrillo *et al*, 2000).

A maioria das bactérias desnitrificantes são anaeróbias facultativas e heterotróficas. Os géneros bacterianos que incluem estirpes desnitrificantes são *Achromobacter*, *Actinomyces*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Aquaspirillum*, *Arthobacter*, *Bacillus*, *Branhamella*, *Campylobacter*, *Cellulomonas*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Chromobacterium*, *Cytophaga*, *Erwinia*, *Eubacterium*, *Flavobacterium*, *Geodermatophilus*, *Gluconobacter*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Hyphomicrobium*, *Kingella*, *Klebsiella*, *Leptothrix*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Neisseria*, *Nocardia*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Peptococcus*, *Photobacterium*, *Propionibacterium*, *Proteus*, *Rhizobium*, *Rhodobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Spirillum*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Thermothrix*, *Thiobacillus*, *Thiomicrospira* e *Vibrio* (Stanier *et al*, 1987; Drysdale *et al*, 1999).

As condições ambientais podem realizar um papel importante no processo de desnitrificação. Por exemplo, grandes quantidades de matéria orgânica, temperaturas elevadas (25 a 60 °C) e valores de pH entre 6,0 e 9,0 favorecem no solo o processo de desnitrificação (Pelczar *et al*, 1993).

A desnitrificação é um processo de elevado impacto ecológico. Apesar de provocar a remoção de nitratos do solo, diminuindo a produtividade agrícola, a desnitrificação é importante para assegurar a reciclagem de azoto nos ecossistemas. O nitrato é um ião extremamente solúvel, sendo constantemente lixiviado do solo e acumulado nas massas de água. Se não ocorresse desnitrificação, a reserva de azoto da Terra estaria acumulada nos oceanos. A desnitrificação também mantém a potabilidade da água, pois elevadas concentrações de nitratos podem ser tóxicas (Stanier *et al*, 1987).

2.5. Oxidação anaeróbia do amoníaco

A oxidação anaeróbia do amoníaco, conhecida como processo “anammox” (*anaerobic ammonium oxidation*), foi recentemente descoberta e contribuiu para uma melhor compreensão do ciclo do azoto. Este processo é autotrófico, estritamente anaeróbio e contribui significativamente (cerca de 70%) para a reciclagem do azoto nos oceanos.

Neste processo, o amoníaco (NH_3) é oxidado a azoto molecular (N_2), sendo o nitrito o aceitador de electrões (e a hidrazina e a hidroxilamina os intermediários) (Figura 2.15):

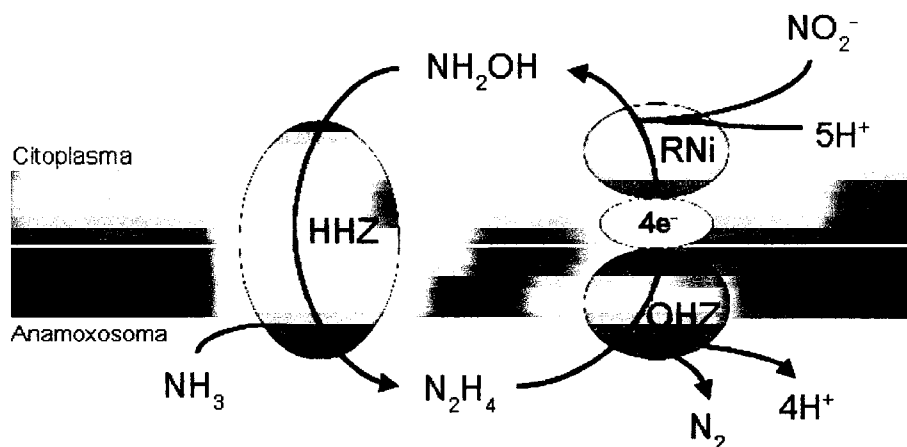
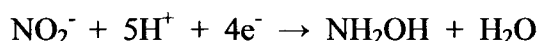
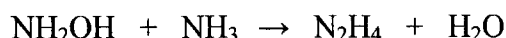


Figura 2.15: Mecanismo proposto para a oxidação anaeróbia do amoníaco. A hidroxilamina (NH_2OH) e o amoníaco (NH_3) são convertidos em hidrazina (N_2H_4) pela hidrolase da hidrazina (HHZ). A hidrazina é oxidada a azoto molecular (N_2) pela oxidase da hidrazina (OHZ), libertando 4 electrões. Os 4 electrões são utilizados para a redução do nitrito (NO_2^-) pela redutase do nitrito (RNi), originando hidroxilamina.

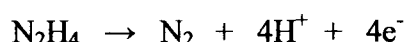
O nitrito (NO_2^-) é reduzido a hidroxilamina (NH_2OH) numa reacção catalizada pela redutase do nitrito (RNi):



A hidroxilamina e o amoníaco são convertidos em hidrazina (N_2H_4) pela hidrolase da hidrazina (HHZ):



A oxidação da hidrazina a azoto molecular é catalisada pela oxidase da hidrazina (OHZ):



Esta reacção liberta quatro electrões que vão ser utilizados para a redução do nitrito a hidroxilamina.

A oxidase da hidrazina (OHZ) foi inicialmente considerada semelhante à oxidorreductase da hidroxilamina de *Nitrosomonas*. No entanto, a oxidase da hidrazina apresenta menor massa molecular (183 kD) e a sequência dos seus aminoácidos é única. Esta enzima apresenta actividade apenas em condições de anaerobiose e constitui cerca de 10% do total das proteínas celulares. É constituída por três subunidades α e cada uma destas subunidades possui oito citocromos *c*. Esta enzima possui capacidade de catalisar a oxidação da hidrazina e da hidroxilamina (Jetten *et al*, 2002).

O processo “anammox” é influenciado pelas condições ambientais, nomeadamente a temperatura, o pH, a concentração de oxigénio e a de nitrito. Este processo é favorecido por temperaturas entre 6 e 43°C e pH entre 6,7 e 8,3, sendo o valor óptimo 8,0. Sendo um processo anaeróbio, é inibido mesmo para baixas concentrações de oxigénio (pressão parcial de 0,5%). Concentrações de nitrito superiores a 5mM inibem o processo “anammox”, mas a adição de qualquer um dos intermediários, hidrazina ou hidroxilamina, contraria este efeito (Strous *et al*, 1999).

A possibilidade da existência deste processo era reconhecida desde 1975 pelos cientistas, no entanto, as bactérias responsáveis nunca tinham sido identificadas e eram referidas como litotróficos em falta na natureza (“*the lithotrophs missing in nature*”) (Strous, 1999). A utilização de um meio de cultura apropriado para o crescimento de microrganismos estritamente autotróficos, em sistema SBR (*sequencing batch reactor*), permitiu a obtenção de biomassa suficiente para a identificação destas bactérias. O DNA extraído de suspensões celulares foi amplificado por PCR, usando como “primer” um rDNA 16S universal. A análise filogenética da sequência de rDNA 16S dominante permitiu a

identificação das bactérias como Planctomycetes. Uma bactéria “anammox” identificada foi denominada *Brocadia anammoxidans*. “Brocadia” refere-se ao local de descoberta (Gist-brocades em Delft, Holanda) e “anammoxidans” reflecte as propriedades metabólicas desta bactéria (Jetten *et al*, 2002).

A sequência de rDNA 16S foi então utilizada para produzir sondas oligonucleotídicas para aplicação na hibridização *in situ* com fluorescência (FISH). Esta técnica permitiu a identificação de uma outra bactéria envolvida na oxidação anaeróbia do amoníaco, em sistemas de tratamento de águas residuais, que foi designada *Kuenenia stuttgartiensis*. Estes dois quimioautotróficos anaeróbios pertencem a grupos monofiléticos claramente separados, apresentando menos de 90% de semelhanças na sequenciação de rDNA 16S. No entanto, possuem uma estrutura celular semelhante e produzem hidrazina a partir de hidroxilamina exógena. Foram observadas algumas diferenças fenotípicas, nomeadamente diferente tolerância aos níveis de nitrito e de fosfato.

As bactérias “anammox” apresentam uma taxa de crescimento extremamente lenta. Por exemplo, *Brocadia anammoxidans* apresenta um tempo de duplicação de 10,6 dias (Jetten *et al*, 2002). Recentemente, foi identificado um novo género de bactérias “anammox”. Em Pitsea, no Reino Unido, a análise da biomassa de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) demonstrou uma elevada actividade “anammox”, assim com a produção de hidrazina e hidroxilamina. A biblioteca genómica obtida a partir desta biomassa permitiu identificar dez sequências de rDNA 16S características de Planctomycetes. Quatro dessas sequências relacionavam-se com sequências de bactérias “anammox” conhecidas, mas estavam mais próximas da raiz do ramo evolutivo dos Planctomycetes. A hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), com sondas oligonucleotídicas específicas para estas quatro sequências, mostrou que duas espécies, pertencentes ao mesmo género, constituíam mais de 99% da população de Planctomycetes que, por sua vez, constituía 20% da população microbiana total. A identificação destas espécies como típicas bactérias “anammox” foi realizada por microscopia electrónica e análise lipídica. As duas espécies foram designadas *Scalindua brodae* (em homenagem ao químico austríaco Engelbert Broda, o primeiro a considerar a hipótese da existência da oxidação anaeróbia do amoníaco) e *Scalindua wagneri* (em homenagem ao microbiologista alemão Michael Wagner que muito contribui para o estudo da ecologia e filogenia deste processo). Simultaneamente, no Mar Negro, foi identificada uma nova espécie deste género, denominada *Scalindua sorokinii*. Com habitats tão diferentes, *Scalindua* é possivelmente o género “anammox” identificado com maior distribuição (Schmidt *et al*, 2003).

Os três géneros identificados partilham o mesmo ancestral comum, mas encontram-se evolutivamente muito separados. O género *Scalindua* apresenta cerca de 85% de semelhanças na sequência de rDNA 16S com *Brocadia*. No entanto, os três géneros são fisiológica e morfologicamente semelhantes (Schmidt *et al*, 2003). Todas as bactérias “anammox” pertencem a um grupo de bactérias com características muito particulares, os Planctomycetes, que recentemente foi considerado como o grupo bacteriano mais ancestral, podendo mesmo situar-se na base da árvore evolutiva *Bacteria*. Os Planctomycetes apresentam forma esférica ou oval e reproduzem-se por gemulação. A maioria destas bactérias possui ciclos de vida nos quais as células sésseis sofrem gemulação, originando células móveis. Estas são flageladas e movimentam-se por algum tempo até se fixarem e iniciarem novo ciclo.

A parede celular dos Planctomycetes não possui peptidoglicano, sendo essencialmente proteica. A ausência de peptidoglicano é comprovada pela resistência destas bactérias a antibióticos que inibem a sua síntese, como a penicilina G, ampicilina, vancomicina e ciclosserina. A ausência de peptidoglicano é uma característica que reforça a ancestralidade destas bactérias. A síntese de peptidoglicano será posterior à divergência do ramo evolutivo dos Planctomycetes. A superfície celular dos Planctomycetes apresenta estruturas crateriformes. Estas estruturas são reentrâncias com uma orla sobrelevada, constituídas por arranjos circulares de natureza proteica. Os Planctomycetes apresentam citoplasma diferenciado, com diferentes compartimentos membranares aparentemente com diferentes funções. Algumas bactérias, como *Pirullela* e *Gemmata obscuriglobus*, possuem um “corpo nuclear” delimitado por duas membranas e que contém o nucleóide. A ocorrência desta estrutura nos Planctomycetes, filogeneticamente pertencentes ao domínio *Bacteria*, sugere vários cenários evolutivos. Um é que esta estrutura seja homóloga do núcleo dos eucariotas e represente uma característica partilhada com um ancestral proto-eucariota comum; outro é que resulte de evolução convergente e represente uma estrutura análoga ao núcleo dos eucariotas (Fuerst, 1995).

As bactérias “anammox” apresentam um plano celular básico, definido pela ocorrência de três compartimentos membranares designados respectivamente anamoxosoma, riboplasma e parifoplasma (Figura 2.16). O anamoxosoma, que é o compartimento mais interno, não possui ribossomas nem DNA, é delimitado por uma membrana simples e representa cerca de 30% do volume celular. A região central do anamoxosoma apresenta um conjunto organizado de túbulos com 13 nm de diâmetro. É neste compartimento que ocorre a reacção “anammox”. A oxidase da hidrazina está presente apenas no interior do anamoxosoma, indicando que a compartimentalização nestes Planctomycetes é bioquimicamente funcional.

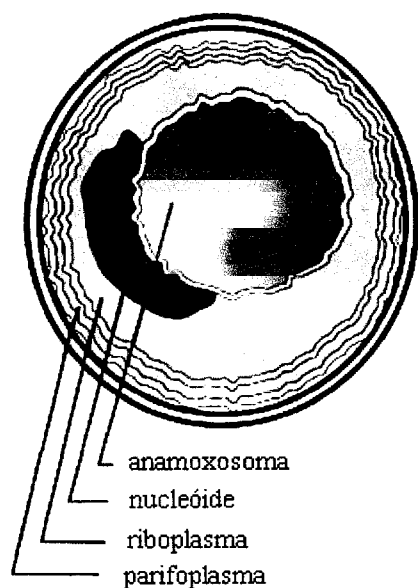


Figura 2.16: Representação esquemática da estrutura das bactérias “anammox”.

Recentemente, descobriu-se que a membrana que delimita o anamososoma é constituída por lípidos com elevado teor de ciclobutano. Provavelmente, estes lípidos conferem à membrana uma excepcional densidade e elevada resistência à difusão de solutos, ajudando à retenção dos intermediários tóxicos hidrazina e hidroxilamina.

O riboplasma é o compartimento intermédio e é delimitado externamente por uma membrana designada membrana intracitoplasmática. Neste compartimento localizam-se o nucleóide e ribossomas. Externamente ao riboplasma, localiza-se o parifoplasma. Este compartimento é delimitado externamente pela membrana citoplasmática e não possui ribossomas nem DNA, mas apresenta algum RNA (Lindsay *et al*, 2001).

Em ecossistemas com baixa concentração de oxigénio, como por exemplo em interfaces aerobiose/anaerobiose, a actividade das bactérias “anammox” está dependente da actividade das bactérias aeróbias que oxidam o amoníaco. Nestas condições, as bactérias aeróbias oxidam o amoníaco a nitrito, mantendo a concentração de oxigénio baixa. Por sua vez, as bactérias “anammox” convertem o nitrito produzido e o restante amoníaco em azoto molecular. Neste tipo de ecossistemas, as bactérias aeróbias que oxidam o nitrito não foram detectadas. Aparentemente, estas bactérias não conseguem competir com as bactérias aeróbias que oxidam o amoníaco, nem com as bactérias “anammox”. De modo que nestes ecossistemas as bactérias aeróbias que oxidam o amoníaco e as bactérias “anammox” coexistem e formam uma comunidade estável. Outras interações podem ocorrer em ambientes anaeróbios, dada a versatilidade metabólica das bactérias aeróbias que oxidam o amoníaco. Muitas destas bactérias são também anaeróbios facultativos. Por exemplo, *Nitrosomonas eutropha* possui

capacidade de oxidar o amoníaco (NH_3) em anaerobiose, usando tetróxido de azoto (N_2O_4) como agente oxidante. A hidroxilamina (NH_2OH) e o óxido nítrico (NO) são os produtos desta reacção (Figura 2.17).

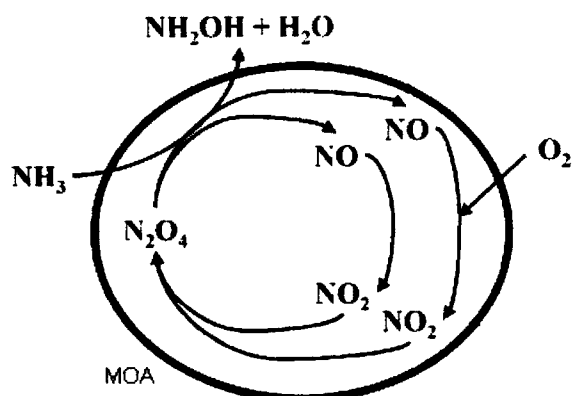


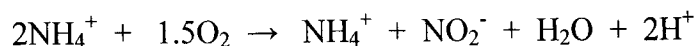
Figura 2.17: Oxidação anaeróbia e aeróbia do amoníaco por *Nitrosomonas eutropha*. O tetróxido de azoto (N_2O_4) é o agente oxidante para a conversão do amoníaco a hidroxilamina (NH_2OH) e óxido nítrico (NO). Na presença de oxigénio, o óxido nítrico é oxidado a NO_2 (N_2O_4). MOA: monoxigenase do amoníaco.

O óxido nítrico não é metabolizado e quando na presença de oxigénio é oxidado a NO_2 , proporcionando o agente oxidante (N_2O_4) à enzima monoxigenase do amoníaco. A hidroxilamina é posteriormente oxidada a nitrito. O nitrito produzido é utilizado em anaerobiose como aceitador de electrões, conduzindo à formação de azoto molecular (N_2). Estas bactérias podem utilizar uma variedade de dadores de electrões (hidrogénio, piruvato e amoníaco) para a redução do nitrito. A enzima responsável pela redução de nitrito a óxido nítrico é uma redutase do nitrito com cobre. Para evitar a acumulação de óxido nítrico, extremamente citotóxico, *Nitrosomonas eutropha* possui potencial genético para sintetizar uma redutase do óxido nítrico membranar, que cataliza a redução do óxido nítrico a óxido nitroso que posteriormente é convertido em azoto molecular (Schmidt *et al*, 2002).

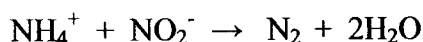
A taxa máxima de conversão do amoníaco em anaerobiose *Nitrosomonas eutropha* é cerca de $2 \text{ nmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$, valor muito inferior ao registado para *Brocadia anammoxidans* ($60 \text{ nmol NH}_4^+ \text{ min}^{-1} (\text{mg proteína})^{-1}$), mas suficiente para permitir a sobrevivência em períodos prolongados de limitação de O_2 (Jetten *et al*, 2002).

A coexistência de bactérias aeróbias que oxidam o amoníaco e de bactérias “anammox” em sistemas com baixas concentrações de oxigénio permite a remoção de amoníaco em águas residuais numa só fase, com a realização simultânea das respectivas reacções. Recentemente, tem sido desenvolvido um sistema designado CANON (*Completely Autotrophic N-removal Over Nitrite*) para aplicação em águas residuais industriais, lamas primárias ou gases com elevado teor de amoníaco ($> 0,2 \text{ g/l}$) e baixo teor de carbono orgânico ($\text{C:N} < 0,15$).

Este sistema envolve duas fases sucessivas. A primeira fase é uma nitrificação parcial, ou seja, a oxidação do amoníaco a nitrito. Nesta fase, cerca de 50% do amoníaco é oxidado a nitrito por bactérias nitrificantes:



A segunda fase é a oxidação anaeróbia do amoníaco. O amoníaco e o nitrito são convertidos em azoto molecular por bactérias “anammox”:



O primeiro reactor “anammox” desenvolvido localiza-se na estação de tratamento de águas residuais de Dokhaven, em Roterdão, e iniciou o seu funcionamento em Junho de 2002. Este sistema permite a redução dos custos operacionais em cerca de 90%, a diminuição da emissão de CO₂ em mais de 88% e a diminuição das necessidades energéticas.

3. ALTERAÇÕES ANTROPOGÉNICAS NO CICLO DO AZOTO - CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

3. ALTERAÇÕES ANTROPOGÉNICAS NO CICLO DO AZOTO - CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS

As actividades humanas têm causado um aumento global da quantidade de azoto que circula entre o mundo vivo, o solo, a água e a atmosfera. Esta alteração representa um sério impacto para os ecossistemas, pois o azoto é um elemento essencial para os seres vivos e a sua disponibilidade adquire uma importância crucial para a organização e funcionamento dos ecossistemas. Em excesso, o azoto converte-se num factor poluente, alterando o equilíbrio ecológico dos ecossistemas.

A maioria das actividades humanas responsáveis pelo aumento do azoto global verifica-se à escala local, como a produção e utilização de fertilizantes azotados e a utilização de combustíveis fósseis. No entanto, estas actividades não só aumentaram a quantidade de azoto no ambiente, como também incrementaram o movimento global das várias formas azotadas através do ar e da água. Devido a este aumento da mobilidade, o azoto em excesso origina sérias consequências ambientais a longo prazo e em larga escala. De um modo geral, as alterações antropogénicas no ciclo do azoto provocam um aumento da taxa de entrada de azoto no ciclo terrestre deste elemento; um aumento da concentração global de óxidos de azoto, gases potenciadores do efeito de estufa; uma perda de micronutrientes do solo, como cálcio e potássio, essenciais para a manutenção a longo prazo da fertilidade dos solos; a acidificação substancial dos solos e águas e um aumento do transporte de compostos azotados pelos rios e sua acumulação nos estuários e zonas costeiras, com o consequente efeito poluente e perda acelerada de diversidade biológica (Vitousek *et al*, 1997).

3.1 Impacto humano na fixação do azoto

As actividades humanas aceleraram claramente a taxa de fixação do azoto atmosférico, duplicando a sua transferência anual para formas azotadas disponíveis para assimilação pelos seres vivos. Os principais responsáveis por este fenómeno são a produção de fertilizantes azotados, a combustão de combustíveis fósseis e o cultivo de espécies leguminosas em simbiose com bactérias fixadoras de azoto.

A fixação industrial do azoto para a produção de fertilizantes representa a maior contribuição humana para o ciclo global deste elemento. Este processo surgiu na Alemanha, durante a Primeira Guerra Mundial e aumentou exponencialmente desde 1940. O crescimento

populacional e a crescente urbanização indicam que a produção e utilização destes fertilizantes continuará a aumentar.

A combustão de combustíveis fósseis, como o carvão e o petróleo, liberta para a atmosfera azoto previamente fixado em formações geológicas, sob a forma de óxidos de azoto, como o óxido nítrico. No entanto, na combustão a altas temperaturas também ocorre a fixação directa de pequenas quantidades de azoto atmosférico.

Aproximadamente 1/3 da superfície terrestre é utilizada para a agricultura e o Homem substituiu grandes áreas de vegetação natural por monoculturas de leguminosas, o que aumentou consideravelmente a taxa de fixação do azoto atmosférico nesses terrenos e a quantidade de formas azotadas biologicamente disponíveis.

Além de incrementar a fixação do azoto atmosférico e a libertação de azoto de reservatórios geológicos, as actividades humanas também provocam a libertação de azoto de reservatórios biológicos, contribuindo para o aumento da disponibilidade de formas azotadas. Os principais meios de mobilização incluem a combustão de biomassa, o desbravamento de terrenos e sua conversão para cultivo e a drenagem de solos húmidos, com a consequente oxidação de matéria orgânica (Vitousek *et al*, 1997).

3.2. Impacto na atmosfera

O impacto humano no ciclo do azoto reflecte-se também a nível atmosférico, especificamente pelo aumento da emissão, transporte, reacção e deposição de compostos azotados gasosos, como óxido nitroso (N_2O), óxido nítrico (NO) e amoníaco (NH_3).

Algumas actividades humanas afectam directamente a atmosfera, como por exemplo, a combustão de materiais fósseis e outros processos a altas temperaturas que libertam óxido nítrico (NO). Outras actividades aumentam indirectamente a emissão de gases azotados, como por exemplo, a fertilização agrícola que aumenta a concentração de amoníaco (NH_3) volatilizável no solo, a taxa de nitrificação e, consequentemente, a de desnitrificação, aumentando a emissão de gases azotados do solo e da água.

Os compostos azotados gasosos originam diversos efeitos ambientais. Por exemplo, na estratosfera, o óxido nitroso (N_2O) contribui para o efeito de estufa por absorção de radiação infravermelha. O óxido nitroso pode sofrer fotólise ou reagir com oxigénio e assim catalisar a depleção da camada de ozono. Diversas fontes contribuem para o aumento do óxido nitroso,

como por exemplo a aplicação de fertilizantes, lençóis freáticos ricos em nitratos, solos saturados em nitratos, combustão de biomassa, desbravamento de terras e fabrico industrial de diversos produtos, como ácido nítrico e poliamidas.

O óxido nítrico (NO) afecta a concentração do agente oxidante maioritário na atmosfera, o radical hidroxilo ($\text{OH}^\bullet$) e catalisa a formação fotoquímica do *smog*. Quando a concentração de óxido nítrico é elevada, a oxidação de monóxido de carbono (CO), de metano (CH_4) e outros hidrocarbonetos voláteis desencadeia a produção de ozono troposférico, componente tóxico do *smog* (Figura 3.1). O produto final da oxidação de óxido nítrico, o ácido nítrico (HNO_3), é o principal constituinte da chuva ácida. Diversas actividades contribuem para a emissão de óxido nítrico, mas a principal é certamente a combustão, quer de combustíveis fósseis, quer de biomassa. Cerca de 80% das emissões de óxido nítrico são de responsabilidade humana.

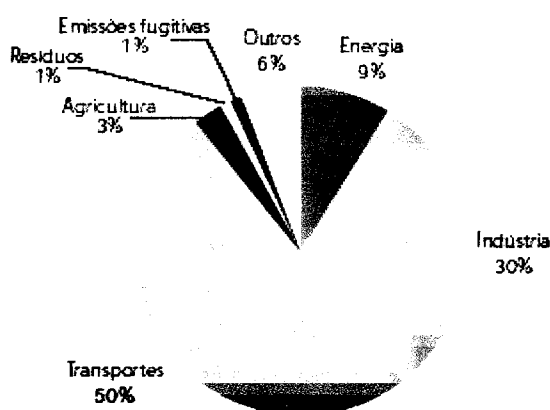


Figura 3.1: Contribuição por sector para as substâncias precursoras de ozono troposférico (adaptado do Relatório do Instituto do Ambiente, 2002).

O amoníaco (NH_3) funciona como um agente neutralizante na atmosfera, influenciando o pH de aerossóis, do vapor de água e da precipitação atmosférica. Cerca de 70% das emissões de amoníaco são devidas a actividades humanas. Verifica-se um elevado nível de volatilização de amoníaco a partir de fertilizantes agrícolas, resíduos domésticos animais e combustão de biomassa (Vitousek *et al*, 1997).

Em Portugal, no ano 2000, 44% das emissões de óxidos de azoto (NO_x) foram devidas ao sector dos transportes. As emissões destes compostos foram das que registaram um maior crescimento, o qual foi proporcional ao número de veículos em circulação. Os principais problemas ambientais provocados pelo aumento destas emissões estão relacionados com o aquecimento global e a ocorrência de níveis críticos de óxidos de azoto a nível local e regional (Relatório do Instituto do Ambiente, 2002).

3.3. Impacto nos ecossistemas terrestres

As taxas de produção e acumulação de biomassa nos ecossistemas são limitadas pela disponibilidade de azoto e sabe-se que as actividades humanas têm vindo a aumentar esta disponibilidade nos ecossistemas terrestres. Este aumento tem importantes implicações no ciclo global do carbono, dado que afecta a amplitude do crescimento vegetal e a quantidade de carbono retida em ecossistemas terrestres. Trabalhos experimentais realizados na Europa e na América indicaram que grande parte do azoto retido em ecossistemas terrestres estimula a assimilação de carbono. No entanto, quando um ecossistema atinge o ponto de saturação em azoto, a sua capacidade de produção é limitada, ou seja, cessa o aumento da produção vegetal e da assimilação de carbono em resposta ao aumento da disponibilidade de azoto. Neste ponto, o potencial de retenção de azoto do ecossistema está limitado e a perda de azoto para a água e atmosfera aproxima-se da entrada total de azoto, anulando os efeitos da fertilização. O aumento da disponibilidade de azoto desencadeia o aumento da mobilidade de nitratos. A perda de nitratos, por lixiviação e por desnitrificação, provoca a perda de cationes essenciais e a acidificação de solos e águas. Por lixiviação, os nitratos arrastam consigo elementos com carga positiva, como os cationes cálcio, magnésio e potássio. Por sua vez, a acidificação do meio facilita a mobilização de alumínio inorgânico que é tóxico. O ecossistema começa então a ser limitado por outros recursos. Este conjunto de acontecimentos provoca a redução da taxa fotossintética e a consequente diminuição do crescimento e aumento da mortalidade das espécies vegetais e de toda a cadeia alimentar associada. O aumento da disponibilidade de azoto pode, assim, provocar uma alteração dramática das espécies dominantes e reduzir marcadamente a diversidade dos ecossistemas.

No Reino Unido, investigações realizadas mostraram que a aplicação de fertilizantes azotados favorece o domínio de algumas espécies que estão melhor adaptadas a níveis elevados de azoto. Este efeito causou uma redução acentuada do número de espécies nas áreas com maior nível de fertilização. Na Holanda, onde a disponibilidade de compostos azotados provocada por acção humana é das mais elevadas do mundo, ecossistemas completos foram alterados devido a esta mudança das espécies dominantes, tendo ecossistemas de elevada diversidade sido convertidos em ecossistemas de menor diversidade, como florestas, que estão melhor adaptadas a elevados níveis de azoto (Vitousek *et al*, 1997).

3.4. Impacto nos ecossistemas aquáticos

A acção humana no ciclo do azoto também se faz sentir nos ecossistemas aquáticos, verificando-se um aumento da concentração global de azoto, especialmente de nitratos. A concentração de nitratos na maioria dos rios do nordeste americano aumentou três a dez vezes no último século. Esta tendência também se verifica nos principais rios da Europa e, em cerca de 1000 lagos da Noruega, aonde a concentração de nitratos duplicou em menos de uma década. Estima-se que o fluxo global de azoto nos ecossistemas aquáticos do Atlântico Norte tenha aumentado desde os tempos pré-industriais entre duas a vinte vezes.

A concentração e o fluxo de nitratos nestes ecossistemas estão relacionados com a densidade populacional humana nas suas margens. As actividades humanas constituem uma rede de entradas de azoto que engloba o uso de fertilizantes, o cultivo de leguminosas em simbiose com bactérias fixadoras de azoto e a deposição de óxidos de azoto da atmosfera.

Em Portugal, o aumento da concentração de nitratos nos rios está relacionada com a descarga de águas residuais, sem tratamento prévio, e também ao predomínio dos fertilizantes azotados na actividade agrícola (Figura 3.2) (Relatório do Instituto do Ambiente, 2002).

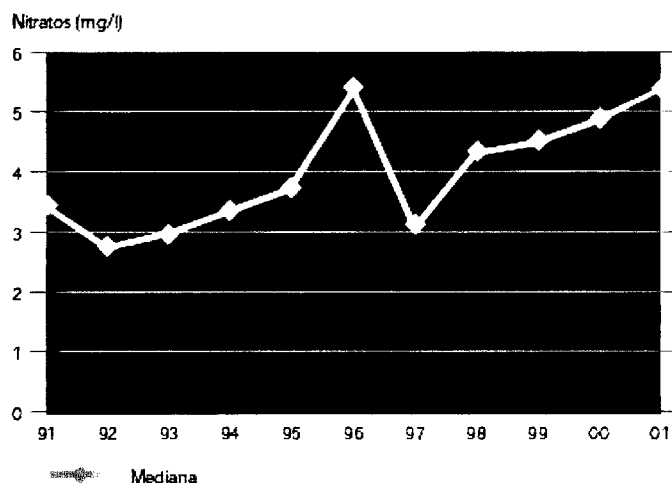


Figura 3.2: Concentração de nitratos em rios portugueses (adaptado do Relatório do Instituto do Ambiente, 2002).

O aumento da concentração de nitratos foi observado em lençóis freáticos de muitas regiões agrícolas, devido ao uso excessivo de fertilizantes azotados. A longa permanência de nitratos nas águas subterrâneas implica uma diminuição da qualidade da água para consumo, podendo mesmo representar um grave problema de saúde pública quando os nitratos atingem níveis elevados.

O ácido nítrico (HNO_3) e o amoníaco (NH_3) contribuem para a acidificação dos ecossistemas aquáticos. A conversão de óxido nítrico em ácido nítrico provoca a acidificação das águas de um modo directo. Como resultado da assimilação e da oxidação do amoníaco libertam-se iões H^+ que alteram o pH. A acidificação resultante condiciona os diversos processos do ciclo do azoto nos ecossistemas aquáticos.

O aumento de azoto inorgânico em ecossistemas aquáticos pode causar eutrofização, um processo que representa talvez a maior ameaça à integridade destes ecossistemas, pois produz efeitos substanciais na sua composição e funcionamento. Nestes ecossistemas, a produtividade primária é controlada pela entrada de compostos azotados. O azoto em excesso estimula o crescimento de algas e plantas aquáticas. A consequente decomposição destes organismos provoca uma diminuição do oxigénio dissolvido na água, podendo causar hipoxia (baixos níveis de O_2) ou anoxia (ausência de O_2) em águas estratificadas. Baixos níveis de O_2 conduzem à morte de outros seres vivos e tornam imprópria a qualidade da água para consumo humano. A eutrofização está assim associada a uma perda significativa da diversidade biológica. Sabe-se que diversos ecossistemas são afectados por este fenómeno. Por exemplo, uma evolução de anoxia no Mar Báltico e no Mar Negro e de hipoxia no Mar do Norte são conhecidas desde 1950 (Vitousek *et al*, 1997).

3.5. Necessidade de um desenvolvimento sustentável

As alterações antropogénicas mais significativas no ciclo do azoto estão intrinsecamente associadas à produção de alimentos. A agricultura intensiva moderna exige grandes quantidades de fertilizantes azotados e a humanidade necessita de práticas agrícolas intensivas de modo a fazer face ao crescimento populacional. Evitar que a produção e aplicação de fertilizantes azotados aumente exponencialmente torna-se assim um difícil desafio. No entanto, existem estratégias para controlar a utilização de fertilizantes azotados, bem como para reduzir a mobilidade dos compostos azotados, diminuindo o impacto regional e global. Um modo de reduzir o consumo de fertilizantes é aumentar a sua eficiência. Aproximadamente metade da quantidade de fertilizantes utilizados é perdida para a atmosfera ou removida pela água, sob a forma de N_2 , óxidos de azoto ou nitratos. A dissolução do fertilizante na água de irrigação, a sua aplicação abaixo da superfície do solo e a temporização das múltiplas aplicações de acordo com as necessidades da cultura, reduz 1/3 do fertilizante

azotado necessário e cerca de dez vezes a perda de óxido nitroso e de óxido nítrico. O desenvolvimento e a implementação global de práticas similares devem ser prioritários, pois estas constituem uma oportunidade de reduzir os custos da produção alimentar e as alterações antropogénicas nos ecossistemas. É também importante reduzir a lixiviação de compostos azotados das zonas fertilizadas que contribui para a eutrofização dos ecossistemas aquáticos. Um modo de o conseguir é através da manutenção da vegetação circundante aos cursos de água que retém naturalmente os compostos azotados. A redução das emissões de gases azotados resultantes da combustão de combustíveis fósseis também exige melhoramentos na eficiência do processo (Vitousek *et al*, 1997).

As actividades humanas causam sem dúvida sérias consequências no ambiente. A taxa de fixação de azoto praticamente duplicou no último século. A concentração de gases responsáveis pelo efeito de estufa e precursores de *smog* e chuva ácida têm vindo a aumentar. Os solos sofrem acidificação e depleção de nutrientes essenciais à sua fertilidade. Os aquíferos destas regiões sofrem de igual modo acidificação e o azoto em excesso é transportado pelos rios, acumulando-se nos estuários e zonas costeiras, causando o declínio dos recursos piscícolas. A diminuição da biodiversidade é evidente quer nos ecossistemas terrestres, quer nos ecossistemas aquáticos.

De modo que se torna clara a urgência de uma tomada de medidas nacionais e internacionais respeitantes às alterações antropogénicas do ciclo do azoto, de modo a diminuir as alterações globais e o seu impacto, numa perspectiva de desenvolvimento sustentável cada vez mais pertinente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Detecção de Planctomycetes

A detecção de Planctomycetes foi realizada em amostras de lammas primárias de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais de Matosinhos (ETAR M₁). As lammas primárias resultam do tratamento primário dos efluentes, sendo naturalmente ricas em matéria orgânica e microrganismos. A técnica usada para a detecção de Planctomycetes foi a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) (Amann *et al*, 1990; Zarda *et al*, 1997; Neef *et al*, 1998).

4.1.1. Fixação das amostras

Amostras de lammas primárias foram fixadas em paraformaldeído 4%, durante 1 hora a 4 °C. Após centrifugação a 3000 rpm durante 5 minutos, as amostras foram lavadas em tampão fosfato salino (0,13 M NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH 7,2). Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas e armazenadas em etanol 95%, podendo ser guardadas nestas condições durante vários meses a -20 °C.

4.1.2. Imobilização em lâminas

A imobilização das amostras fixadas para a hibridização *in situ* foi realizada em lâminas de gelatina. Para obtenção de lâminas de gelatina, as lâminas de vidro foram mergulhadas por breves instantes numa solução de gelatina 0,1% e KCr(SO₄)₂ 0,01% a 70 °C. As lâminas foram depois secas ao ar, podendo ser armazenadas a 4 °C durante vários meses. Em cada lâmina de gelatina, foram colocados 10 µl da amostra. Após secagem ao ar, as amostras foram desidratadas, em séries ascendentes de etanol (50%, 80% e 95%), durante 3 minutos cada e novamente secas ao ar.

4.1.3. Sonda oligonucleotídica e corantes utilizados

A sonda utilizada na hibridização *in situ* foi a sonda Pla5a (Sigma) que é específica para o rRNA 16S de Planctomycetes, posição 45-62, com a sequência 5'-GACTTGTCATGCCTAATCC. O corante Cy3 (Amersham Biosciences) é uma cianina mono-reactiva com fluorescência laranja que se liga covalentemente aos grupos amino da sonda Pla5a. A conjugação do Cy3 com a sonda oligonucleotídica foi realizada por adição de 1,5 ml de tampão carbonato de sódio 0,1 M (pH 9,0) à ampola contendo a sonda; desta solução, retiraram-se 0,5 ml que foram adicionados à ampola contendo o corante Cy3. Para utilizar na hibridização *in situ* com fluorescência, a concentração da sonda Pla5a foi ajustada para 50 ng/ μ l.

O corante utilizado para a coloração da comunidade microbiana presente nas amostras foi 4',6-diamino-2'-fenilindole (DAPI) (Sigma), específico para o DNA, na concentração 0,1 μ g/ml.

4.1.4. Hibridização *in situ* com fluorescência (FISH)

Todo o processo de hibridização foi realizado em câmara escura, de modo a evitar a dissipação da fluorescência do corante. A câmara de hibridização foi mantida humidificada, através de papel de filtro embebido em tampão de hibridização. Sobre cada amostra imobilizada em lâmina de gelatina foram colocados 25 μ l de uma mistura constituída por 24 μ l de tampão de hibridização e 1 μ l da sonda Pla5a (50 ng/ μ l) conjugada com Cy3. As amostras foram depois colocadas na câmara de hibridização a 37 °C, durante 4 horas. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem durante 10 minutos a 37 °C, em câmara escura. Após repetição da lavagem e passagem por água destilada, as amostras foram secas ao ar e submetidas à coloração com DAPI.

Tampão de hibridização: 0,9 M NaCl; 20 mM Tris-HCl; 5 mM EDTA; 0,01% SDS; 30% formamida; pH 7,2.

Tampão de lavagem: 102 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl; 10 mM EDTA; 0,01% SDS; pH 7,2.

4.1.5. Coloração com DAPI

A contrastação com DAPI foi realizada a seguir ao último passo da técnica de hibridização. As amostras foram cobertas com 20 µl de uma solução 0,1 µg/ml de DAPI durante 5 minutos, seguindo-se uma lavagem rápida com água destilada e secagem ao ar.

4.1.6. Microscopia

A observação do material foi feita com um microscópio de epifluorescência Nikon Optiphot-2, com lâmpada de mercúrio HB-10101AF Nikon, e equipado com os filtros MBE14104 (EPI-FL FILTER BLOCK B-2A BA520/DM510/EX450-490) para o Cy3 e MBE14100 (EPI-FL FILTER BLOCK UV-2A BA420/DM400/EX330-380) para o DAPI. Como meio de montagem foi utilizado Citifluor. As observações foram registadas com o sistema digital de imagem de alta resolução Nikon Digital Camera DXM1200F acoplado ao microscópio e software Nikon ACT-1 v. 2.62.

4.2. Isolamento de *Rhizobium* sp.

4.2.1. Obtenção de culturas puras de *Rhizobium* sp.

Nódulos radiculares de *Ornithopus pinnatus*, uma planta leguminosa vulgarmente designada por serradela-delgada (Figura 4.1) que cresce tipicamente em habitats de clima temperado, foram utilizados para o isolamento de *Rhizobium* sp. As raízes foram lavadas em água corrente, de modo a remover as partículas de terra, colocadas em água de Javel 20% durante 5-10 minutos e lavadas com água destilada e esterilizada. Em seguida, os nódulos radiculares foram destacados e seccionados em condições de assépsia. Por impressão de secções dos nódulos radiculares foi efectuada a inoculação em meio de cultura apropriado para isolamento de *Rhizobium* sp. (DSMZ). A incubação das culturas foi realizada a 25 °C, durante 24 horas.

Meio de cultura para isolamento de *Rhizobium* sp.: 1% manitol; 0,1% extracto de levedura;
0,02% MgSO₄; 0,05% K₂HPO₄;
alguns grãos FeCl₃; 1,5% agar; pH 6,7.

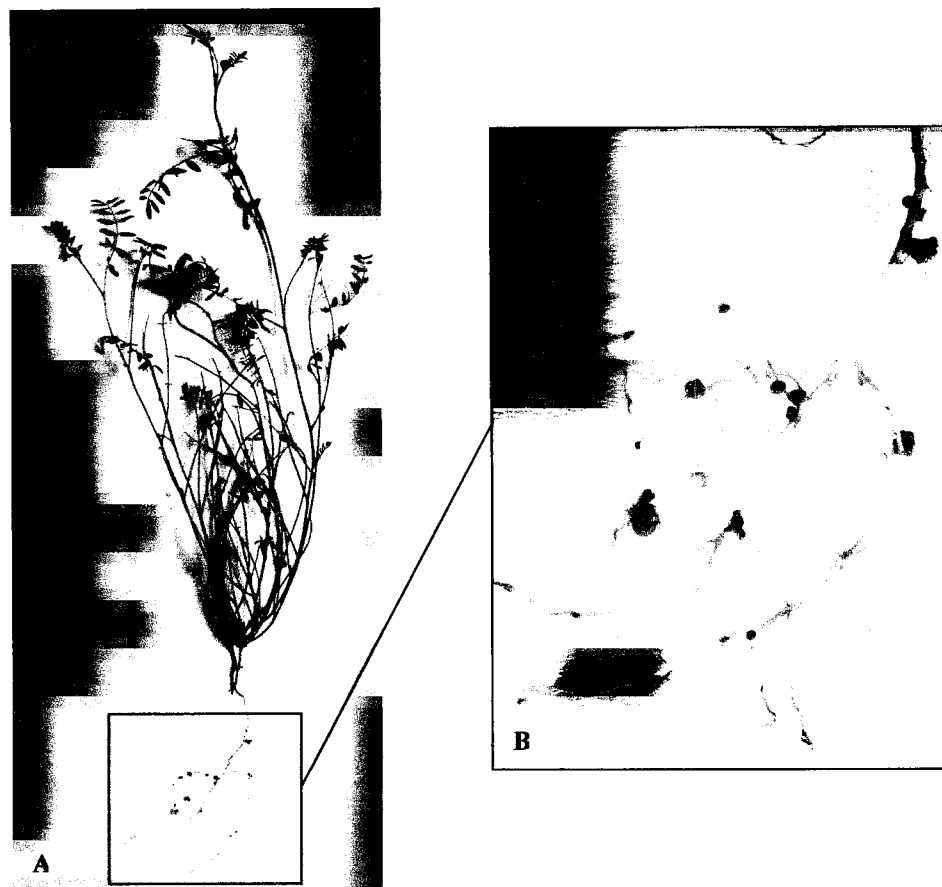


Figura 4.1: Exemplar de *Ornithopus pinnatus* (A). Parte do sistema radicular com nódulos (B).

4.2.2. Coloração de Gram

Amostras das culturas puras obtidas foram observadas a fresco e após serem submetidas à coloração de Gram. Seguidamente, foram desidratadas em séries ascendentes de etanol (70%, 90% e 100%) e xilol. Como meio de montagem foi utilizado Entellan (Merck). A observação foi feita com um microscópio Nikon Eclipse E600 e as observações foram registradas com sistema digital de imagem de alta resolução Nikon Digital Camera DXM1200F acoplado ao microscópio e software Nikon ACT-1 v. 2.62.

Coloração de Gram:	Violeta cristal 2% - 15 segundos; lavagem com água destilada; etanol 95% - 3 minutos; lavagem com água destilada; solução de iodo (iodo 0,33%; iodeto de potássio 0,66%) - 15 segundos; lavagem com água destilada; etanol 95% - 1 minuto; lavagem com água destilada; safranina 0,25% - 30-60 segundos; lavagem com água destilada.
--------------------	--

4.3. Isolamento de bactérias nitrificantes

4.3.1. Obtenção de culturas puras de bactérias nitrificantes

Amostras de solo de jardim foram utilizadas para o isolamento de bactérias nitrificantes em meios de cultura selectivos. A partir de suspensões preparadas com solo, procedeu-se à inoculação do meio de cultura para isolamento de bactérias nitrificantes (Pelczar *et al*, 1993). A incubação das culturas, primeiro em meio líquido, com agitação, depois em meio sólido, foi realizada a 25 °C, no escuro, durante 1-2 semanas.

Meio de cultura para isolamento de bactérias nitrificantes: 0,2% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,1% K_2HPO_4 ;
0,05% MgSO_4 ; 0,04% FeSO_4 ;
0,04% NaCl ; 0,1% CaCO_3 ;
0,1% MgCO_3

As culturas obtidas foram então utilizadas para a inoculação de meios de cultura para o isolamento de *Nitrosomonas* sp. e de *Nitrobacter* sp. (LGC Promochem) nas mesmas condições anteriormente descritas. Amostras das culturas puras obtidas foram submetidas ao procedimento indicado em 4.2.2.

Meio de cultura para isolamento de *Nitrosomonas* sp.: 0,3% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05% K_2HPO_4 ;
0,005% MgSO_4 ; 0,0004% CaCl_2 ;
0,01% solução Fe/EDTA;
2,5% Vermelho Cresol (0.0005%).

Manter pH a 8,2-8,4 durante o crescimento com solução esterilizada de K_2CO_3 50%.

Solução Fe/EDTA: 0,14% EDTA; 0,5% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05% H_2SO_4 (concentrado).

Meio de cultura para isolamento de *Nitrobacter* sp.: 0,05% CaCl_2 2%
0,05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20%
0,1% Ferro quelatado 0,1%
0,05% solução de metais
0,05% NaNO_2 41,4%
0,02% K_2HPO_4 1,74%

Solução de metais: $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,02%; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0,0002%; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,01%; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,002%

4.4. Isolamento de bactérias com capacidade de reduzir o nitrato

Suspensões de solo de jardim foram usadas para inocular agar nutritivo (NA). A incubação das culturas foi realizada a 25 °C, durante 18-24 horas. A partir das culturas mistas obtidas procedeu-se, através de técnica do riscado, ao isolamento dos diferentes microrganismos presentes. Cada uma das culturas puras obtidas foi submetida aos testes do sistema API 20E (BioMérieux), de modo a identificar as espécies bacterianas capazes de reduzir o nitrato. Após a identificação, amostras de cada uma das culturas pretendidas foram submetidas ao procedimento indicado em 4.2.2.

Meio de cultura NA: 0,3% extracto de carne; 0,5% peptona; 1,5% agar.

4.4.1. Identificação de microrganismos com o sistema API 20E

O API 20 E é um sistema para a identificação de *Enterobacteriaceae* e outros bacilos de Gram-negativo não fastidiosos que utiliza testes bioquímicos padronizados e miniaturizados e uma base de dados. A galeria API 20 E comporta 20 microtubos que contêm substratos desidratados. Os microtubos são inoculados com uma suspensão bacteriana que reconstitui os meios. A incubação é efectuada a 25 °C, durante 18-24 horas. As reacções produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças de cor espontâneas ou reveladas após a adição de reagentes. A leitura destas reacções permite a obtenção de um perfil numérico que possibilita a identificação através da consulta de um Catálogo Analítico. Na ficha de resultados, os testes são separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 é indicado para cada um. Adicionando no interior de cada grupo os valores que correspondem a reacções positivas, obtém-se 7 algarismos; a reacção da oxidase que constitui o 21º teste é afectada com o valor 4 quando positiva. Adicionalmente, foi efectuado o teste da redução do nitrato que é realizado no tubo GLU. A tabela seguinte descreve as reacções envolvidas nos vários testes, assim como os resultados possíveis.

Tabela 4.1: Quadro de leitura dos testes de identificação API 20E

Testes	Descrição	Resultados	
		Negativo	Positivo
ONPG	hidrólise do β-galactosídeo-ortonitrofenil pela β-galactosídase com liberação de nitrofenol	incolor	amarelo
ADH	degradação da arginina em ornitina, amoníaco e CO ₂ pela hidrolase da arginina	amarelo	vermelho/alaranjado
LDC	degradação da lisina em cadaverina pela descarboxilase da lisina	amarelo	vermelho/alaranjado
ODC	degradação da ornitina em putrescina pela descarboxilase da ornitina	amarelo	vermelho/alaranjado
CIT	utilização do citrato de sódio como única fonte de carbono	verde pálido/amarelo	azul esverdeado/azul
H ₂ S	redução do tiosulfato de sódio com produção de H ₂ S	incolor/acizentado	depósito negro/orla fina
URE	degradação da ureia pela urease com liberação de amoníaco e CO ₂	amarelo	vermelho/alaranjado
TDA	desaminação do triptofano pela desaminase do triptofano com produção de ácido indolepirúvico	amarelo	castanho avermelhado
IND	produção de índole como resultado do metabolismo do triptofano	incolor/verde pálido/amarelo	rosa
VP	produção de acetoína, intermediário na fermentação do butanodiol	incolor	rosa/avermelhado
GEL	liquefacção da gelatina pela gelatinase	não difusão do pigmento negro	difusão do pigmento negro
GLU	fermentação/oxidação da glucose com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
MAN	fermentação/oxidação do manitol com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
INO	fermentação/oxidação do inositol com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
SOR	fermentação/oxidação do sorbitol com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
RHA	fermentação/oxidação da ramnose com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
SAC	fermentação/oxidação da sacarose com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
MEL	fermentação/oxidação da melibiose com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
AMY	fermentação/oxidação da amigdalina com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
ARA	fermentação/oxidação da arabinose com produção de ácido	azul/azul esverdeado	amarelo
OX	presença da citocromo oxidase	incolor	violeta
NO ₃ ⁻	redução do nitrato com produção de NO₂⁻ N₂	amarelo	vermelho
		laranja/vermelho	amarelo

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Detecção de Planctomycetes

As lamas primárias de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) apresentam elevados níveis de matéria orgânica e uma natural diversidade e abundância de microrganismos. Tais características permitem considerá-las como amostras ideais para detectar a presença de Planctomycetes, incluindo muito provavelmente alguns dos responsáveis pela oxidação anaeróbia do amoníaco. A presença de Planctomycetes em lamas primárias da ETAR M₁ foi detectada através da técnica de hibridização *in situ* com fluorescência.

A hibridização das amostras com a sonda Pla5a, específica para Planctomycetes, marcada com o fluorocromo Cy3, permitiu a observação microscópica de Planctomycetes, enquanto que a coloração com o fluorocromo DAPI, específico para o DNA, permitiu a observação microscópica de toda a comunidade microbiana presente. A realização destas duas técnicas em sequência na mesma amostra, apresentou como principal vantagem a possibilidade de, após a observação microscópica de toda a população microbiana presente na amostra, se distinguir, através do uso de fluorocromos e filtros adequados, quais os membros dessa comunidade que pertencem aos Planctomycetes.

Na técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), a fixação com paraformaldeído 4%, comparativamente a outros fixadores, confere uma maior estabilidade às células bacterianas (Zarda *et al*, 1997). A utilização de lâminas de gelatina permitiu uma melhor distribuição da amostra. A percentagem de formamida e a temperatura de hibridização e de lavagem foram consideradas as mais convenientes para a detecção de Planctomycetes (Neef *et al*, 1998).

Os resultados obtidos mostraram que na comunidade microbiana presente nas amostras e corada com o fluorocromo DAPI (Figuras 5.1-8a) era possível distinguir membros dos Planctomycetes, cujas células apresentavam fluorescência laranja (Figuras 5.1-8b). Os Planctomycetes presentes nas lamas primárias da ETAR M₁ ocorreram como células esféricas ou ovóides, com diâmetros em média à volta de 1 µm, isoladamente ou em grupos. Em todas as amostras estudadas foram observados Planctomycetes isolados (Figuras 5.1-6b), embora também se observassem ligados a agregados de partículas ou grupos de células (Figuras 5.7b e 5.8b).

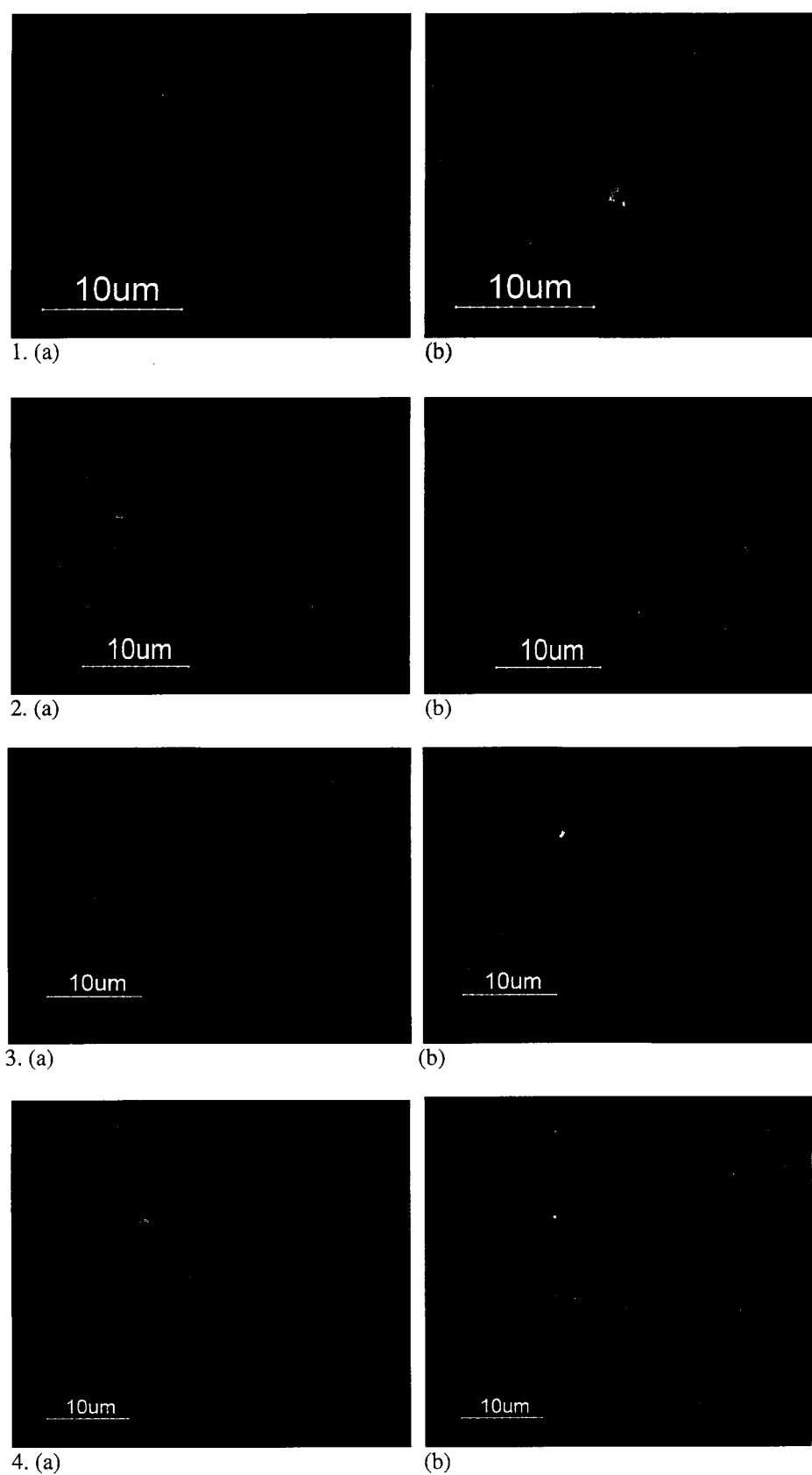


Figura 5.1-4: Detecção de Planctomycetes em amostras de lamas primárias da ETAR M₁. (a) e (b): campos idênticos de observação por microscopia de epifluorescência: (a) coloração com DAPI (0,1µm/ml); (b) hibridização *in situ* com a sonda Pla5a marcada com Cy3.

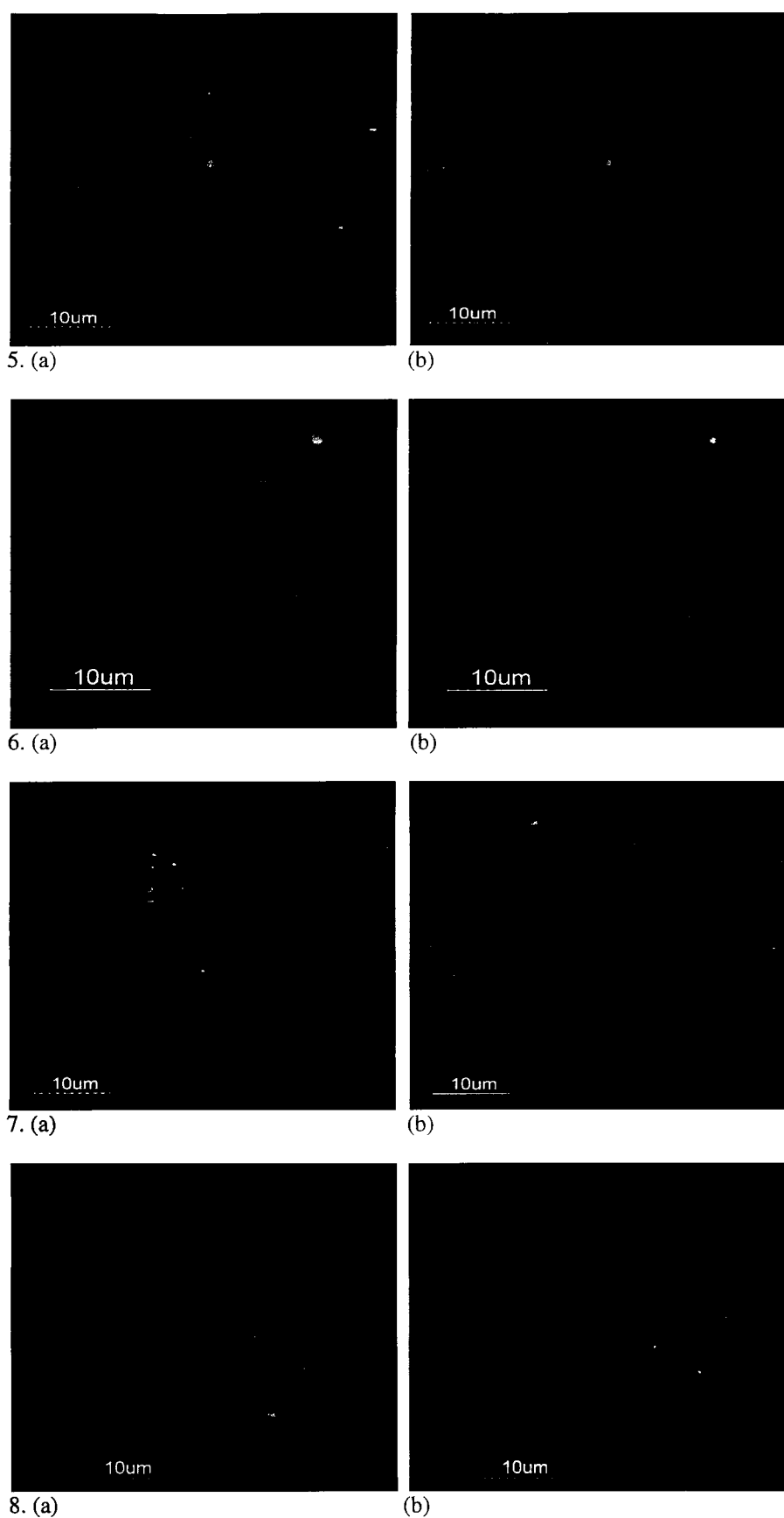


Figura 5.5-8: Detecção de Planctomycetes em amostras de lamas primárias da ETAR M₁. (a) e (b): campos idênticos de observação por microscopia de epifluorescência: (a) coloração com DAPI (0,1 μm /ml); (b) hibridização *in situ* com a sonda Pla5a marcada com Cy3.

Estes resultados permitem concluir que a hibridização *in situ* pode ser um instrumento valioso para analisar uma população específica, neste caso de Planctomycetes, na comunidade bacteriana presente num determinado habitat. Esta técnica descrita há mais de uma década (Giovannoni *et al*, 1988; DeLong *et al*, 1989; Amann *et al*, 1990) é considerada muito atractiva para a detecção e identificação de Planctomycetes tendo, nos últimos anos, sido aplicada com sucesso em variados habitats, incluindo solos e sistemas de tratamentos de águas residuais (Pernthaler *et al*, 2001).

5.2. Isolamento de *Rhizobium* sp.

Culturas puras de *Rhizobium* sp. foram obtidas, usando como inóculo colónias isoladas após impressão de secções dos nódulos radiculares na superfície de meio sólido apropriado para o isolamento de *Rhizobium* sp. A incubação foi realizada a 25 °C e após 24 horas, observaram-se colónias circulares, lisas, sem pigmentação e com aspecto viscoso que foram utilizadas como inóculo para a obtenção de novas culturas.

A morfologia das células de *Rhizobium* sp. submetidas à coloração de Gram foi observada por microscopia óptica de campo claro. Os resultados obtidos mostraram bactérias com forma bacilar, associadas aos pares, em cadeia ou em grupos mais ou menos densos, coradas de Gram-negativo (Figura 5.9). No interior das células de *Rhizobium* sp. observaram-se pequenos grânulos com forma esférica constituídos por poli- β -hidroxibutirato.

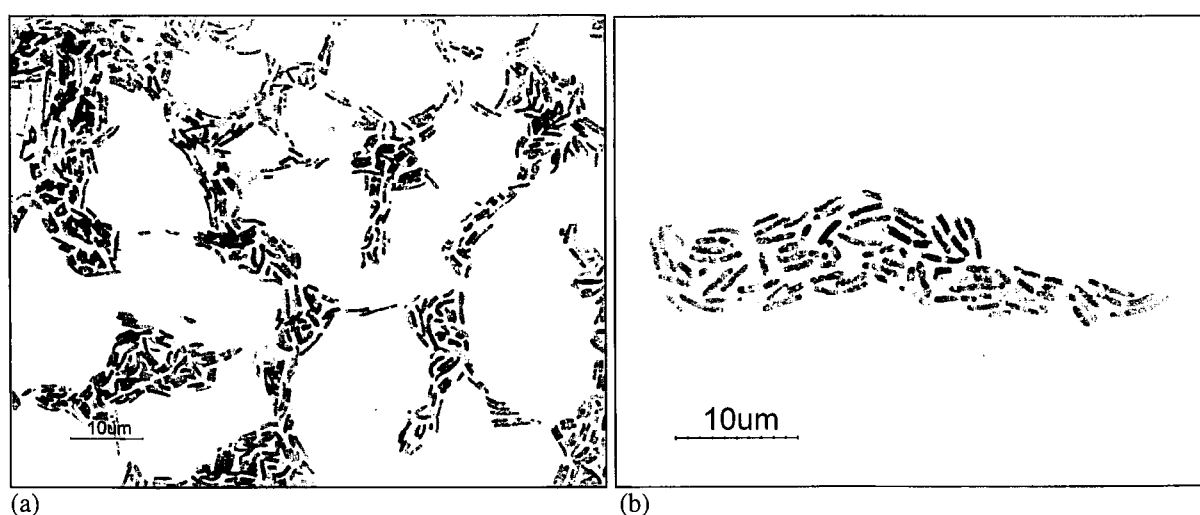


Figura 5.9: Células de *Rhizobium* sp. submetidas à coloração de Gram.

A morfologia das células, o resultado da coloração de Gram, o crescimento em meio apropriado e a morfologia das colônias forneceram informação suficiente para demonstrar o isolamento com sucesso de *Rhizobium* sp. a partir de nódulos radiculares de *Ornithopus pinnatus*.

5.3. Isolamento de bactérias nitrificantes

Culturas puras de *Nitrosomonas* sp. e de *Nitrobacter* sp. foram obtidas a partir de colônias isoladas em meio específico para o isolamento de *Nitrosomonas* sp. e de *Nitrobacter* sp. Após incubação a 25 °C durante 1-2 semanas, observaram-se colônias circulares, sem pigmentação e de diâmetro muito reduzido.

A morfologia das células de *Nitrosomonas* sp. e de *Nitrobacter* sp. submetidas à coloração de Gram, foi observada por microscopia óptica de campo claro. Os resultados obtidos mostraram bactérias com forma bacilar, com dimensões bastante reduzidas e coradas de Gram-negativo (Figuras 5.10 e 5.11).

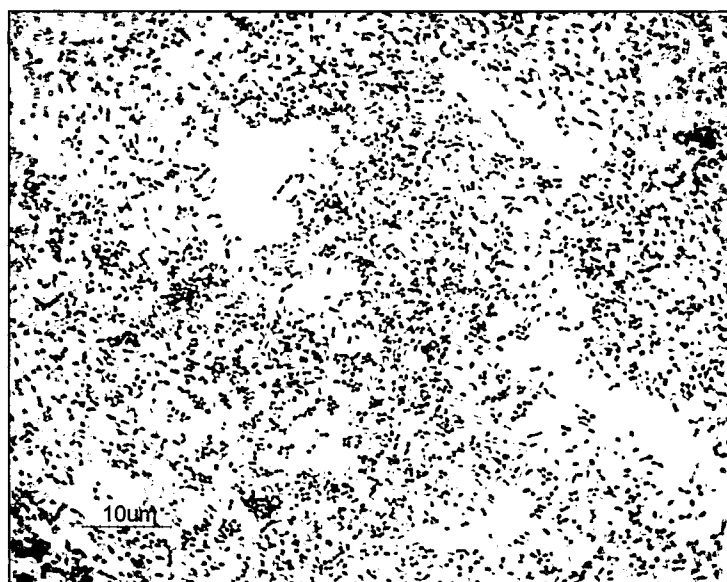


Figura 5.10: Células de *Nitrosomonas* sp. submetidas à coloração de Gram.

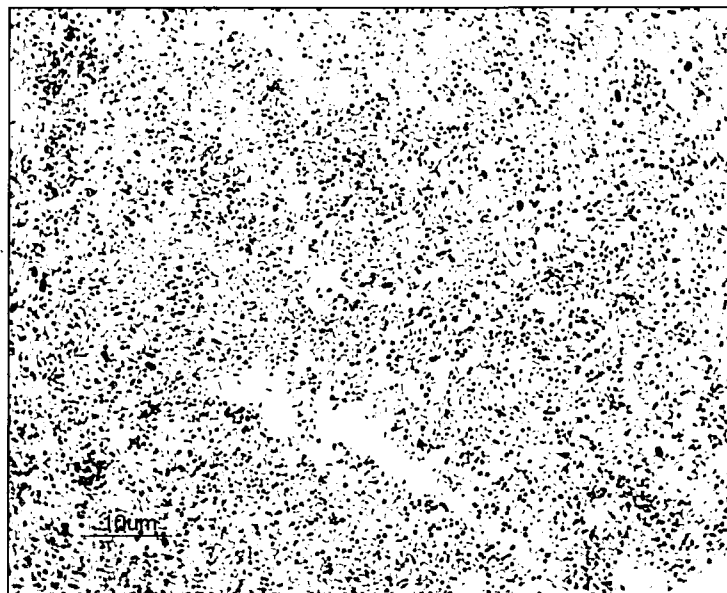


Figura 5.11: Células de *Nitrobacter* sp. submetidas à coloração de Gram.

A morfologia e dimensões das células, o resultado da coloração de Gram, o crescimento em meio selectivo e a morfologia das colónias fornecem informação suficiente para demonstrar o isolamento com sucesso de *Nitrosomonas* sp., responsável pela oxidação do amoníaco a nitrito, e de *Nitrobacter* sp., responsável pela oxidação do nitrito a nitrato, a partir de amostras de solo.

5.4. Isolamento de bactérias com capacidade de reduzir o nitrato

A partir das amostras de solo de jardim foram isoladas 36 estirpes bacterianas, oito das quais foram identificadas, através do sistema API 20E, como pertencentes a géneros bacterianos com capacidade de reduzir o nitrato (Figuras 5.12-5.19). O teste NO_3^- da galeria API 20E é de especial importância, pois permite testar a capacidade de redução do nitrato, com produção de nitrito (NO_2^-) ou de azoto molecular (N_2). A leitura do resultado foi realizada no tubo *GLU*. Após a adição dos reagentes, o desenvolvimento de uma cor vermelha indica a presença de nitrito. Uma reacção negativa (cor amarela) pode ocorrer devido à produção de azoto molecular (eventualmente assinalada pela presença de microbolhas), sendo necessário confirmar este resultado. Após a adição de zinco em pó, o desenvolvimento de uma cor amarela indica a presença de N_2 , enquanto que uma cor avermelhada indica uma reacção negativa, isto é, os nitratos presentes no tubo foram reduzidos a nitritos.

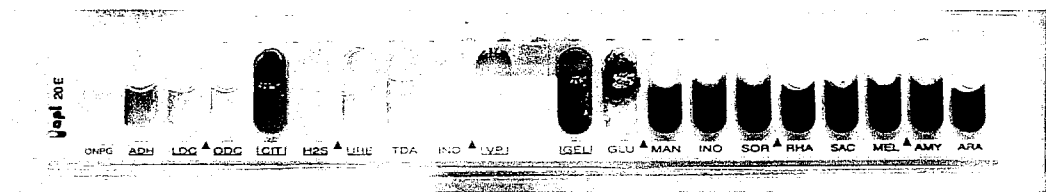


Figura 5.12: Resultado do teste API 20E para o género identificado como *Pseudomonas* (após adição de zinco no tubo GLU).

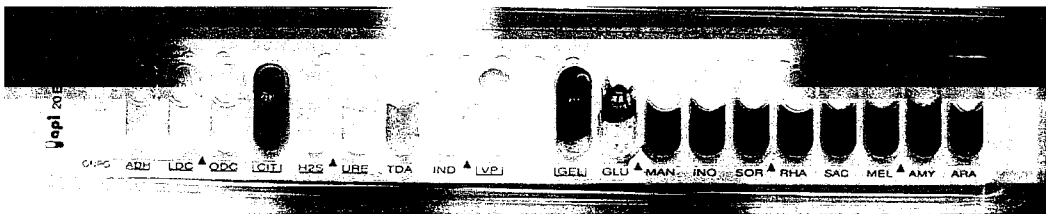


Figura 5.13: Resultado do teste API 20E para o género identificado como *Flavobacterium* (após adição de zinco no tubo GLU).

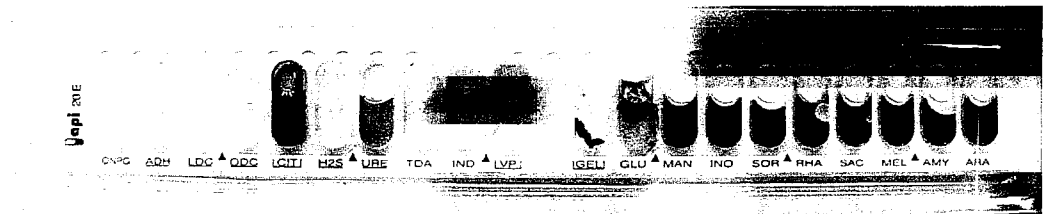


Figura 5.14: Resultado do teste API 20E para o género identificado como *Achromobacter* (após adição de zinco no tubo GLU).

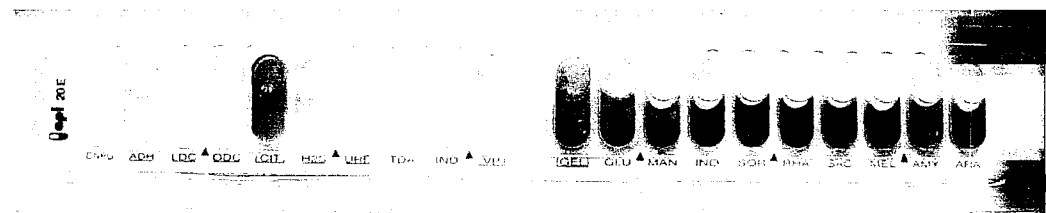


Figura 5.15: Resultado do teste API 20E para o género identificado como *Moraxella* (sem adição de zinco no tubo GLU).

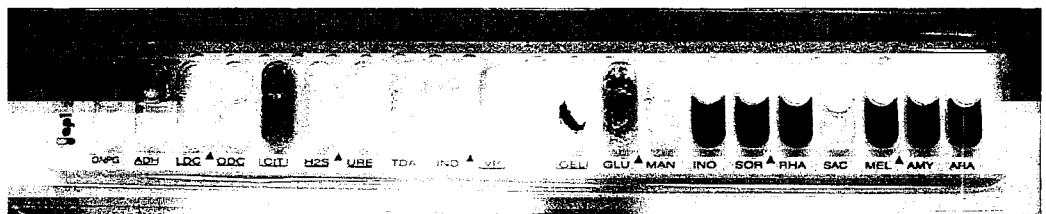


Figura 5.16: Resultado do teste API 20E para o género identificado como *Pasteurella* (após adição de zinco no tubo GLU).

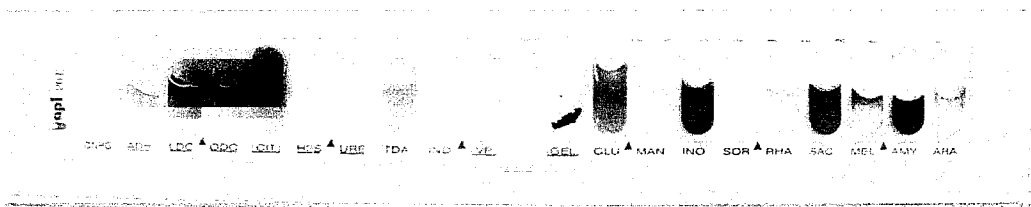


Figura 5.17: Resultado do teste API 20E para a espécie identificada como *Escherichia coli* (sem adição de zinco no tubo GLU).

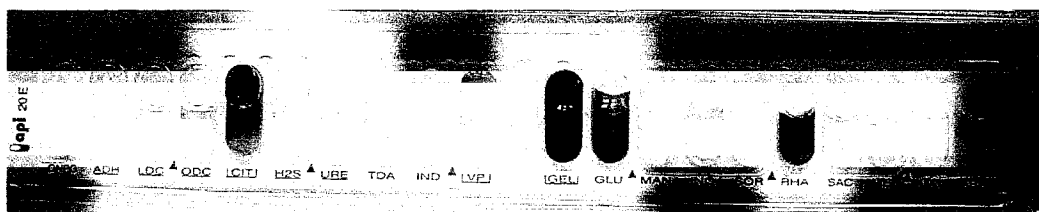


Figura 5.18: Resultado do teste API 20E para o gênero identificado como *Serratia* (sem adição de zinco no tubo GLU).

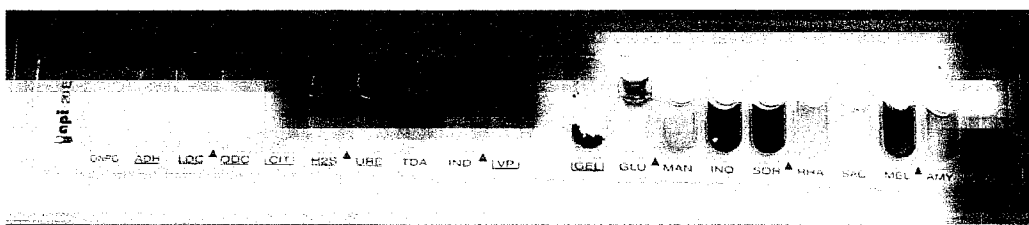


Figura 5.19: Resultado do teste API 20E para o gênero identificado como *Enterobacter* (após adição de zinco no tubo GLU).

Os resultados obtidos com o sistema API 20E permitiram concluir que as bactérias isoladas do solo e que possuíam capacidade de reduzir o nitrato (NO_3^-) a azoto molecular (N_2) pertenciam aos gêneros *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Moraxella* e *Pasteurella*, enquanto que as que possuíam capacidade de reduzir o nitrato (NO_3^-) a nitrito (NO_2^-) foram identificadas como *Escherichia coli* e *Serratia*. Foi também isolado *Enterobacter* que possui capacidade de realizar a amonificação do nitrito.

A morfologia das bactérias com capacidade de reduzir o nitrato, isoladas e identificadas através do sistema API 20E, foi observada por microscopia óptica de campo claro, após a realização de coloração de Gram.

Os resultados obtidos mostraram que as bactérias identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* surgiram como bacilos de Gram-negativo, longos e direitos, com dimensões de $0,5 \mu\text{m}$ de largura e $1,2 \mu\text{m}$ de comprimento (Figura 5.20).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Flavobacterium* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com extremidades arredondadas e com dimensões em média de 0,5 μm de largura e 0,8 μm de comprimento (Figura 5.21).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Achromobacter* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média de 0,4 μm de largura e 0,7 μm de comprimento (Figura 5.22).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Moraxella* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média 0,5 μm de largura e 1,3 μm de comprimento (Figura 5.23).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Pasteurella* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média de 0,5 μm de largura e 1,3 μm de comprimento (Figura 5.24).

As bactérias identificadas como *Escherichia coli* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média de 0,5 μm de largura e 1 μm de comprimento (Figura 5.25).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Serratia* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média de 0,4 μm de largura e 0,7 μm de comprimento (Figura 5.26).

As bactérias identificadas como pertencentes ao género *Enterobacter* surgiram como bacilos de Gram-negativo, com dimensões em média de 0,4 μm de largura e 1 μm de comprimento (Figura 5.27).

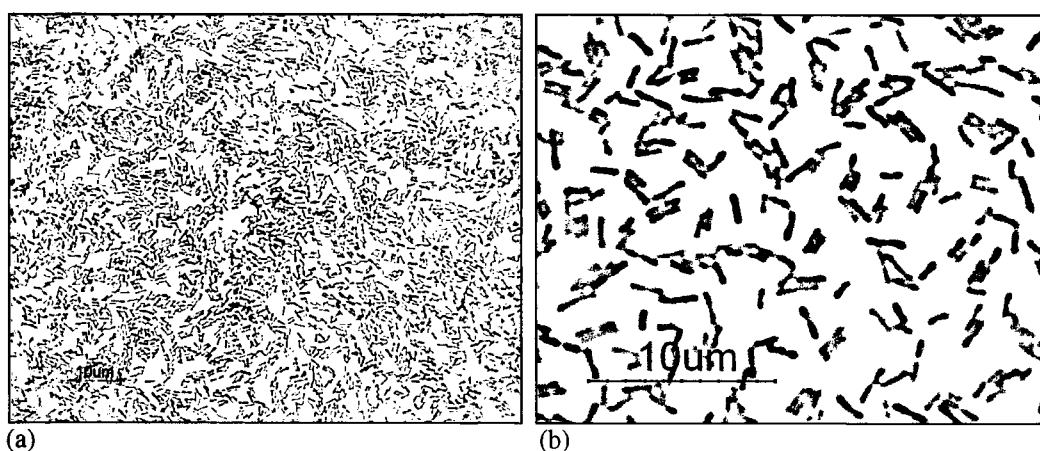


Figura 5.20: Células de *Pseudomonas* submetidas à coloração de Gram.

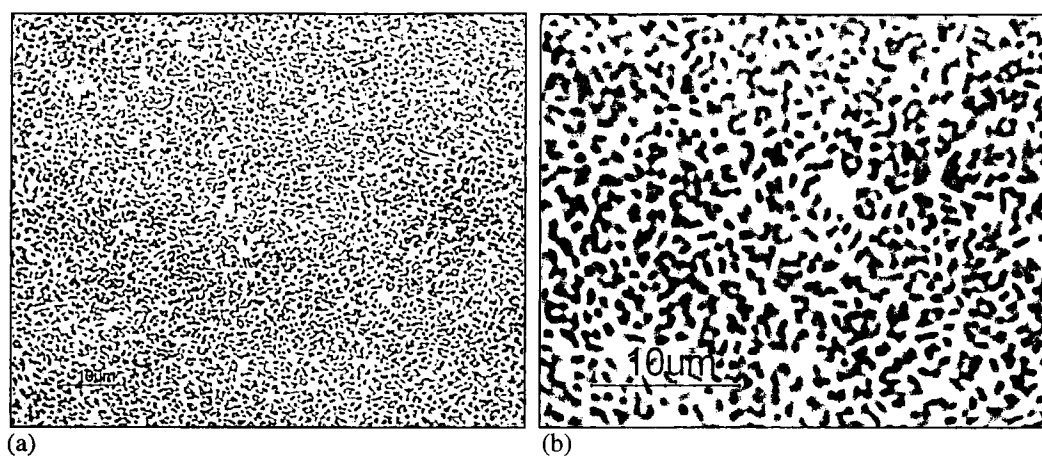


Figura 5.21: Células de *Flavobacterium* submetidas à coloração de Gram.

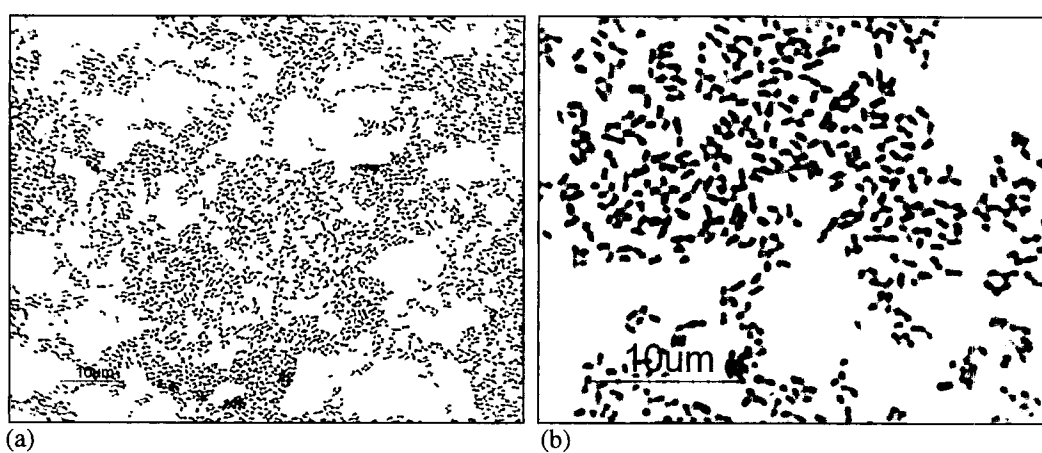


Figura 5.22: Células de *Achromobacter* submetidas à coloração de Gram.

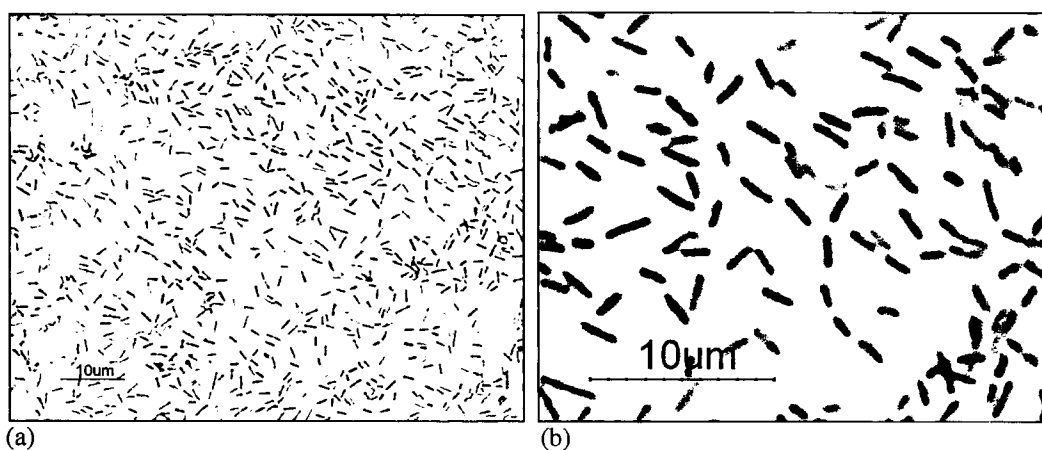


Figura 5.23: Células de *Moraxella* submetidas à coloração de Gram

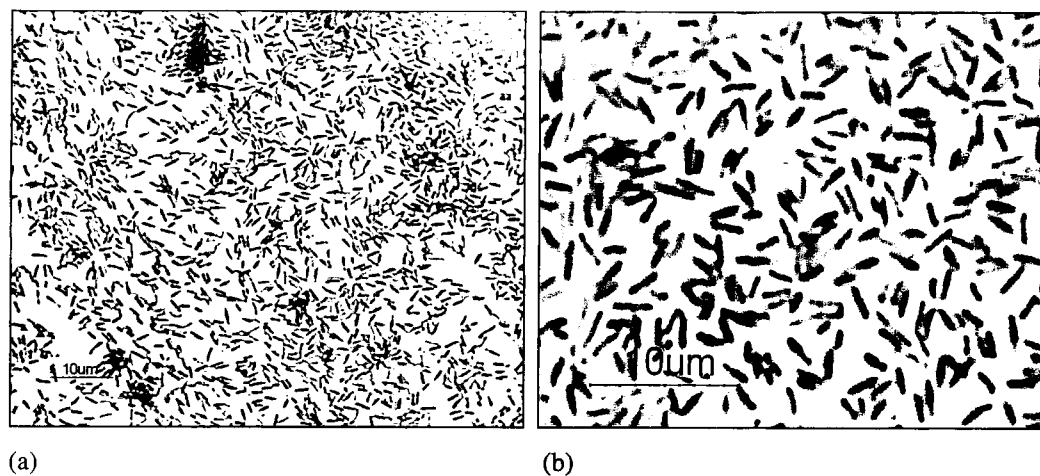


Figura 5.24: Células de *Pasteurella* submetidas à coloração de Gram.

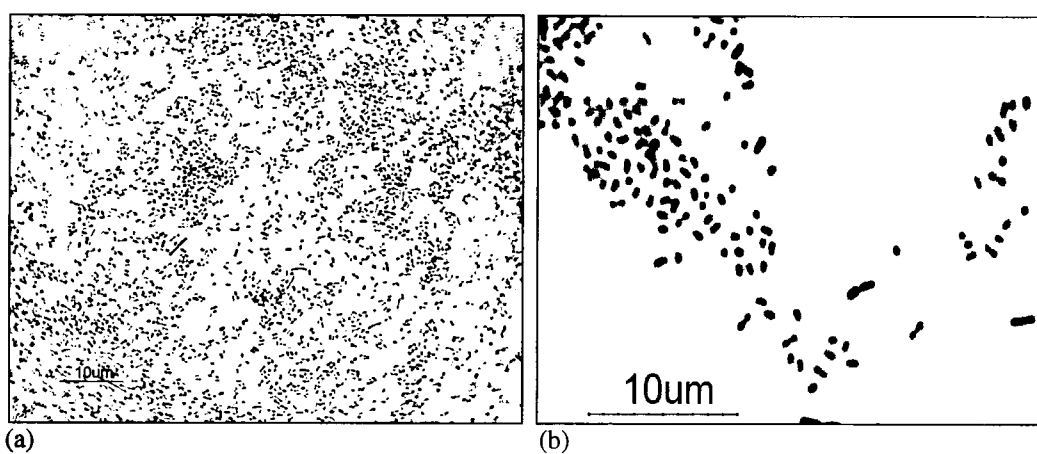


Figura 5.25: Células de *Escherichia coli* submetidas à coloração de Gram.

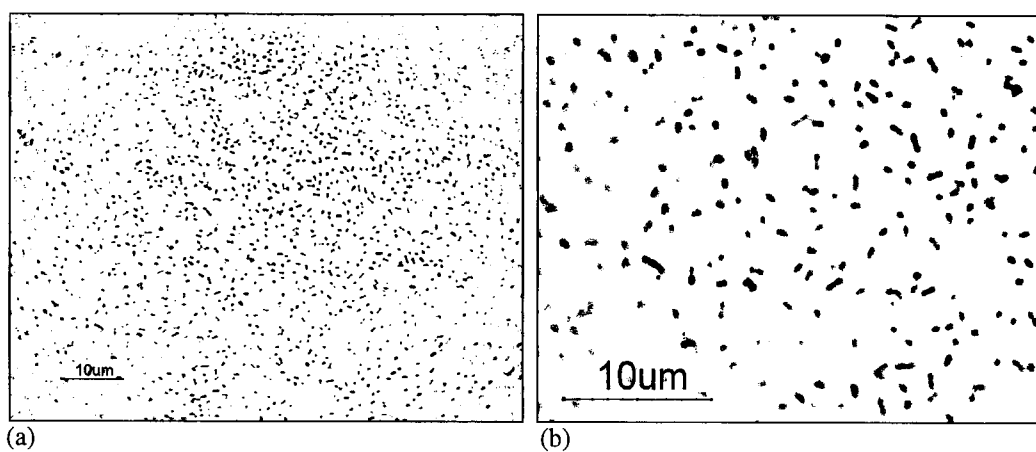


Figura 5.26: Células de *Serratia* submetidas à coloração de Gram.

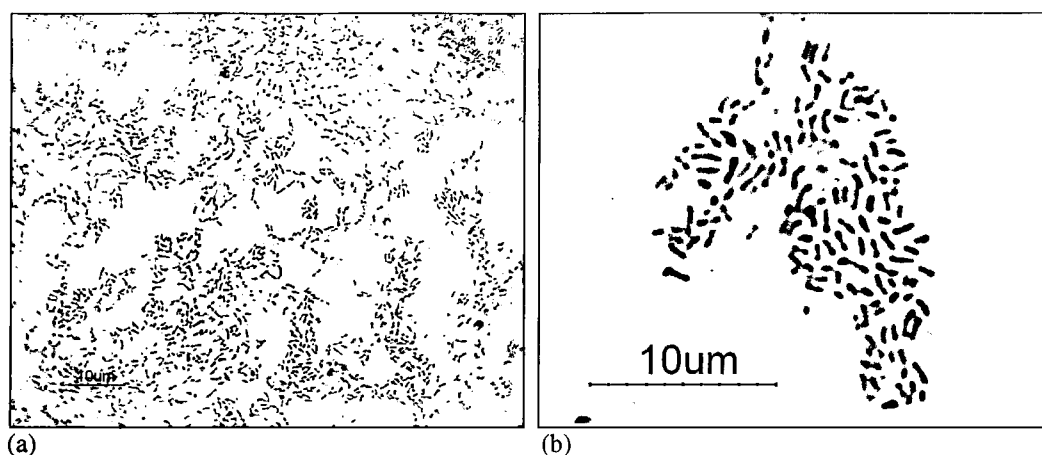


Figura 5.27: Células de *Enterobacter* submetidas à coloração de Gram.

Os resultados deste estudo mostraram que o solo é um ambiente rico para o isolamento de bactérias e que pode ser um material de estudo bastante simples para que alunos do 3º Ciclo do Ensino Básico e Secundário o utilizem para isolar e caracterizar bactérias envolvidas no ciclo do azoto.

As galerias API 20E, mostraram ser um instrumento valioso para a identificação de bactérias do solo e, pela sua aplicação simples e acessível, podem ser facilmente utilizadas pelos alunos a este nível, permitindo que estes identifiquem algumas bactérias envolvidas no ciclo do azoto, presentes no solo.

6. APLICAÇÃO NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM

6. APLICAÇÃO NO PROCESSO DE ENSINO-APRENDIZAGEM

A temática do ciclo do azoto, objecto de estudo deste trabalho, engloba uma vasta área do conhecimento e a sua aplicação em processos de ensino-aprendizagem é abrangente, permitindo uma diversidade de percursos pedagógicos.

O ciclo do azoto pode ser abordado na sua globalidade, como exemplo de um ciclo biogeoquímico, ou pode ser focalizado qualquer um dos processos que o integram, bem como os microrganismos intervenientes. Esta temática permite também enquadrar uma componente experimental, importante no ensino da Ciência, bem como fazer uma ligação entre os avanços científicos e a sua aplicação tecnológica.

Seja qual for a finalidade do processo de ensino-aprendizagem, procurou-se desenvolver um trabalho com interesse pedagógico, capaz de constituir um recurso de informação/inspiração para professores e também para alunos.

Relativamente ao conjunto de acções, estratégias e actividades a planificar pelo docente para o adequado desenvolvimento das competências em causa, reconhece-se que a decisão final sobre a melhor alternativa a seguir será do professor, em função das finalidades do seu ensino, dos alunos, da natureza do tema e do nível de tratamento do mesmo. No entanto, é consensual a utilização de um conjunto de metodologias, nomeadamente a organização do ensino com base em materiais e recursos diversificados, dando atenção a situações do quotidiano, prevendo a experimentação de técnicas, instrumentos, formas de trabalho diversificados e a utilização de fontes de informação diversas e das tecnologias da informação e comunicação. A promoção intencional de actividades dirigidas à observação e ao questionamento da realidade e à integração de saberes permitem ao aluno fazer escolhas, confrontar pontos de vista e resolver problemas, rentabilizando a autonomia, responsabilização e criatividade. A organização de actividades cooperativas de aprendizagem e projectos orientados para a integração e troca de saberes permitem que os alunos tomem consciência de si, dos outros e do meio ambiente.

Como já foi referido anteriormente, a temática do ciclo do azoto pode ser abordada nas disciplinas de Ciências Físicas e Naturais (3º Ciclo do ensino Básico), Ecologia (10º ano Ensino Secundário) e Biologia (12º ano Ensino Secundário).

Relativamente às Ciências Físicas e Naturais, o ciclo do azoto enquadra-se nos temas organizadores *Sustentabilidade na Terra* e *Viver melhor na Terra*.

No tema *Sustentabilidade na Terra*, optar pela inclusão da temática do ciclo do azoto permite estabelecer um fio condutor pertinente entre os vários sub-temas envolvidos. Esta temática deve ser explorada numa perspectiva de educação ambiental. A questão central *Por que estão os ecossistemas em equilíbrio dinâmico?* pode estar subjacente aos percursos educativos que visem a compreensão dos mecanismos fundamentais do funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas, tendo em vista o desenvolvimento de acções que contribuam para a sustentabilidade na Terra.

No sub-tema *Interacção seres vivos – ambiente*, o estudo das relações interespecíficas permite enquadrar os diversos exemplos de relações simbióticas no âmbito do ciclo do azoto. Sugere-se a discussão de exemplos concretos observados directamente (o que é perfeitamente possível no que diz respeito às plantas leguminosas envolvidas) ou através de imagens.

No sub-tema seguinte, *Fluxos de energia e ciclo de matéria*, deve ser realçada a existência nas comunidades de grupos de seres vivos com actividades que possibilitam a reciclagem permanente da matéria orgânica. Estabelecendo uma ponte com o sub-tema anterior, no qual foram referidos seres vivos intervenientes no ciclo do azoto, sugere-se agora a interpretação de um esquema simplificado do ciclo do azoto, a título exemplificativo dos ciclos biogeoquímicos.

Seguem-se as *Perturbações do equilíbrio dos ecossistemas*. A poluição constitui uma das principais causas do desequilíbrio dos ecossistemas. Fontes de poluição, agentes poluentes e consequências da poluição são vertentes a serem exploradas neste sub-tema. Sugere-se o contacto dos alunos com problemas reais, podendo constituir temas de discussão, por exemplo, o efeito de estufa, o buraco do ozono, as chuvas ácidas, entre outros. Ou seja, as alterações antropogénicas do ciclo do azoto, as suas causas e consequências, enquadram-se perfeitamente neste contexto, estabelecendo continuidade com o facto de o ciclo do azoto ter sido o exemplo de um ciclo biogeoquímico, permitindo uma visão sistémica e integradora de saberes.

No sub-tema *Gestão sustentável dos recursos*, a questão norteadora *Como podemos contribuir para a sustentabilidade da Terra?* constitui uma base de trabalho adequada para a realização de actividades de pesquisa. Uma actividade interessante é uma visita de estudo a uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR), proporcionando aos alunos o contacto com diferentes processos, nomeadamente biológicos, pelos quais é possível o tratamento das águas residuais. Aqui, é inserida novamente a temática do ciclo do azoto, seguindo a linha condutora estabelecida até então, realçando-se o envolvimento dos processos de nitrificação e desnitrificação no tratamento de águas residuais, bem como a importância

dos microrganismos responsáveis. Esta abordagem permite relacionar o conhecimento científico com as aplicações tecnológicas com vista à rentabilização dos recursos e à sustentabilidade na Terra. Permite ainda abordar os conhecimentos mais recentes relativos ao ciclo do azoto, a oxidação anaeróbia do amoníaco, e a possibilidade da sua utilização para um tratamento mais eficaz das águas residuais.

Seja qual for a abordagem escolhida pelo professor, o estudo do ciclo do azoto enquadra-se licitamente nas orientações curriculares e competências a desenvolver definidas pelo Ministério da Educação (Tabela 6.1).

Tabela 6.1: Competências essenciais definidas no Currículo Nacional do Ensino Básico para Ciências Físicas e Naturais.

<i>Sustentabilidade na Terra</i>
Reconhecimento de que a intervenção humana na Terra, ao nível da exploração, transformação e gestão sustentável dos recursos, exige conhecimento científico e tecnológico em diferentes áreas.
Discussão sobre as implicações do progresso científico e tecnológico na rentabilização dos recursos.
Compreensão de que a dinâmica dos ecossistemas resulta de uma interdependência entre seres vivos, materiais e processos.
Compreensão de que o funcionamento dos ecossistemas depende de fenómenos envolvidos, de ciclos de matéria, de fluxos de energia e da actividade de seres vivos, em equilíbrio dinâmico.
Reconhecimento da necessidade de tratamento de materiais residuais, para evitar a sua acumulação, considerando as dimensões económicas, ambientais, políticas e éticas.
Reconhecimento da importância da conservação da variabilidade de espécies para a manutenção da qualidade ambiental.
Tomada de decisão face a assuntos que preocupam as sociedades, tendo em conta factores ambientais, económicos e sociais.
Divulgação de medidas que contribuam para a sustentabilidade na Terra.

O tema *Viver melhor na Terra* permite uma visão mais alargada e até transversal e transdisciplinar da temática do ciclo do azoto. Esta pode ser abordada como problemática na realização de projectos a desenvolver em ligação com a Área Projecto inseridos no sub-tema *Ciência e Tecnologia e Qualidade de Vida*. Neste âmbito, é possível relacionar todos os conceitos envolvidos, desde a importância da diversidade dos microrganismos e dos processos biológicos no equilíbrio dos ecossistemas, até às várias causas da alteração desse equilíbrio e suas consequências ou às vias de prevenção e tratamento. Aqui será importante referir as Estações de Tratamento de Águas Residuais e os processos biológicos nelas envolvidos, nomeadamente o processo mais recentemente descoberto, a oxidação anaeróbia do amoníaco. Assim, é possível uma abordagem num movimento Ciência-Tecnologia-Sociedade-Ambiente, integrando os saberes e inovações de um modo realista e apelativo. Uma vez que a Área Projecto possui uma dimensão temporal própria e mais alargada existe a possibilidade de

inserir uma componente experimental adequadamente adaptada pelo professor de acordo com a situação de ensino-aprendizagem.

Seja qual for o caminho escolhido pelo professor, o estudo do ciclo do azoto enquadra-se licitamente nas orientações curriculares e competências a desenvolver definidas pelo Ministério da Educação (Tabela 6.2).

Tabela 6.2: Competências essenciais definidas no Currículo Nacional do Ensino Básico para Ciências Físicas e Naturais.

<i>Viver melhor na Terra</i>
Reconhecimento da necessidade de desenvolver hábitos de vida saudáveis e de segurança, numa perspectiva biológica, psicológica e social.
Reconhecimento da necessidade de uma análise crítica face às questões éticas de algumas das aplicações científicas e tecnológicas.
Conhecimento das normas de segurança e de higiene na utilização de materiais e equipamentos de laboratório e de uso comum, bem como o respeito pelo seu cumprimento.
Compreensão de como a ciência e da tecnologia têm contribuído para a melhoria da qualidade de vida.
Compreensão dos conceitos essenciais relacionados com a utilização de recursos e protecção ambiental que devem fundamentar a acção humana no plano individual e comunitário.
Valorização de atitudes de segurança e de prevenção como condição essencial em diversos aspectos relacionados com a qualidade de vida.

A nível do ensino secundário, a abordagem de conceitos pode efectuar-se a um nível mais profundo.

Em Ecologia (10º ano), o estudo do ciclo do azoto pode efectuar-se ao nível da unidade *Estrutura e Funcionamento dos Ecossistemas*, permitindo atingir as competências definidas pelo Ministério da Educação (Tabela 6.3).

Tabela 6.3: Competências essenciais definidas no Programa de Ecologia – 10 º Ano.

<i>Estrutura e Funcionamento dos Ecossistemas</i>
Perceber que o mundo vivo depende da circulação de materiais através dos ecossistemas.
Compreender que os nutrientes minerais circulam na biosfera em ciclos fechados.
Compreender que os ciclos biogeoquímicos envolvem compartimentos biológicos, geológicos e químicos, com tempos de residência distintos.
Perceber o papel do ciclo do azoto na circulação dos nutrientes.
Compreender o papel dos microrganismos na absorção dos nutrientes pelas plantas.
Discutir as alterações provocadas pelo Homem nos ciclos biogeoquímicos e as suas consequências nos sistemas naturais.
Reflectir sobre o efeito das actividades humanas sobre os ciclos biogeoquímicos.
Desenvolver uma atitude favorável relativamente à manutenção da qualidade do ambiente.

Pretende-se a formação de indivíduos conscientes dos problemas ambientais e da necessidade de assegurar um desenvolvimento sustentável, sendo necessária a aquisição de um conjunto de conhecimentos sobre o funcionamento dos processos relevantes para o funcionamento dos ecossistemas. O ciclo do azoto surge como exemplo de ciclo biogeoquímico mas, a este nível, pode ser abordado de um modo mais complexo, aprofundando-se quer os vários processos, quer a contribuição dos vários grupos de microrganismos. A importância prática deste assunto pode ser demonstrada recorrendo a fenómenos actuais que actuam em escala global relacionados com alterações provocadas pelo Homem nos ciclos biogeoquímicos, designadamente chuvas ácidas, buraco do ozono, excesso de azoto. Este tipo de abordagem permite uma visão integradora, estabelecendo a ponte entre o conhecimento e a acção.

Em Biologia (12º ano), esta temática pode ser inserida na unidade *Preservar e Recuperar o Meio Ambiente*, numa perspectiva de educação ambiental, sendo a ênfase colocada nos contaminantes do meio ambiente e seus efeitos fisiológicos e no tratamento de resíduos (Tabela 6.4).

Tabela 6.4: Competências essenciais definidas no Programa de Biologia – 12º Ano.

<i>Preservar e Recuperar o Meio Ambiente</i>
Identificação dos principais contaminantes ambientais e suas fontes e avaliação dos seus riscos para a saúde.
Compreensão das consequências dos contaminantes nos ecossistemas.
Recolha e organização de dados de natureza diversa sobre sistemas utilizados para diminuir as emissões para a atmosfera e tratamento de resíduos.
Compreensão do papel dos seres vivos na reciclagem de materiais.
Compreensão da utilização de microrganismos para a diminuição da matéria orgânica presente nos resíduos.
Aplicação de conhecimentos para interpretar problemáticas com impacto social;
Problematização de situações do dia-a-dia.
Reflexão e desenvolvimento de atitudes críticas, conducentes a tomadas de decisões fundamentadas sobre problemas ambientais causados pela actividade humana.
Valorização dos avanços científico-tecnológicos na preservação do meio ambiente.
Reconhecimento que o crescimento demográfico, a degradação ambiental e os avanços científicos e tecnológicos condicionam a qualidade de vida do Homem.

Partindo da questão central *Que soluções para os efeitos da actividade humana sobre o ambiente?*, podem formular-se novas questões orientadoras, tais como *Que actividades humanas têm contribuído para a contaminação da atmosfera, solo e água? Quais os principais contaminantes ambientais? Quais os seus efeitos no ambiente? E nas pessoas?* Os alunos podem identificar e analisar situações de desequilíbrio ambiental. Terá interesse a

interpretação de quadros, gráficos e tabelas e esquemas relativos ao funcionamento das Estações de Tratamento de Águas Residuais. A visita a uma ETAR promove a compreensão dos diferentes processos envolvidos no tratamento de resíduos e a importância dos microrganismos na reciclagem de materiais. Mais uma vez, pode estabelecer-se a ligação entre os avanços da Ciência e a sua implicação na sociedade.

Seguidamente, apresenta-se uma planificação para um conjunto de aulas que de alguma forma resume os diversos aspectos anteriormente desenvolvidos.

6.1. Uma aplicação para o ensino

Estrutura e Funcionamento dos Ecossistemas – Ciclo do Azoto
Preservar e Recuperar o Meio Ambiente

Planificação a médio prazo

Competências/Valores/Atitudes	Questões orientadoras	Estratégias															
• Conhecer o funcionamento dos processos naturais mais relevantes para o funcionamento dos ecossistemas. • Desenvolver capacidades de abstracção e de raciocínio lógico necessárias à procura de soluções. • Pesquisar, seleccionar e organizar informação, com recurso a múltiplas fontes. • Utilizar de forma crítica e responsável as tecnologias de informação e de comunicação. • Desenvolver o sentido de responsabilidade e de consciência crítica necessário à participação activa face aos desafios ambientais que se colocam. • Participar nas discussões e tomadas de decisão ponderando os riscos ambientais. • Promover a formação de indivíduos conscientes dos problemas ambientais e da necessidade de assegurar um desenvolvimento sustentável. • Desenvolver o sentido de cooperação, de respeito e de espírito de equipa necessário ao exercício de uma cidadania interventiva.	Como se caracteriza o ciclo do azoto? Quais os vários processos do ciclo do azoto? Qual o papel dos microrganismos no ciclo do azoto? Como se caracteriza a relação de simbiose entre bactérias fixadoras do azoto atmosférico e as plantas leguminosas?	• Diálogo com a turma: reflexão sobre a importância do azoto para os seres vivos. • Introdução ao ciclo do azoto: interpretação de um esquema geral do ciclo do azoto. • Trabalho por pesquisa: divisão da turma em grupos de trabalho – cada grupo efectuará pesquisa sobre um dos processos do ciclo do azoto focados anteriormente. • Interação grupal: cada um dos grupos apresenta à turma os resultados da sua pesquisa. • Elaboração conjunta de um quadro-síntese sobre o ciclo do azoto: <table><tr><th>Processo</th><th>Descrição</th><th>Microrganismos</th></tr><tr><td>Fixação biológica do azoto atmosférico</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Amonificação</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Nitrificação</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Desnitrificação</td><td></td><td></td></tr></table> • Reflexão acerca da diversidade dos microrganismos envolvidos e da sua importância - concretizar a sua existência através de imagens de vários microrganismos. • Aprofundar a importância das bactérias que estabelecem simbiose com plantas leguminosas para a assimilação de compostos azotados. • Exemplos de simbioses entre bactérias fixadoras de azoto atmosférico e plantas leguminosas: visualização de imagens de	Processo	Descrição	Microrganismos	Fixação biológica do azoto atmosférico			Amonificação			Nitrificação			Desnitrificação		
Processo	Descrição	Microrganismos															
Fixação biológica do azoto atmosférico																	
Amonificação																	
Nitrificação																	
Desnitrificação																	

• Compreender que o mundo vivo depende da circulação de materiais através dos ecossistemas. • Reconhecer a importância do azoto no mundo vivo. • Compreender o papel do ciclo do azoto na circulação de nutrientes. • Conhecer os diversos processos envolvidos no ciclo do azoto. • Compreender o papel dos microrganismos no ciclo do azoto. • Reconhecer a importância da diversidade biológica no equilíbrio dos ecossistemas. • Conhecer os novos avanços científicos no âmbito do ciclo do azoto. • Discutir as alterações provocadas pelo Homem no ciclo do azoto e as suas consequências. • Compreender o papel dos seres vivos na reciclagem de materiais. • Desenvolver uma atitude consciente, crítica e fundamentada face aos efeitos das actividades humanas sobre o ambiente. • Perspectivar soluções que contribuam para o equilíbrio ecológico. • Desenvolver uma atitude favorável relativamente à manutenção da qualidade do ambiente.	Como se formam os nódulos radiculares? Quais são as alterações provocadas pelo Homem no ciclo do azoto? Quais são as suas consequências? Como solucionar alguns desses problemas ambientais? Qual é a importância dos avanços científico-tecnológicos na preservação do meio ambiente?	sistemas radiculares com nódulos. [os alunos podem procurar obter plantas com nódulos radiculares e se possível pode proceder-se a um trabalho laboratorial para observação de <i>Rhizobium</i>]. • Interpretação do esquema representativo da formação de nódulos radiculares – explicação da dinâmica envolvida nas diversas fases. • Dinâmica metabólica da relação de simbiose: benefícios para a bactéria e para a planta. • O conhecimento científico é uma construção permanente - processo recentemente descoberto: oxidação anaeróbia de amoníaco (“anammox”) - descrição geral. • Completar o quadro-síntese sobre o ciclo do azoto elaborado anteriormente com este novo processo. • Reflexão sobre o efeito das actividades humanas no ciclo do azoto – identificação de problemas ambientais relacionados, pesquisa, recolha de dados, análise e interpretação dos mesmos. • Elaboração de um quadro-síntese com apresentação de soluções sugeridas pelos alunos: <table><tr><th>Poluente</th><th>Origem</th><th>Efeito</th><th>Solução</th></tr><tr><td></td><td></td><td></td><td rowspan="4"></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr><tr><td></td><td></td><td></td></tr></table> [Quando abordada a questão dos efluentes e do seu tratamento (ETAR), salientar o papel dos microrganismos no tratamento de águas residuais e a aplicação dos avanços científicos (“anammox”).]	Poluente	Origem	Efeito	Solução													
Poluente	Origem	Efeito	Solução																

7. CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O estudo realizado no âmbito do ciclo do azoto permitiu aprofundar os conhecimentos acerca dos diferentes processos que o caracterizam, com especial relevo para os microrganismos e reacções enzimáticas envolvidas, assim como a dinâmica entre os diversos processos e a sua importância ecológica. Um desses processos, a oxidação anaeróbia do amoníaco (“anammox”), por ser um processo descoberto na última década e portanto uma promissora área de pesquisa científica, foi um processo que mereceu um interesse muito especial neste estudo.

A componente experimental realizada neste trabalho envolveu a técnica de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH), que actualmente tem demonstrado um enorme potencial para a detecção de Planctomycetes. Esta técnica permitiu que em amostras provenientes de uma estação de tratamento de águas residuais fosse detectada a presença de bactérias deste grupo. Alguns Planctomycetes são responsáveis pela oxidação anaeróbia do amoníaco, de modo que a detecção de Planctomycetes nas amostras utilizadas revestiu-se de grande interesse e encoraja o desenvolvimento de futuros estudos para a sua identificação.

As restantes técnicas utilizadas neste trabalho permitiram o isolamento de outros microrganismos envolvidos no ciclo do azoto. Ao contrário da hibridização *in situ* com fluorescência, de maior complexidade, este conjunto de metodologias pode ser transposto para processos de ensino-aprendizagem, sendo de salientar que, dada a disponibilidade temporal e conceptual exigidas, se enquadram perfeitamente num contexto de projecto.

Considerando o ciclo do azoto na sua totalidade ou em qualquer uma das suas partes, de acordo como os objectivos definidos para a situação de ensino-aprendizagem em questão, a utilização das técnicas e dos resultados obtidos neste trabalho permitirá a concretização de conceitos por vezes abstractos, numa perspectiva de diversidade biológica e importância dos microrganismos no equilíbrio dos ecossistemas. Deste modo, os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no âmbito do estudo do ciclo do azoto contribuirão decisivamente para melhorar o desempenho dos agentes envolvidos no processo de ensino-aprendizagem: o professor, directamente, pelo investimento na formação, actualização de saberes e sua mobilização na prática docente, e o aluno, como reflexo desse investimento, com uma melhor compreensão da temática em estudo.

8. BIBLIOGRAFIA

8. BIBLIOGRAFIA

- Amann, R., Fuchs, B. M., Behrens, S. 2001. The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:231-236.
- Amann, R. I., Krumholz, L., Stahl, D. A. 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.* **172**:762-770.
- Ambarsari, H. 2001. Effectiveness of Plant Residues on Biological Nitrate Reduction: A Literature Review. Sinergy Forum - PPI Tokyo Institute of Technology.
- Arends, R. 1995. Aprendizagem Cooperativa. *Aprender a Ensinar*. McGraw Hill Lda, Lisboa. pp 365-393.
- Atlas, R. M. 1997. Principles of Microbiology. 2nd edition, McGraw Hill.
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E., Bock, E. 2002. Immunological detection of *Nitrospira*-like bacteria in various soils. *Microbial Ecology*, **43**:26-33.
- Black, J. G. 2002. Microbiology – Principles and Explorations. 5th edition, John Wiley & Sons, Inc.
- Broughton, W. J., Jabbouri, S., Perret, X. 2000. Keys to Symbiotic Harmony. *Journal of Bacteriology*, **182**:5641–5652.
- Cachapuz, A. F. 1992. Ensino das Ciências e Formação de Professores, Nº 1. *Projecto Mutare*. Universidade de Aveiro.
- Cachapuz, A. F., Jorge, M. P., Praia, J. F. 2001. Perspectivas de Ensino - Formação de Professores/Ciências. 2ª edição. Centro de Estudos de Educação em Ciência. Porto.
- Cervantes-Carrillo, F., Pérez, J., Gómez, J. 2000. Avances en la Eliminación Biológica del Nitrógeno de las Aguas Residuales. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **42**:73-82.
- Chalmers, A. F. 2000. Que es esa cosa llamada Ciencia? 3ª ed. Siglo Veintiuno de España Editores.
- Currículo Nacional do Ensino Básico. Competências Essenciais. 2001. Departamento da Educação Básica - Ministério da Educação.
- Dalsgaard, T., Canfield, D. E., Peterson, J., Thamdrup, B., Acuna-González, J. 2003. N₂ production by the anammox reaction in the anoxic water column of Golfo Dulce, Costa Rica. *Nature*, **422**:606-608.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., Pace, N. R. 1989. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for identification of single cells. *Science*, **243**:1360-1363.
- Delors, J., Al Mufti, I., Amagi, I., Carneiro, R., Chung, F., Geremek, B., Gorham, W., Kornhauser, A., Manley, M., Quero, M. P., Savané, M., Singh, K., Stavenhagen, R., Suhr, M. W., Nanzhao, Z. 2001. Learning: The Treasure Within. UNESCO Publishing.
- Devol, A. H. 2003. Solution to a marine mystery. *Nature*, **422**:575-576.
- Documento Orientador da Revisão Curricular do Ensino Secundário. 2003. Ministério da Educação.
- Drysdale, G. D., Kasan, H. C., Bux, F. 1999. Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. *Water SA*, **25**:357-362.
- Fuerst, J. A. 1995. The Planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology*, **141**:1493-1506.

- Galvão, C., Neves, A., Freire, A. M., Lopes, A. M. S., Santos, M. C., Vilela, M. C., Oliveira, M. T., Pereira, M. 2001 Ciências Físicas e Naturais, Orientações Curriculares, 3º Ciclo. Departamento da Educação Básica - Ministério da Educação.
- Giovannoni, S. J., DeLong, E. F., Olsen, G. J., Pace, N. R. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.*, **170**:720-726.
- Gomes, P. T., Carvalho, J. C., Vingada, J. V. 2003. Programa de Ecologia - 10º Ano - Curso Tecnológico de Ordenamento do Território e Ambiente. Departamento do Ensino Secundário - Ministério da Educação.
- Hurst, C. J., Crawford, R. L., Knudsen, R. G., McInervey, M. J., Stetzenback, L. D. 2002. Manual of Environmental Microbiology. 2nd edition, ASM Press.
- Jetten, M. S. M., Schmid, M., Schmidt, I., Wubben, M., van Dongen, U., Abma, W., Slikers, O., Revsbech, N. P., Beaumont, H. J. E., Ottosen, L., Volcke, E., Laanbroek, H. J., Campos-Gomez, J. L., Cole, J., van Loosdrecht, M., Mulder, J. W., Fuerst, J., Richardson, D., van dePas, K., Mendez-Pampin, R., Third, K., Cirpus, I., van Spanning, R., Bollmann, A., Nielsen, L. P., den Camp, H. O., Schultz, C., Gundersen, J., Vanrolleghem, P., Strous, M., Wagner, M., Kuenen, J. G. 2002. Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. *Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology*, **1**:51-63.
- Jetten, M. S. M., Strous, M., Van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., Van de Graaf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., Van Loosdrecht, M. C. M., Kuenen, J. G. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiology Reviews*, **22**:421-437.
- Jetten, M. S. M., Wagners, M., Fuerst, J., Van Loosdrecht, M., Kuenen, G., Strous, M. 2001. Microbiology and application of the anaerobic ammonium oxidation ('anammox') process. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**:283-288.
- Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 2001. Extraordinary Anaerobic Ammonium-Oxidizing Bacteria. *ASM News*, **67**:456-463.
- Kuypers, M. M. M., Slikers, A. O., Lavik, G., Schmid, M., Jorgensen, B. B., Kuenen, J. G., Damste, J. S. S., Strous, M., Jetten, M. S. M. 2003. Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea. *Nature*, **422**:608-611.
- Lim, D. 1998. Microbiology. 2nd edition, McGraw Hill.
- Lindsay, M. R., Webb, R. I., Strous, M., Jetten, M. S. M., Butler, M. K., Forde, R. J., Fuerst, J. A. 2001. Cell compartmentalisation in Planctomycetes: novel types of structural organisation for the bacterial cell. *Arch Microbiol*, **175**:413-429.
- Lodwig, E. M., Hosie, A. H. F., Bourdés, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downiw, J. A., Poole, P. S. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature*, **422**:722-726.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. 1997. Biology of Microorganisms (Brock). 8th edition, Prentice Hall Inc.
- Mendes, A. M. P., Rebelo, D. H. V., Pinheiro, E. J. G. 2002. Projecto de Programa de Biologia - 12º Ano - Curso Geral de Ciências Naturais. Departamento do Ensino Secundário - Ministério da Educação.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., Schleifer, K. H. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: *in situ* detection of Planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology*, **144**:3257-3266.
- Parsons, R. 2002. Nodule function and regulation in the *Gunnera*-*Nostoc* symbioses. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, **1**:41-43.
- Patriarca, E. J., Tatè, R., Iaccarino, M. 2002. Key Role of Bacterial NH₄⁺ Metabolism in *Rhizobium*-Plant Symbiosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2**:203-222.
- Pelczar, M. J. Jr., Chan, E. C. S., Krieg, N. R. 1993. Microbiology - concepts and applications. McGraw Hill Inc.

- Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. 2002. Fluorescence *in situ* Hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the Identification of Marine Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **6**:3094–3101.
- Pernthaler, J., Glöckner, F. O., Schönhuber, W., Amann, R. 2001. Fluorescence *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In J. Paul (ed.), *Methods in Microbiology: Marine Microbiology*, **30**. Academic Press Ltd, London.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. 2002. Microbiology. 5th edition. McGraw-Hill.
- Pynaert, K., Smets, B. F., Wyffels, S., Beheydt, D., Siciliano, S. D., Verstraetel, W. 2003. Characterization of an Autotrophic Nitrogen-Removing Biofilm from a Highly Loaded Lab-Scale Rotating Biological Contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, **6**:3626–3635.
- Relatório do Estado do Ambiente 2001. 2002. Instituto do Ambiente.
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lünsdorf, H., Deckwer, W. D. 2000. Effect of Oxygen on Formation and Structure of *Azotobacter vinelandii* Alginate and Its Role in Protecting Nitrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, **9**:4037–4044.
- Schalk, J., Devries, S., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 2000. A novel hydroxylamine oxidoreductase involved in the anammox process. *Biochemistry*, **39**:5405–5412.
- Schmid, M., Schmitz-Esser, S., Jetten, M., Wagner, M. 2001. 16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and *in situ* detection. *Environmental Microbiology*, **3**:450–459.
- Schmid, M., Walsh, K., Webb, R., Rijpstra, W. I. C., Van de Pas-Schoonen, K., Verbruggen, M.J., Hill, T., Moffett, B., Fuerst, J., Schouten, S., Damsté, J. S. S., Harris, J., Shaw, P., Jetten, M., Strous, M. 2003. Candidatus *Scalindua brodae*, sp. nov., Candidatus *Scalindua wagneri*, sp. nov., Two New Species of Anaerobic Ammonium Oxidizing Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, **4**:529–538.
- Schmidt, I., Bock, E. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Archives of Microbiology*, **167**:106–111.
- Schmidt, I., Sliekers, O., Schmid, M., Cirpus, I., Strous, M., Bock, E., J. Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 2002. Aerobic and anaerobic ammonia oxidizing bacteria-competitors or natural partners? *FEMS Microbiology Ecology Reviews* **39**:175–181.
- Shivaraman, N., Shivaraman, G. 2003. Anammox – A novel microbial process for ammonium removal. *Current Science*, **12**:1507–1508.
- Smil, V. 1997. Global Population and the Nitrogen Cycle. *Scientific American*, July, 76–81.
- Soto-Urúza, L., Baca, B. E. 2001. Mecanismos de Protección da la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, **43**:37–49.
- Stanier, R. J., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L., Painter, P. R., 1987. General Microbiology. 5th edition, Macmillan Press Ltd.
- Strous, M. 1999. Anammox: Bad luck or the tip of the iceberg. Pacific Fórum.
- Strous, M., Fuerst, J., Kramer, E., Logemann, S., Muyzer, G., Van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature*, **400**:446–449.
- Strous, M., Kuenen, J. G., Jetten, M. S. M. 1999. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Applied and Environmental Microbiology*, **65**:3248–3250.
- Strous, M., Van Gerven, E., Kuenen, J. G., Jetten, M. 1997. Effects of Aerobic and Microaerobic Conditions on Anaerobic Ammonium-Oxidizing (Anammox) Sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, **6**:2446–2448.

- Thamdrup, B., Dalsgaard, T. 2002. Production of N_2 through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**:1312-1318.
- Trimmer, M., Nicholls, J. C., Deflandre, B. 2003. Anaerobic Ammonium Oxidation Measured in Sediments along the Thames Estuary, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, **11**:6447-6454.
- Van de Graaf, A. A., Mulder, A., De Bruijn, P., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic Oxidation of Ammonium Is a Biologically Mediated Process. *Applied and Environmental Microbiology*, **4**:1246-1251.
- Van Hove, C., Lejeune, A. 2002. The *Azolla-Anabaena* Symbiosis. *Biology and Environment: Proceeding of the Royal Irish Academy*, **1**:23-26.
- Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., Tilman, G. D. 1997. Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Causes and Consequences. *Ecological Applications*, **7**:737-750.
- Zahran, H. H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under Severe Conditions and in an Arid Climate. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **4**:968-989.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R. I., Zeyer, J. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. *Arch Microbiol*, **168**:185-192.
- Zehr, J. P., Ward, B. B. 2002. Nitrogen Cycling in the ocean: New perspectives on processes and paradigms. *Applied and Environmental Microbiology*, **3**:1015-1024.