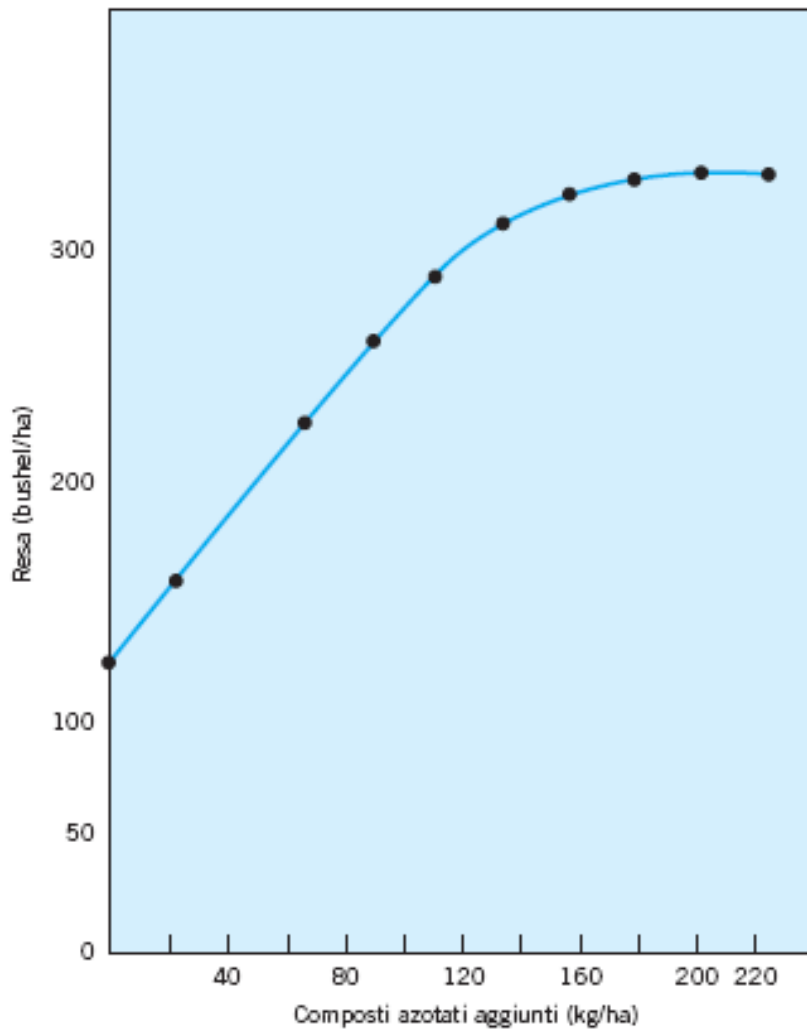


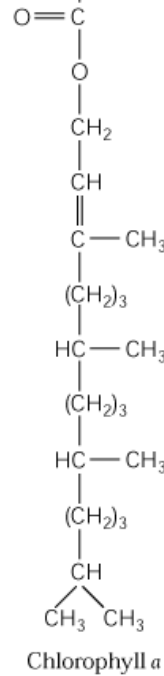
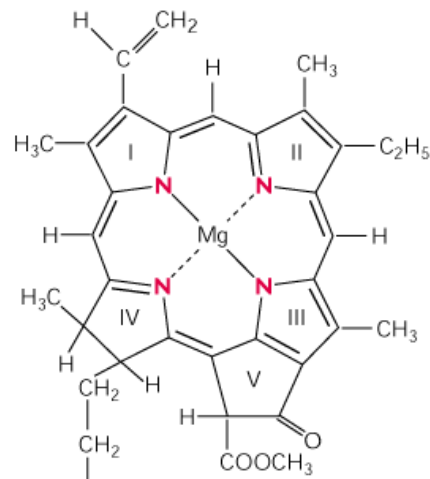
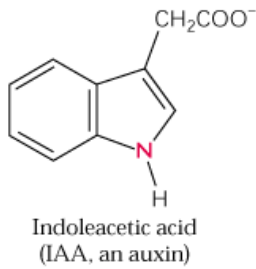
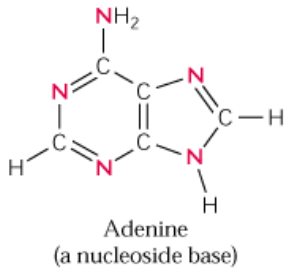
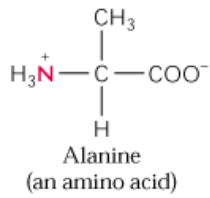
# **Acquisizione e assimilazione dell'azoto**



**FIGURA 8.13** Effetto dell'applicazione di fertilizzanti azotati sulla produttività del mais (in *bushels/ha*)<sup>4</sup>.



1 bushel (barile) = 25.4 kg di mais



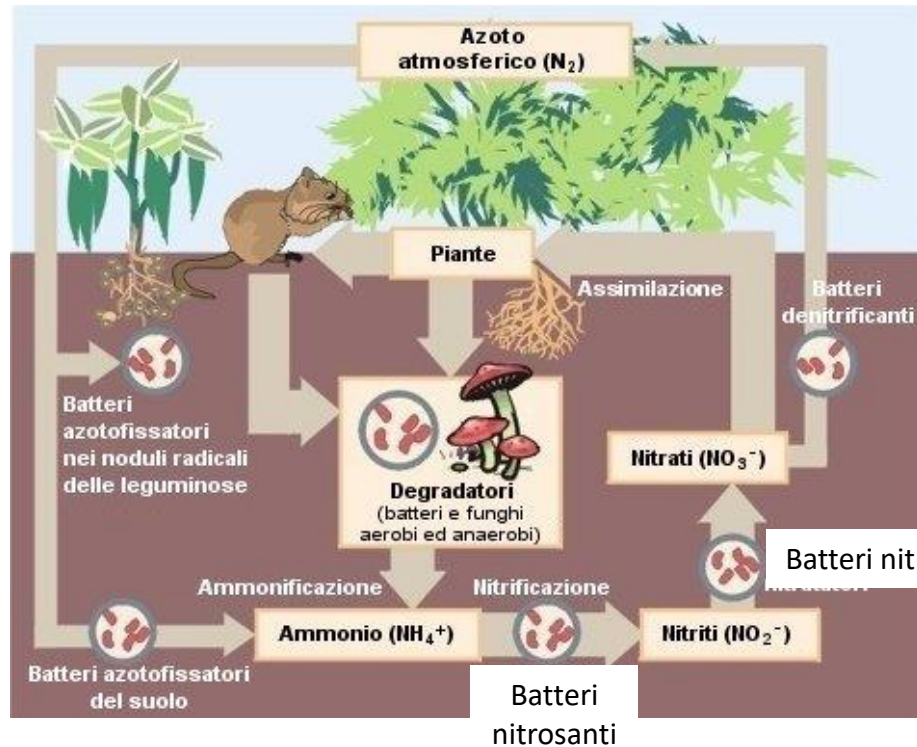
L'azoto è incorporato in composti organici essenziali

# I DIVERSI STATI DI OSSIDAZIONE DELL'AZOTO

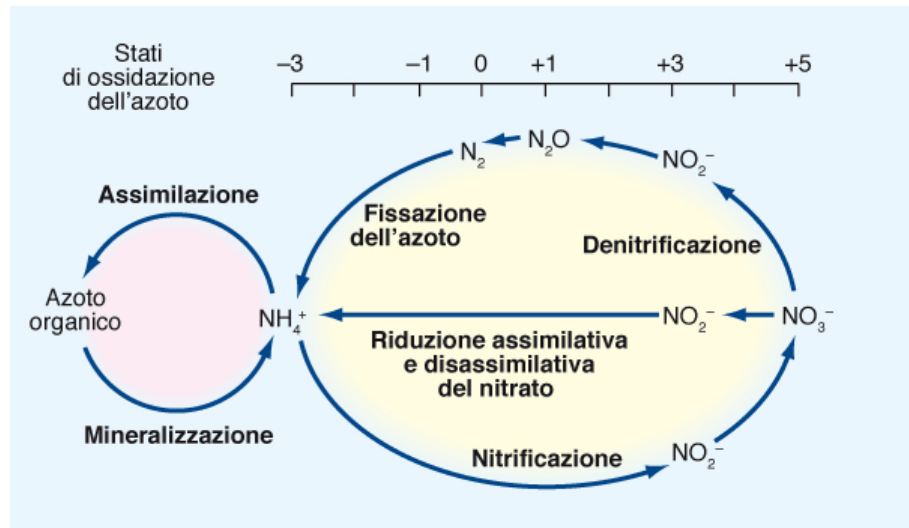
TABELLA 5.1.  
*Stati di ossidazione dell'atomo di azoto*

Numero di ossidazione	Composto	Ossiacidi
+5	Pentossido di diazoto o anidride nitrica ( $N_2O_5$ )	Acido nitrico ( $HNO_3$ )
+4	Biossido d'azoto ( $NO_2$ )	
+3	Triossido di azoto o anidride nitrosa ( $N_2O_3$ )	Acido nitroso ( $HNO_2$ )
+2	Ossido di azoto ( $NO$ )	
+1	Ossido di diazoto o Protossido d'azoto ( $N_2O$ )	
0	Azoto molecolare ( $N_2$ )	
-1	Idrossilammina ( $NH_2OH$ )	
-2	Idrazina ( $NH_2NH_2$ )	
-3	Ammoniaca ( $NH_3$ )	

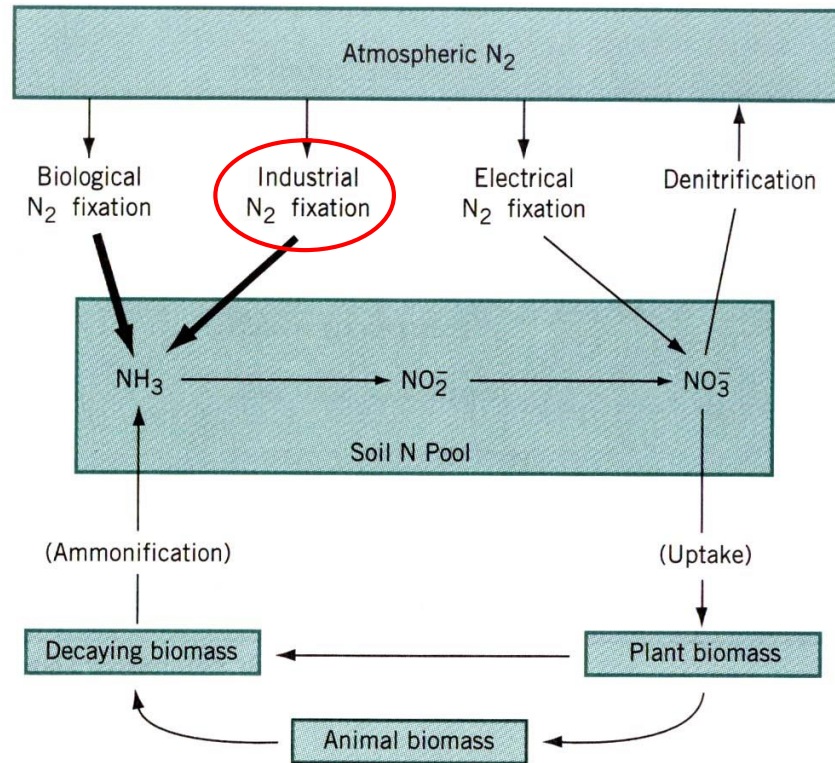
# L'azoto è presente nella biosfera in diverse forme: il ciclo dell'azoto



+ fissazione industriale di  $N_2$

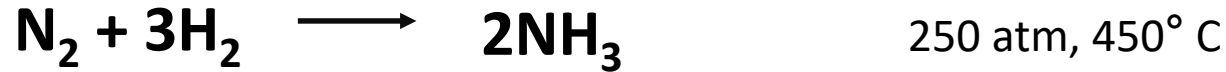


# INTERCONVERSIONE TRA LE VARIE FORME



**FIGURE 6.1** The nitrogen cycle, illustrating relationships between the three principal nitrogen pools: atmospheric, soil, and biomass.

L'atmosfera contiene grandi quantità di azoto molecolare non direttamente disponibile agli organismi viventi



Fissazione industriale (Haber-Bosch)

**Batteri e Cianobatteri** 

Fissazione biologica dell'azoto  
T ambiente e P atmosferica

# PRINCIPALI PROCESSI NEL CICLO DELL'AZOTO

**TABELLA 12.1**  
Principali processi nel ciclo biogeochimico dell'azoto

Processo	Definizione	Tasso ( $10^{12}$ g anno <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>
Fissazione industriale	Conversione industriale di azoto molecolare in ammoniaca	80
Fissazione atmosferica	Fulmini e conversione fotochimica di azoto molecolare in nitrati	19
Fissazione biologica	Conversione procariotica di azoto molecolare in ammoniaca	170
Assorbimento dalle piante	Assorbimento dalle piante e assimilazione di ammonio o nitrato	1200
Immobilizzazione	Assorbimento microbico e assimilazione di ammonio o nitrati	N/C
Ammonificazione	Catabolismo di sostanza organica in ammonio per opera di funghi e batteri	N/C
Anammox	Ossidazione anaerobica dell'ammonio: conversione batterica dell'ammonio e del nitrato in azoto molecolare	N/C
Nitrificazione	Ossidazione dell'ammonio in nitrito per opera dei batteri ( <i>Nitrosomonas</i> sp.) e successiva ossidazione batterica ( <i>Nitrobacter</i> sp.) del nitrito in nitrato	N/C
Mineralizzazione	Catabolismo di sostanza organica per opera di funghi e batteri in azoto minerale tramite processi di ammonificazione o nitrificazione	N/C
Volatilizzazione	Perdita fisica di ammoniaca gassosa nell'atmosfera	100
Fissazione dell'ammonio	Incorporazione fisica dell'ammonio nelle particelle del suolo	10
Denitrificazione	Conversione batterica del nitrato in ossido d'azoto e azoto molecolare	210
Percolamento di nitrato	Flusso di nitrato disciolto nelle acque profonde, lontano dal suolo di superficie e trasporto finale negli oceani	36

30% } N<sub>2</sub> che  
10% } rientra  
60% } negli  
ecosiste  
mi  
acquati  
ci e  
terrestri

*Nota:* Gli organismi terrestri, il suolo e gli oceani contengono rispettivamente  $5,2 \times 10^{15}$  g;  $95 \times 10^{15}$  g e  $6,5 \times 10^{15}$  g di azoto organico attivo nel ciclo. Assumendo costante la quantità di N<sub>2</sub> atmosferico (input = output) il tempo medio di persistenza, la quantità media di tempo che una molecola di azoto rimane in forma organica, è di circa 370 anni [(quantità totale)/(input di fissazione) =  $(5,2 \times 10^{15} \text{ g} + 95 \times 10^{15} \text{ g}) / (80 \times 10^{12} \text{ anni}^{-1} + 19 \times 10^{12} \text{ anni}^{-1} + 170 \times 10^{12} \text{ anni}^{-1})$ ] (Schleisinger 1991).

<sup>a</sup>N/C, non calcolato.



Ciclo stabile da almeno 2,7 miliardi di anni

**Fortemente perturbato dalle attività umane negli ultimi cento anni:**

- utilizzo di metodi industriali per la riduzione dell'azoto molecolare
- nuove pratiche agricole per la produzione intensiva di cereali
- uso dei combustibili fossili

**La fissazione dell'azoto è aumentata rispetto al ciclo naturale.**

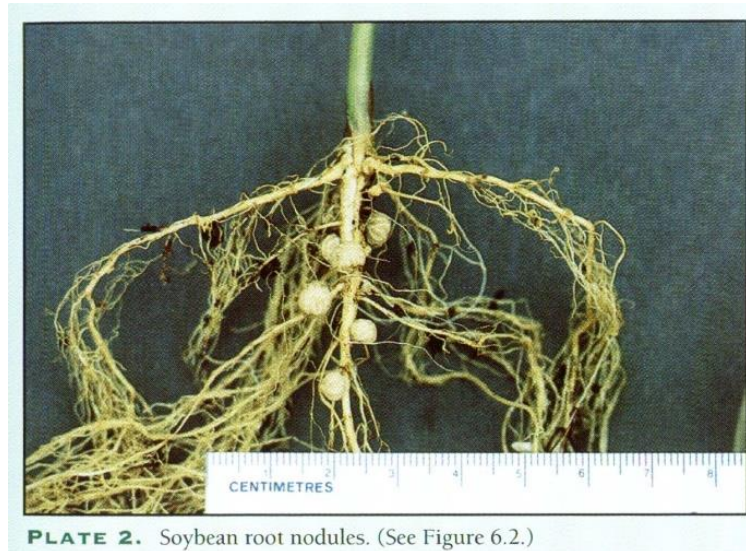
**Effetti ecologici:**

- eutrofizzazione
- aumento della concentrazione di ossido nitroso ( $N_2O$ ) in atmosfera (gas serra)

**È possibile ridurre l'impatto umano sul ciclo dell'azoto?**

Diminuendo l'uso dei fertilizzanti, aumentando la rotazione delle colture, usando piante che abbiano meno bisogno di fertilizzanti

**Le piante** possono organizzare l'azoto atmosferico solo in simbiosi con micro-organismi

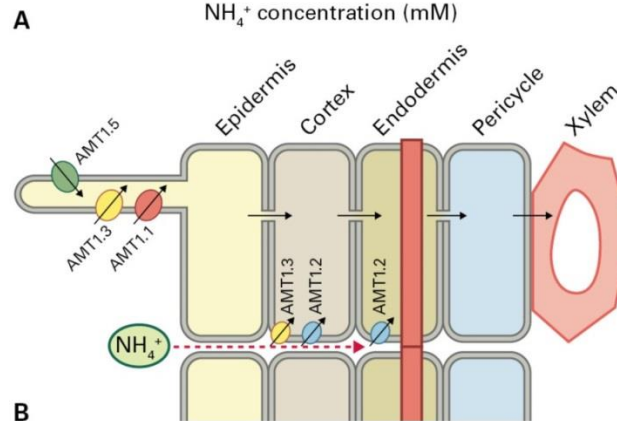
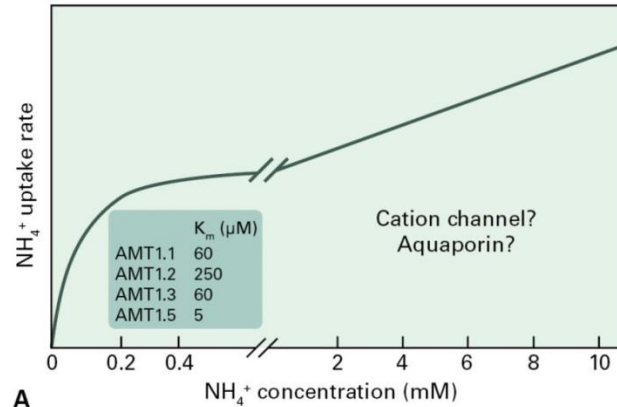


Le piante possono utilizzare autonomamente come fonte di azoto:  
**Nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )** o **Ammonio ( $\text{NH}_4^+$ )** presenti nei suoli

Quando disponibile,  $\text{NH}_4^+$  assorbito maggiormente di  $\text{NO}_3^-$  (anche se questo è presente). Due sistemi di **trasporto passivo**:

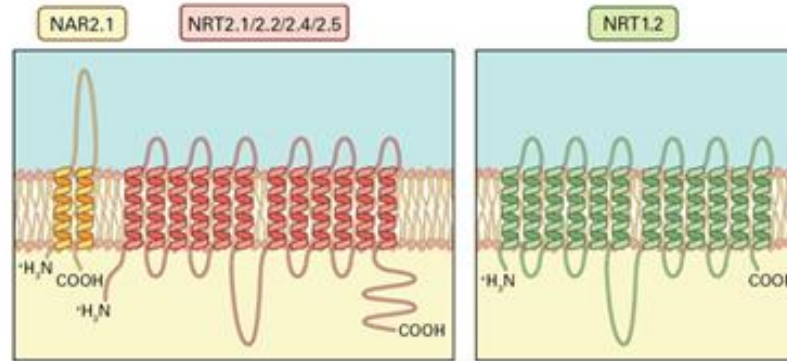
- Trasportatori AMT1 (uniporto) del plasmalemma

- Canali per  $\text{K}^+$  poco selettivi/aquaporine

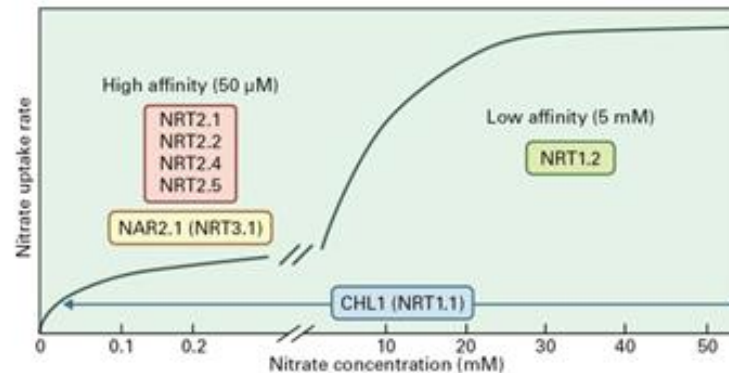


**FIGURE 16.27** Ammonium uptake. (A) Uptake by the high-affinity system demonstrates Michaelis-Menten kinetics, and uptake by the low-affinity systems demonstrates nonsaturating kinetics. In Arabidopsis, four ammonium transporters (AMT1.1, AMT1.2, AMT1.3, and AMT1.5) are involved in high-affinity uptake. The proteins required for low-affinity uptake have not been identified. (B) Schematic illustration of spatial expression pattern of Arabidopsis ammonium transporters in roots.

# Il **nitrate** viene trasportato **attivamente** nelle cellule della radice

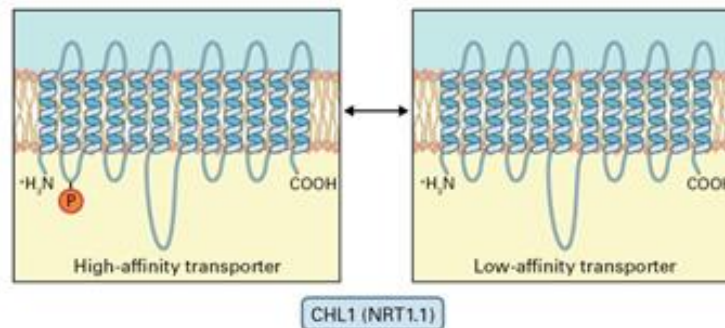


Cinetica di assorbimento con due fasi di saturazione



**Simporto**, con sistemi ad alta e bassa affinità

In *Arabidopsis*: trasportatore con affinità duale

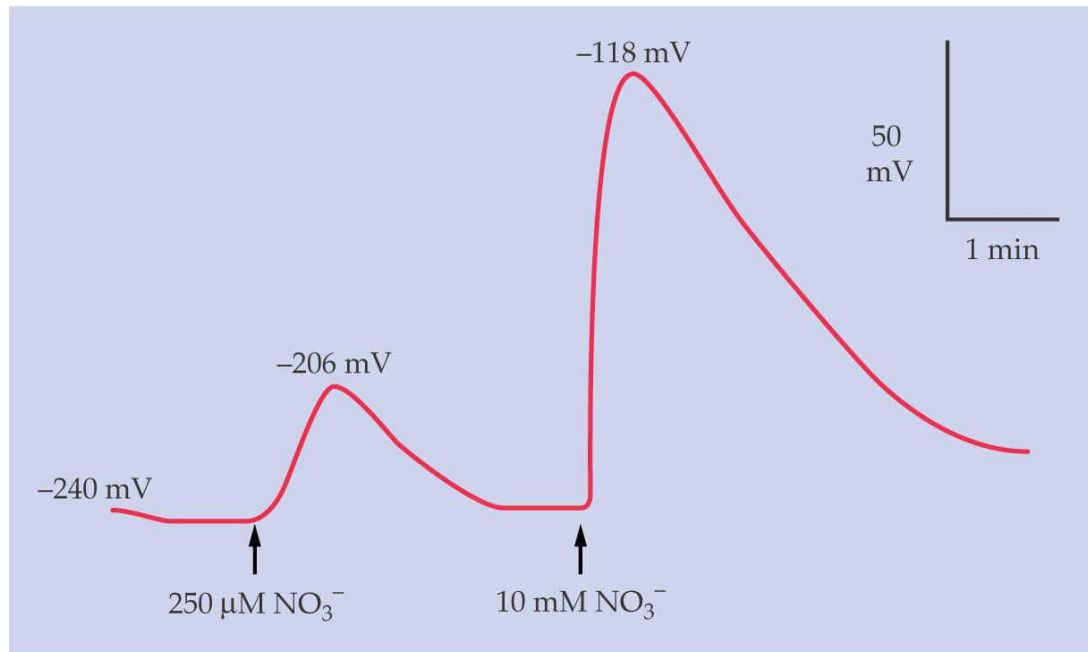


**FIGURE 16.31** Kinetics of nitrate uptake. Nitrate uptake displays two saturated phases, with  $K_m$  in the micromolar range for the high-affinity system and in the mM range for the low-affinity system. In *Arabidopsis*, CHL1 (AtNRT1.1; shown in blue) is a dual-affinity nitrate transporter involved in both high- and low-affinity uptake, with the two action modes switched by phosphorylation/dephosphorylation of T101. AtNRT2.1 and AtNRT2.2 (shown in red) associated with AtNAR2.1 (shown in yellow) are involved in high-affinity uptake, while AtNRT1.2 (shown in green) participates in low-affinity uptake.

$\text{NO}_3^-$  viene assorbito contro un gradiente di potenziale elettrochimico  
Potenziale di membrana delle cellule della radice: da -100 a -250 mV  
[ $\text{NO}_3^-$ ] nel suolo = 0.1-1 mM, [ $\text{NO}_3^-$ ] nelle cellule della radice = 2-5 mM

In caso di trasporto passivo, [ $\text{NO}_3^-$ ] nel suolo dovrebbe essere pari ad almeno 50 mM per superare un  $\Delta E = -60$  mV e mantenere [ $\text{NO}_3^-$ ] nella cellula pari a 5 mM.

Con  $\Delta E = -120$  mV, [ $\text{NO}_3^-$ ] nel suolo dovrebbe essere pari a 500 mM



**Co-trasporto elettrogenico.** Il nitrato entra nella cellula in simporto con due protoni

Sul tonoplasto: antiportatore AtCLC, accumulo nitrato nel vacuolo. Espresso soprattutto nella lamina fogliare

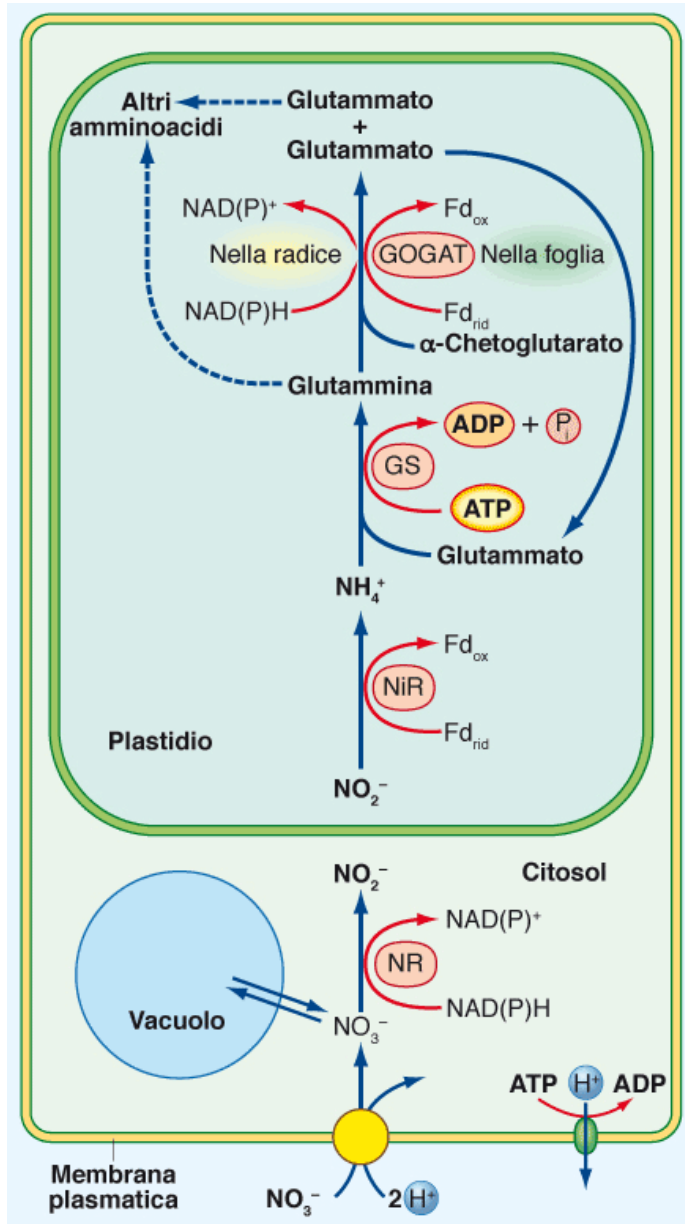
## Destino del NITRATO nel citosol di cellule radicali:

- Vacuoli (riserva)
- Riduzione assimilativa nelle cellule radicali (aa di trasporto: ammidi e ureidi)
- Caricamento xilematico e riduzione assimilativa nelle foglie

# ASSIMILAZIONE DEL NITRATO

- Riduzione del Nitrato a Nitrito (citosol)
- Riduzione del Nitrito ad Ammonio (plastidi)
- Organizzazione dell'Ammonio in Amminoacidi

# RIDUZIONE ASSIMILATIVA DEL NITRATO



Glutammato sintasi (GOGAT)

Glutammato sintetasi (GS)

Nitrito reduttasi (NiR)

Nitrato reduttasi (NR)



# Riduzione del nitrato a nitrito (citosol)

## NITRATO REDUTTASI

Omodimero costituito da 2 subunità proteiche di ca. 100 kDa



Presente sia nelle radici che nelle foglie

# Regolazione della nitrato reduttasi

Sintesi e attività della NR:

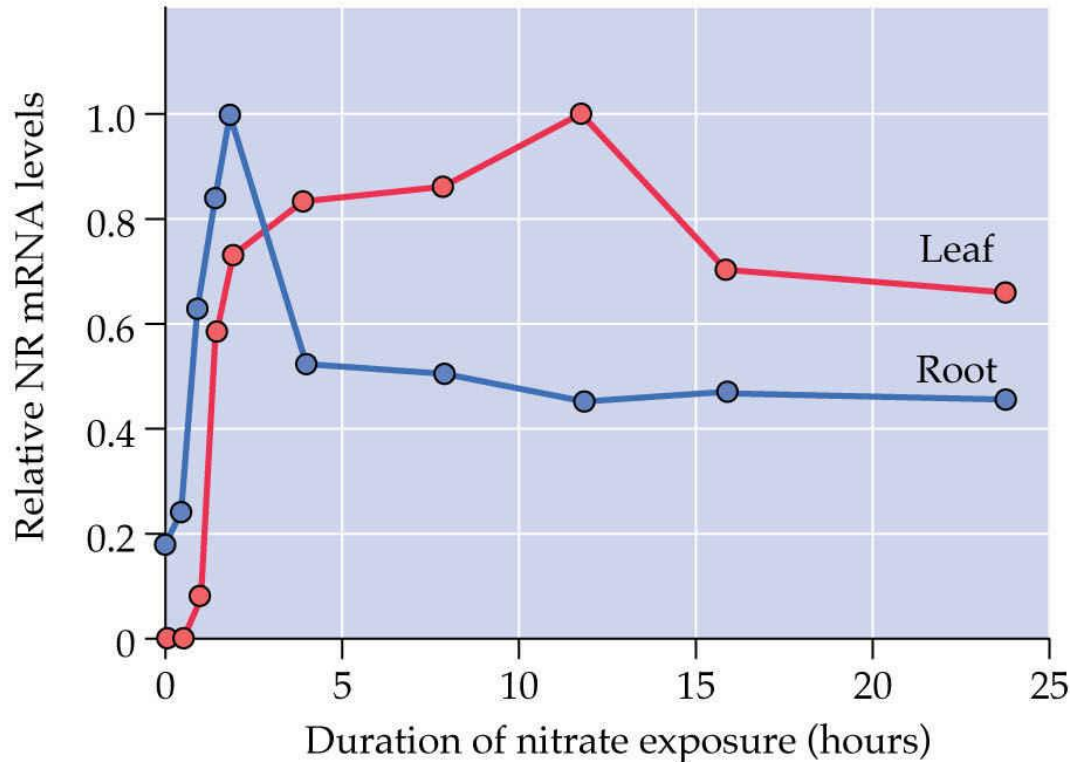
Aumentano se bassi livelli di glutammina e elevata quantità di nitrato,

Diminuiscono se alti livelli di glutammina e bassa q. di nitrato

Inibite dall' $\text{NH}_4^+$  (inibisce sintesi di ATP)

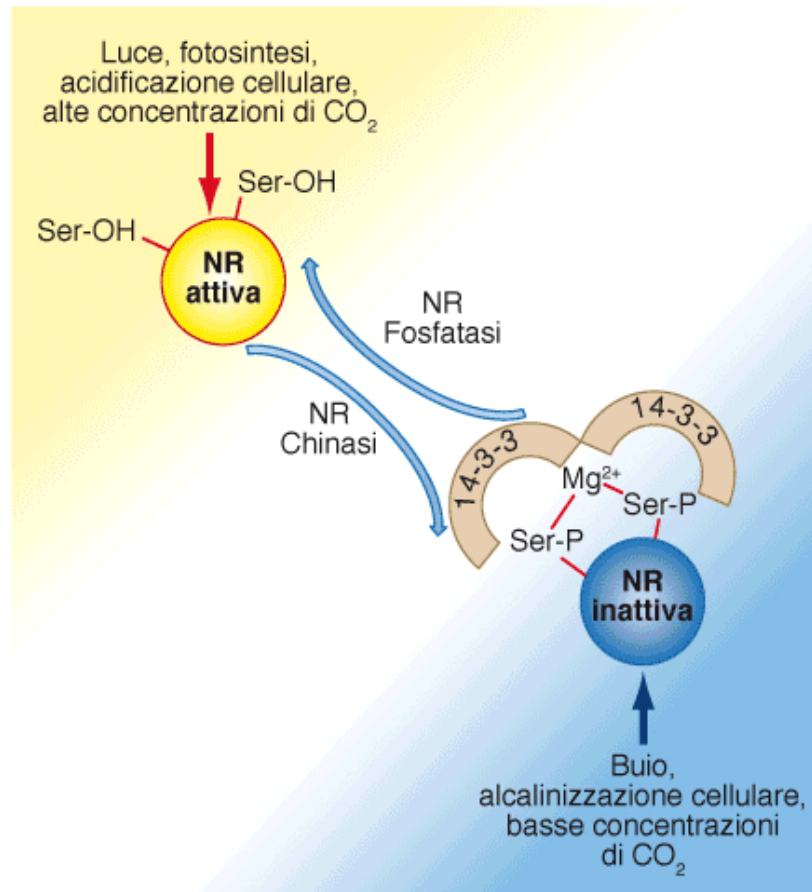
## 1- Regolazione trascrizionale

(A)



Seven day old barley seedlings grown in the absence of nitrate were treated with 15 mM nitrate at time zero

## 2- Regolazione post-traduzionale della nitrato reduttasi



Regolazione:

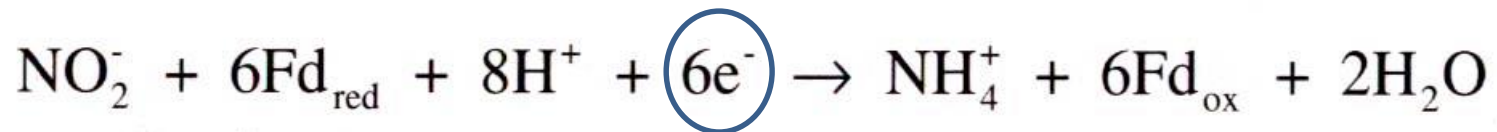
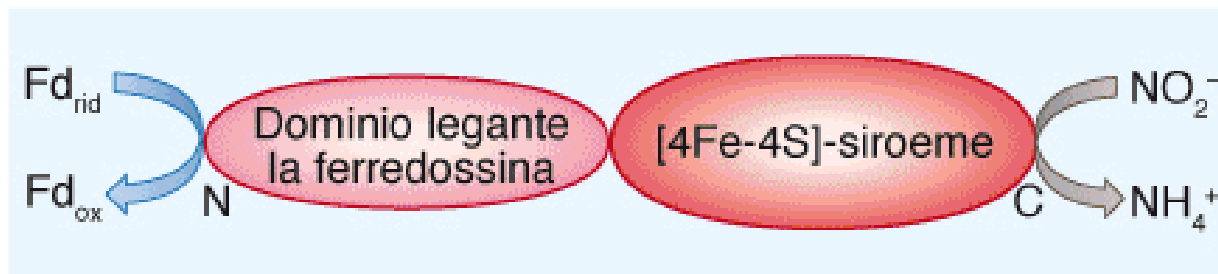
- Cicli diurni
- Luce

L'attività della NR diminuisce in carenza di azoto, al buio o a bassa  $[\text{CO}_2]$ :  
NR chinasi è favorita da alti livelli citosolici di  $\text{Ca}^{2+}$

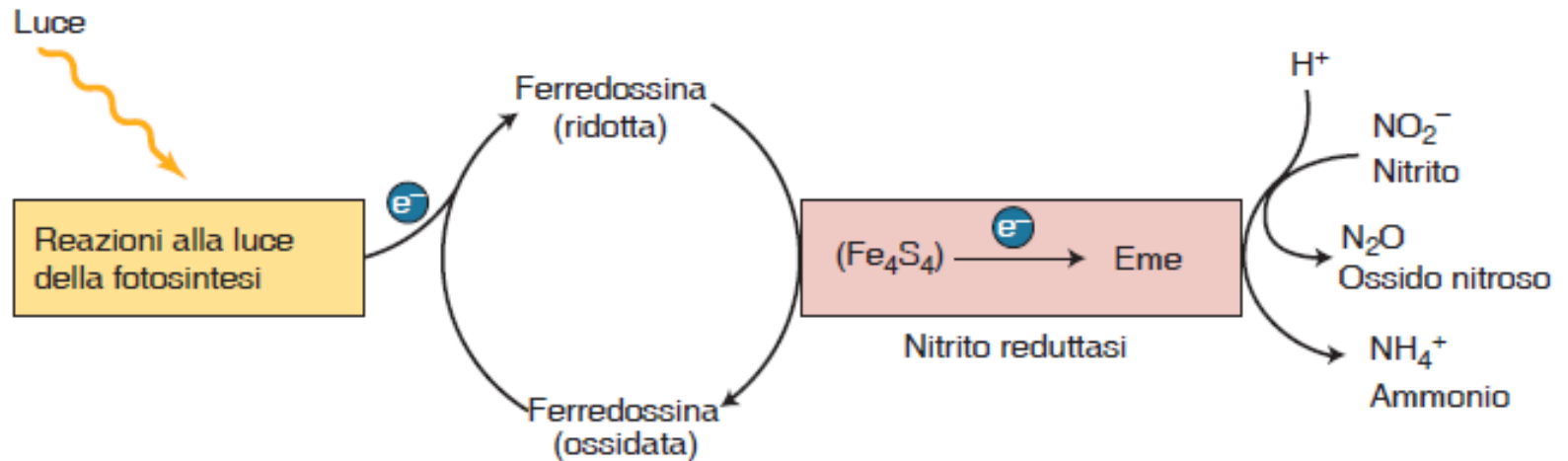
## Nitrito reductasi:

Monomero di 60-70 kDa, con 2 domini funzionali (N e C terminali) e cofattori coinvolti nel trasferimento di elettroni da Fd a nitrito.

Regolazione trascrizionale per mantenere un eccesso di NiR rispetto a NR. Luce ed elevate concentrazioni di  $\text{NO}_3^-$  inducono espressione del gene per NiR. Accumulo di glutammina e asparagina reprimono l'espressione.

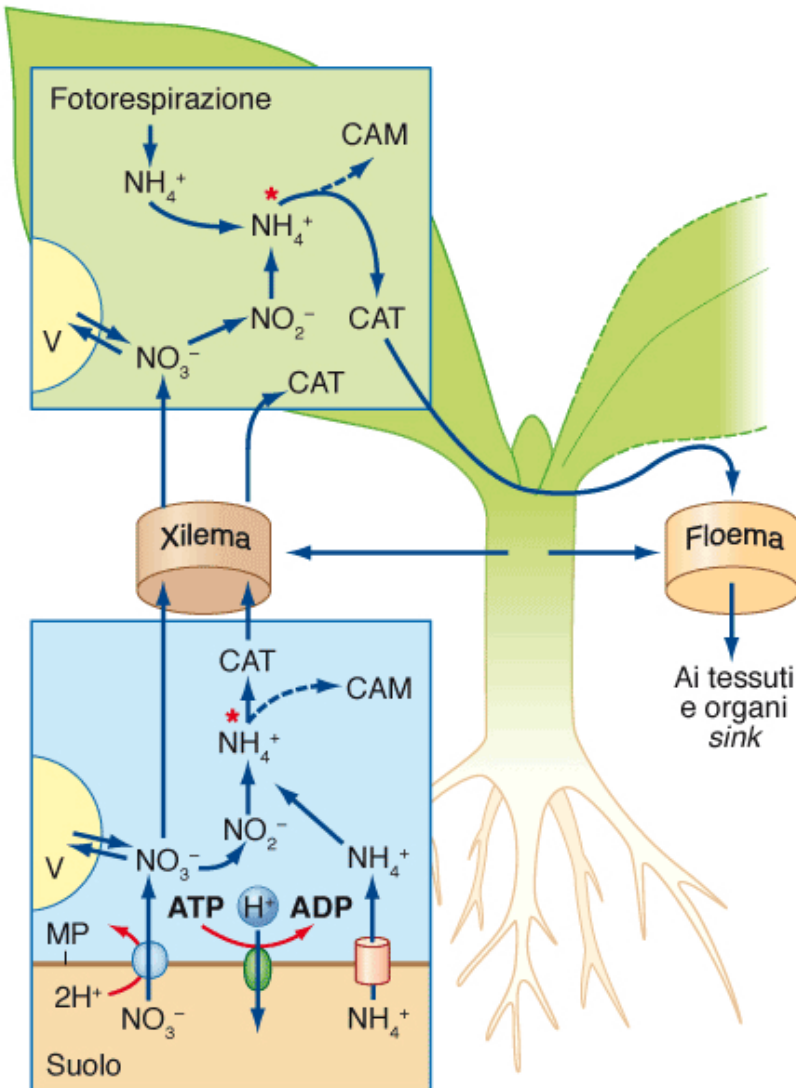


Nelle foglie la fonte di ferredossina ridotta è la **fotosintesi**



Nelle radici la ferredossina è ridotta dal **NADPH** generato dalla via dei pentoso fosfati

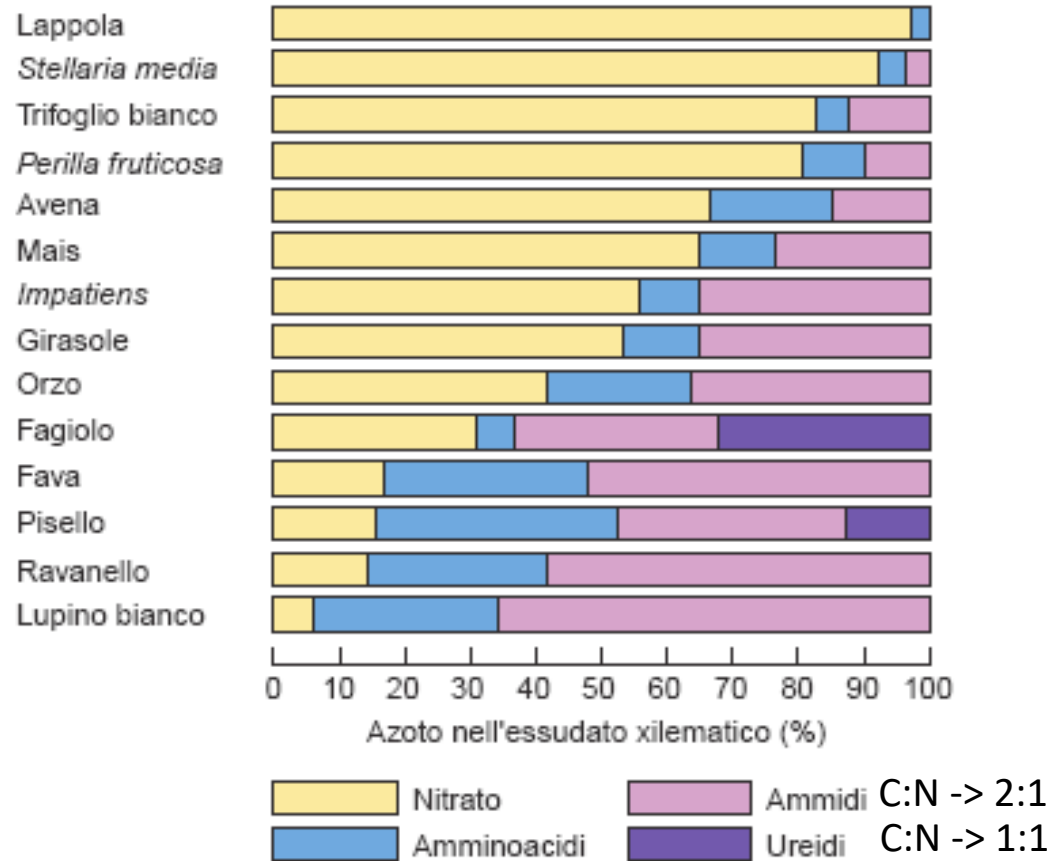
## Flussi dei composti azotati nella pianta



**Figura 7.2** ● Schema semplificato delle forme di azoto assorbite dal suolo, dei siti di riduzione e assimilazione e dei flussi di composti azotati nella pianta. È indicata anche la fotorespirazione come fonte di ammonio nelle cellule fotosintetiche. Nella figura non vengono rappresentati i compartimenti cellulari in cui avvengono le diverse tappe dei percorsi metabolici. (CAM = composti organici azotati richiesti per il metabolismo cellulare; CAT = composti organici azotati di trasporto; MP = membrana plasmatica; V = vacuolo. Gli asterischi indicano gli eventi di assimilazione dell'ammonio che portano alla produzione di composti organici dell'azoto).

\*  $\text{NH}_4^+$ : potenzialmente tossico, deve essere assimilato prontamente

# Quantità relative di nitrato ed altri composti organici azotati in essudati xilematici di varie specie



# ASSIMILAZIONE DELL'AMMONIO



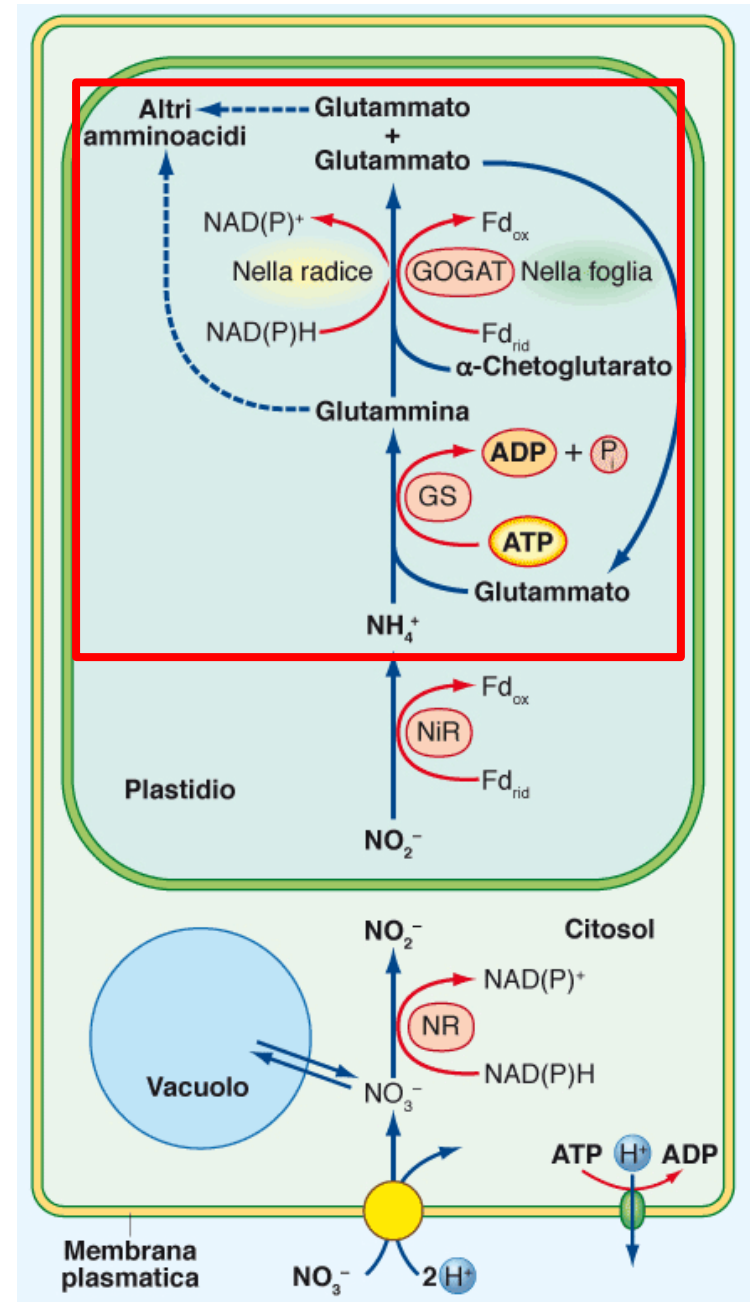
SONO NECESSARI DUE ENZIMI

GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

(GOGAT = glutammato  
oxoglutarato aminotransferasi)

Coinvolti nell'assimilazione primaria dell'azoto nonché nella riassimilazione (assimilazione secondaria) dello ione ammonio liberato da altri processi metabolici (es. fotorespirazione, deaminazione di amminoacidi ecc...)

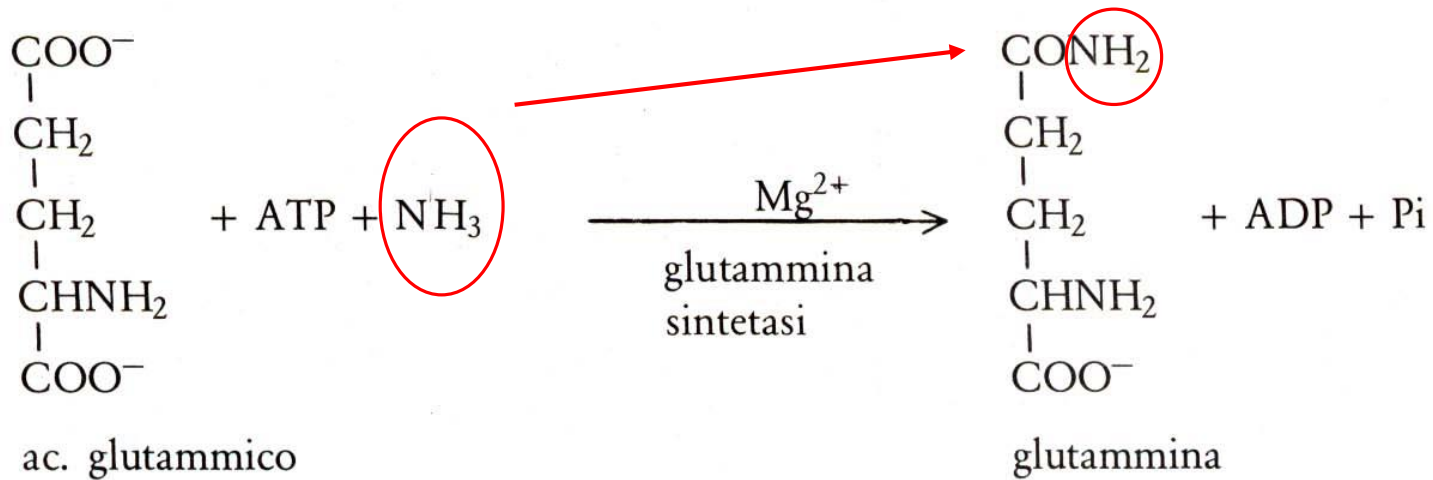


# GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

Elevata affinità per  $\text{NH}_4^+$ ,  $K_m = 3\text{-}5 \mu\text{M}$

Espressione di GS stimolata da luce e alta concentrazione di carboidrati

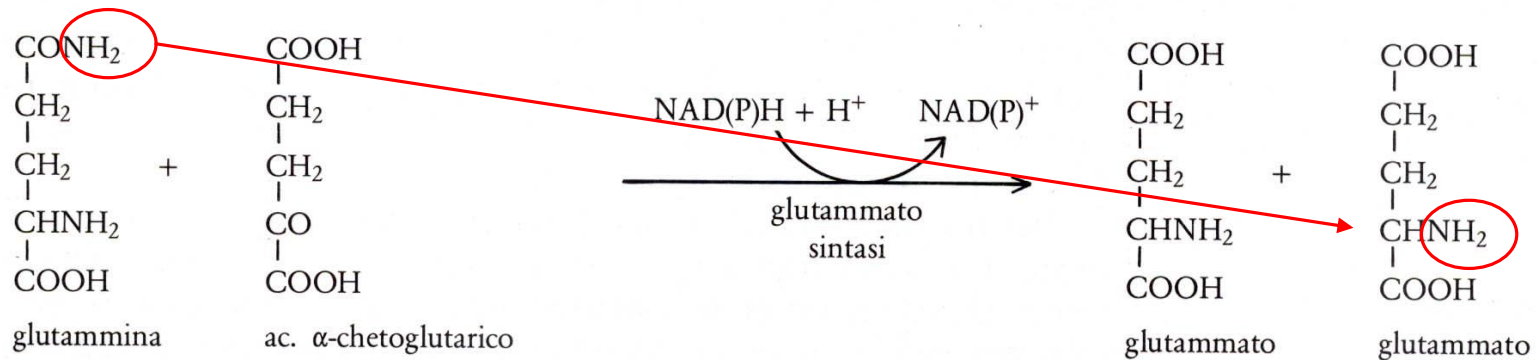
Coinvolge cofattori (cationi bivalenti)



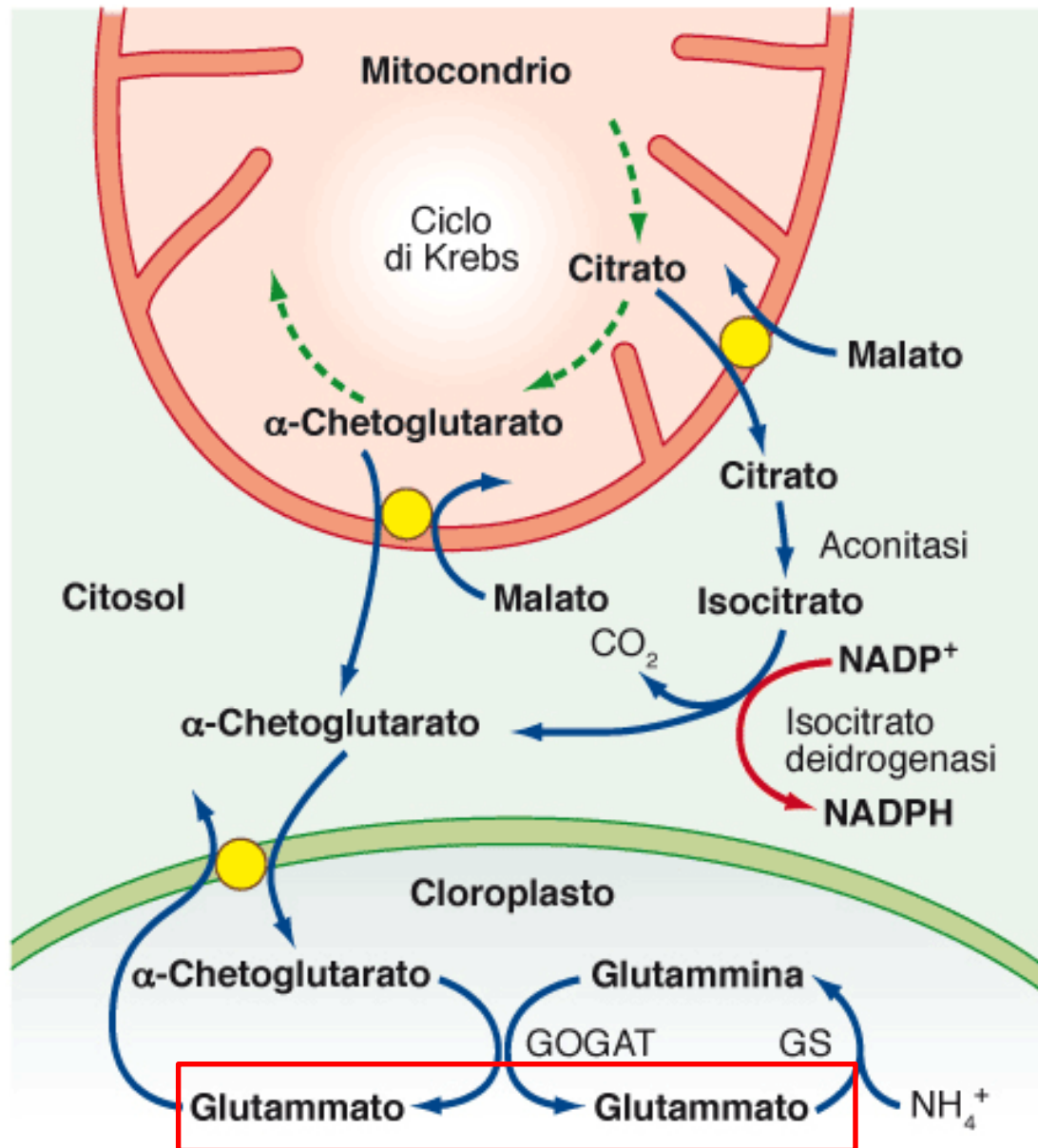
# GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

Trasferimento riduttivo

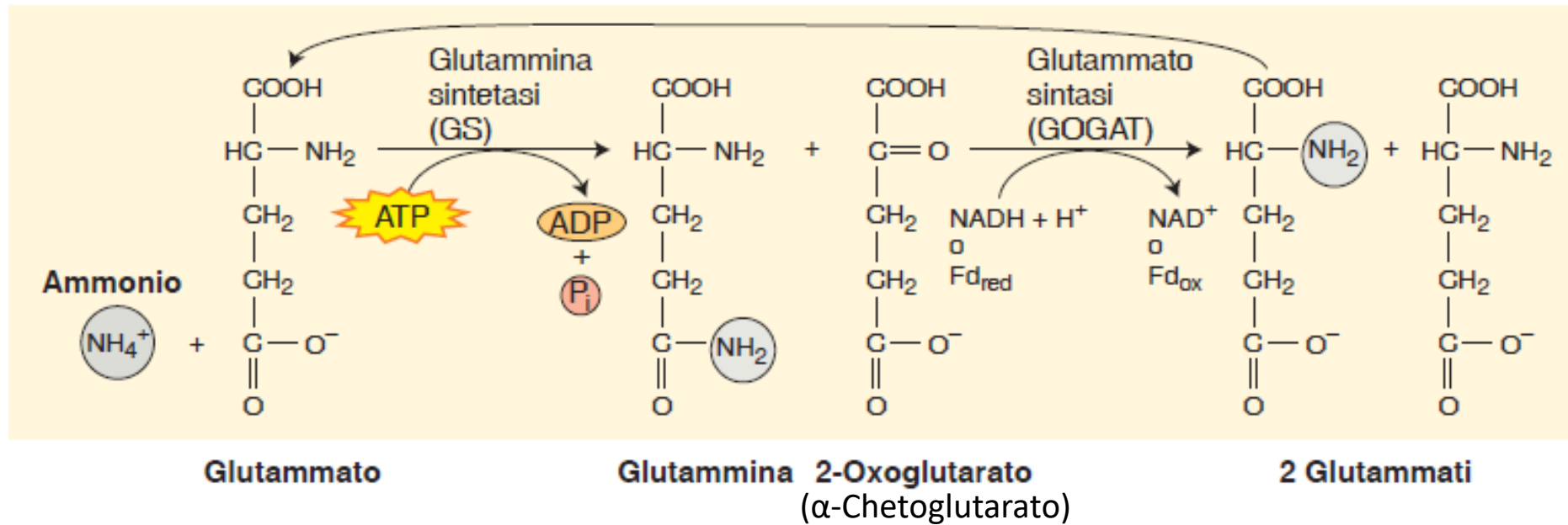
Stimolata da alta concentrazione di glutammina



Nota: nelle foglie il composto riducente è la ferredossina



## Riassumendo...

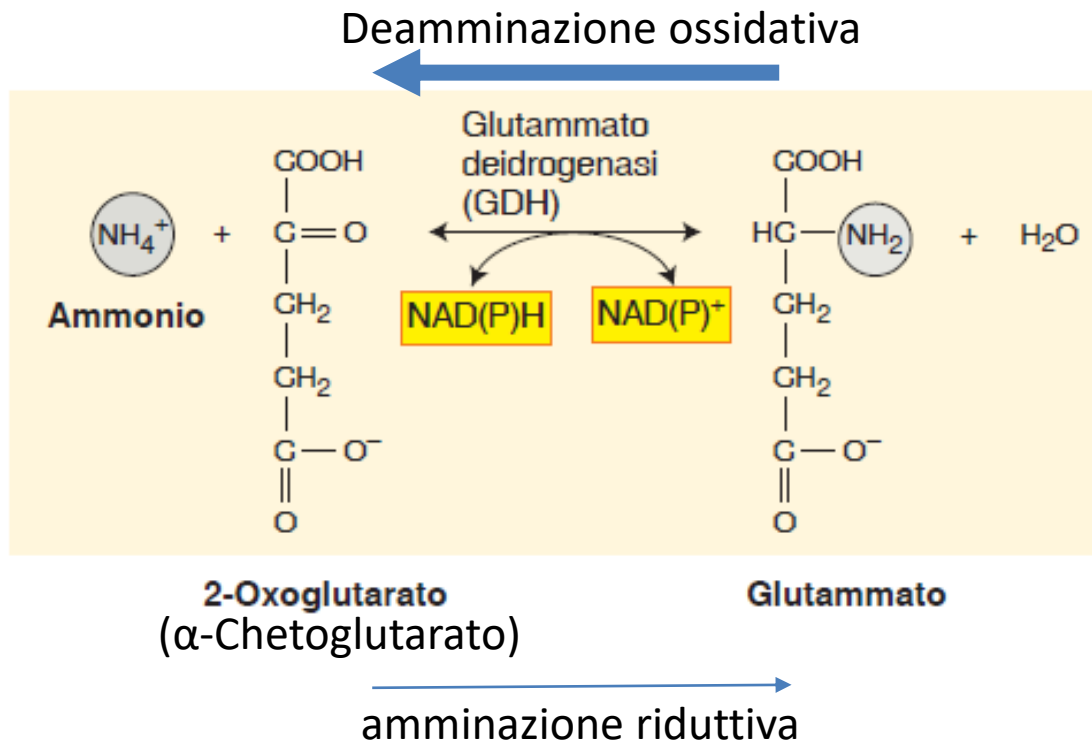


# GLUTAMMATO DEIDROGENASI (GDH)

$K_m$  per l'ammonio 10-80 mM: ruolo secondario nell'assimilazione

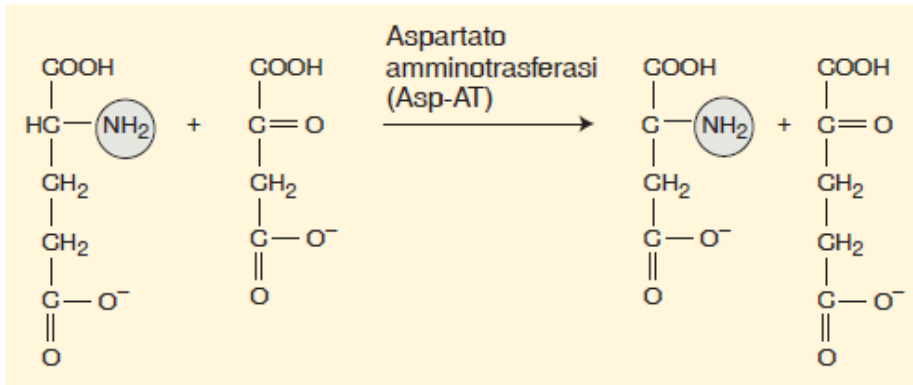
Due isoforme: presente in mitocondri (NADH) e plastidi (NADPH)

Funziona nella deaminazione del glutammato per la riallocazione dell'azoto, oppure se carenza di carbonio per il ciclo di Krebs, catabolismo aa in cellule senescenti, etc..



# L'azoto incorporato in glutamina/glutammato può essere incorporato in altri aminoacidi

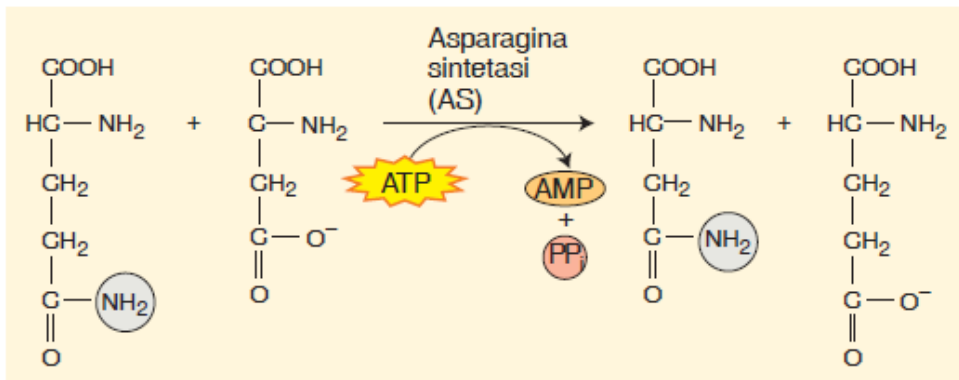
## Reazioni di transaminazione (amminotransferasi)



Glutammato    Ossalacetato

Aspartato    2-Oxoglutarato (= α-Chetoglutarato)

Mitocondri, cloroplasti, perossisomi.  
Reazione reversibile. Asp-AT coinvolta anche nel catabolismo dell'aspartato.



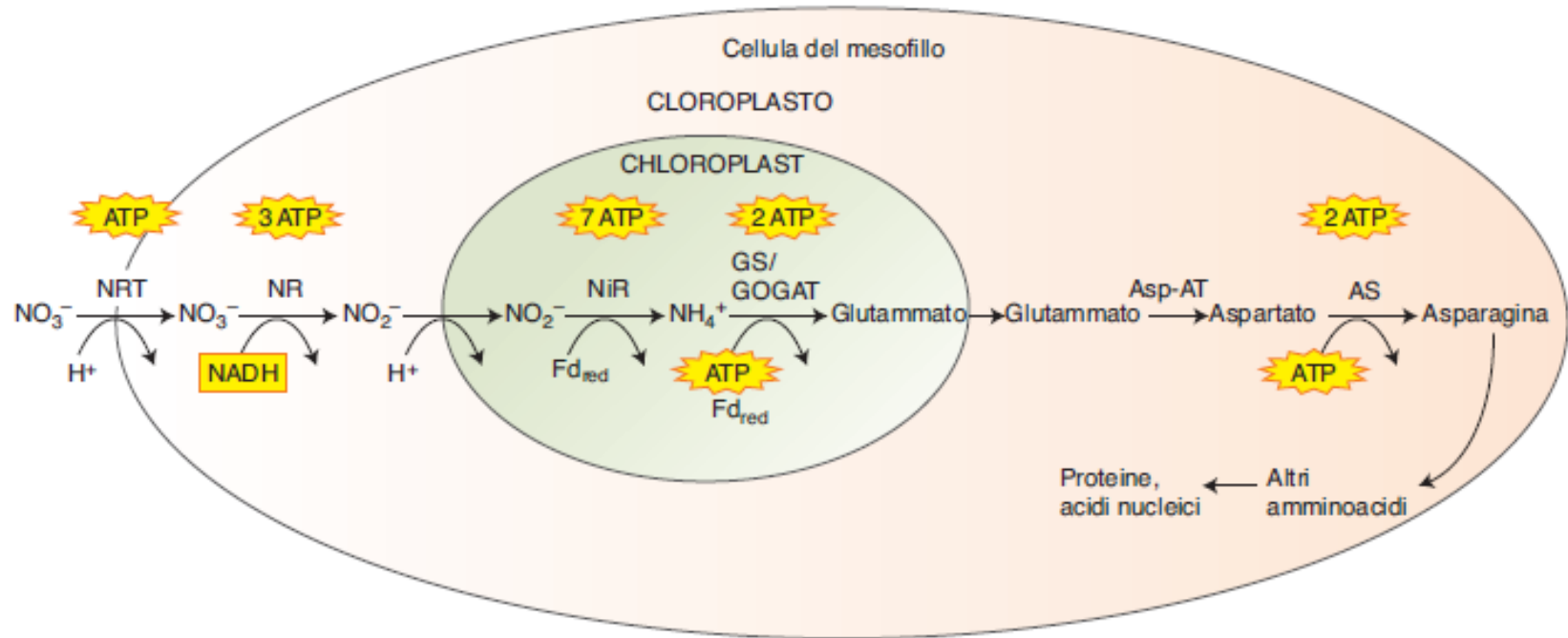
Glutamina    Aspartato

Asparagina    Glutammato

Citosol di cellule radicali e fogliari

Via principale di sintesi di asparagina.  
Composto chiave per trasporto e accumulo azoto (elevato rapporto N:C)

## Riassumendo...





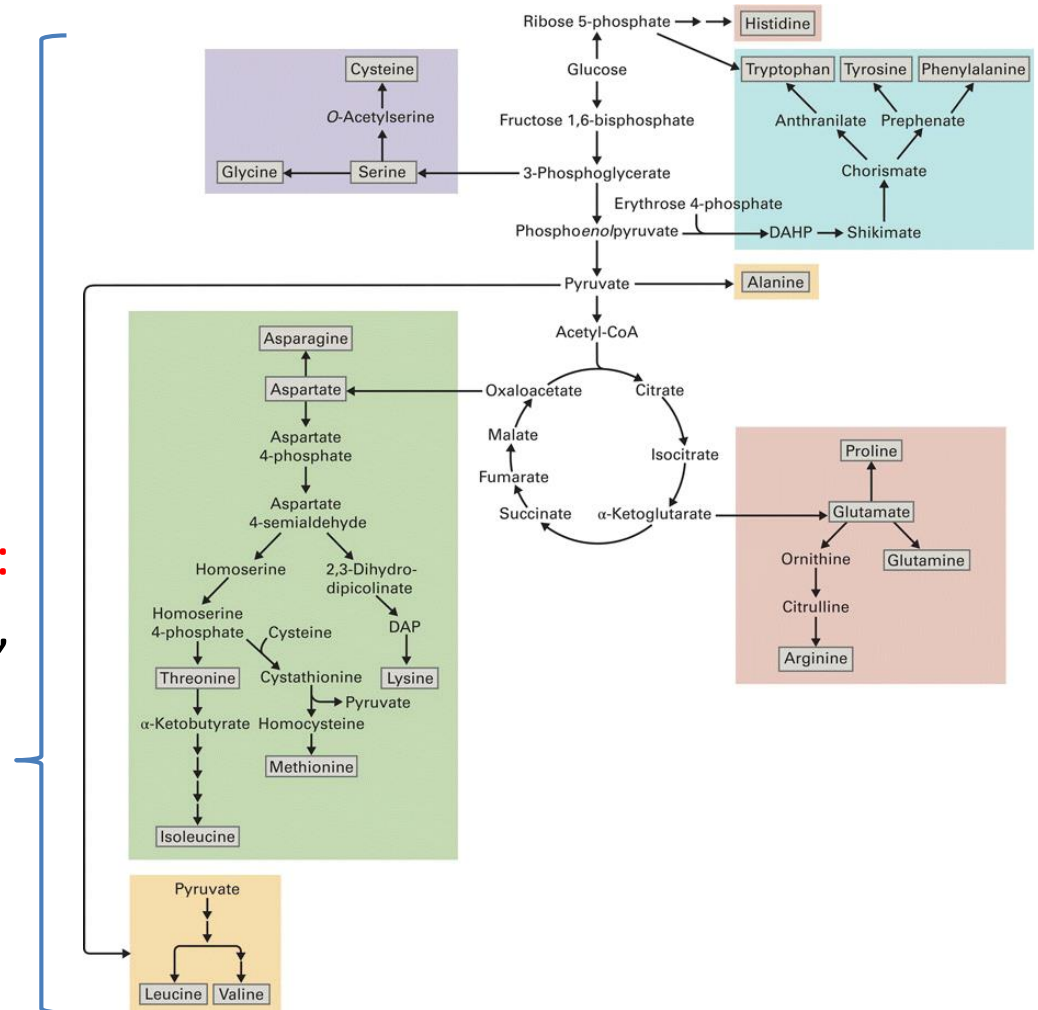
# Le piante sintetizzano tutti i 20 aminoacidi

**Amminoacidi essenziali:** istidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, arginina

**NH<sub>2</sub>** da reazioni di transaminazione con:  
Glutammato, Glutamina, Aspartato

**Scheletri carboniosi derivano da:**  
3-P Glicerato, Fosfoenolpiruvato, Piruvato (glicolisi)

$\alpha$ -chetoglutarato, ossalacetato (ciclo di Krebs)



# Fissazione biologica dell'azoto

Processo responsabile della maggior parte della fissazione di  $N_2$  atmosferico

## Batteri azotofissatori (procarioti diazotrofi)

- allo stato libero nel suolo
- in simbiosi con le piante

# Batteri azotofissatori

**TABELLA 12.2**

**Alcuni esempi di organismi che compiono la fissazione dell'azoto**

<b>Fissazione simbiotica dell'azoto</b>	
<b>Pianta ospite</b>	<b>Genere di procariota azoto-fissatore</b>
Piante leguminose: <i>Parasponia</i>	<i>Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium, Sinorhizobium</i>
Piante attinoriziche; ontano (albero), <i>Ceanothus</i> (cespuglio), <i>Casuarina</i> (albero), <i>Datisca</i> (cespuglio)	<i>Frankia</i>
<i>Gunnera</i>	<i>Nostoc</i>
<i>Azolla</i> (felce d'acqua)	<i>Anabaena</i>
Canna da zucchero	<i>Acetobacter</i>
<b>Fissazione dell'azoto in batteri liberi</b>	
<b>Tipo di batterio</b>	<b>Genere azoto-fissatore</b>
Cianobatteri (alghe verdazzurre)	<i>Anabaena, Calothrix, Nostoc</i>
Altri batteri	
Aerobici	<i>Azospirillum, Azotobacter, Beijerinckia, Derxia</i>
Facoltativi	<i>Bacillus, Klebsiella</i>
Anaerobici	
Non fotosintetici	<i>Clostridium, Methanococcus</i> (Archebatterio)
Fotosintetici	<i>Chromatium, Rhodospirillum</i>

# Simbiosi rizobia/leguminose

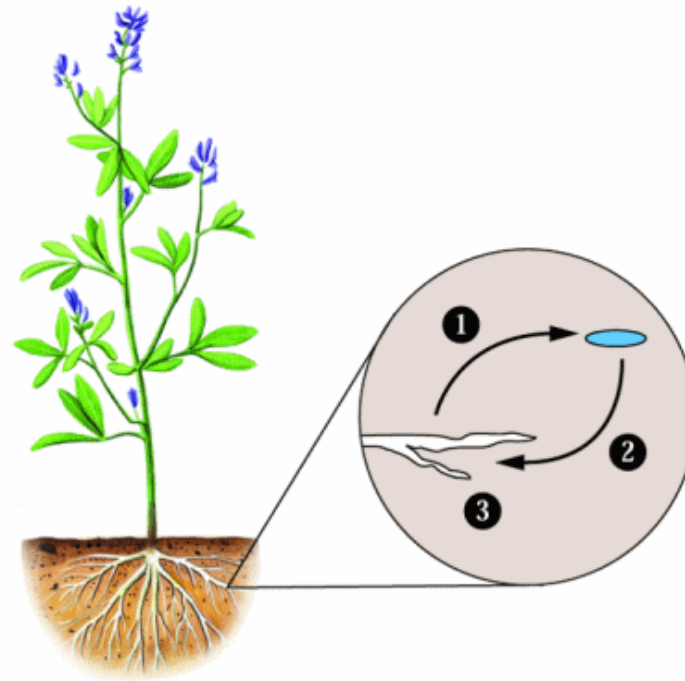
**TABELLA 8.1** Alcuni esempi di specificità nelle simbiosi dei rizobii con le leguminose

Batterio	Ospite
<i>Azorhizobium</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine</i> (soia)
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> (erba medica, alfaalfa) <i>Melilotus</i> (meliloto)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovarietà <i>viciae</i>	<i>Lathyrus</i> (pisello odoroso) <i>Lens</i> (lenticchia) <i>Pisum</i> (pisello) <i>Vicia</i> (fava)
biovarietà <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> (trifoglio)
biovarietà <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i> (fagiolo)
<i>Rhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> (ginestrino)



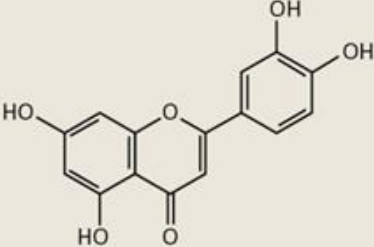
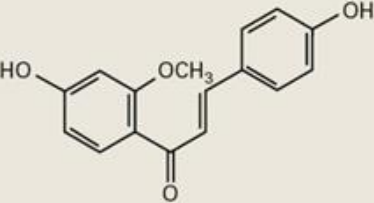
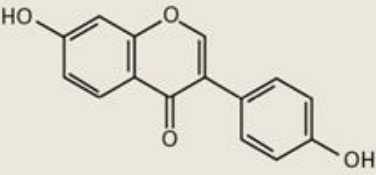
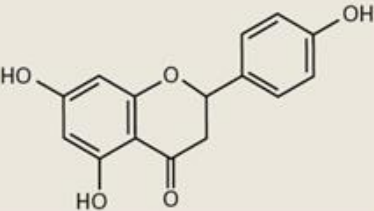
## Simbiosi rhizobia/leguminose

L'instaurarsi della simbiosi richiede uno scambio di segnali biochimici tra pianta e batteri



- 1 Plant root releases elicitors of *Nod* gene expression.
- 2 Bacterium releases Nod factor.
- 3 Plant root demonstrates ion fluxes, expresses nodulin proteins, is infected, and undergoes nodule morphogenesis.

# Flavonoidi: attraggono i batteri e attivano la proteina NodD

Host compounds that actively induce <i>nod</i> gene expression		
Flavonoid inducers		
Category	Name/activity	Specific structure
Flavone	Luteolin, a flavone inducer from <i>Medicago</i> spp., active on <i>S. meliloti</i>	
Chalcone	4,4'-Dihydroxy-2'-methoxychalcone, a chalcone inducer from <i>Medicago</i>	
Isoflavone	Daidzein, an isoflavone active on <i>B. japonicum</i>	
Flavanone	Naringenin, a flavanone active on <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	

L'espressione dei geni *nod* da parte dei batteri dipende dal segnale chimico inviato dalla pianta (flavonoidi ..) e dalla proteina NodD batterica

Rizobi: geni *nod* (nodulazione)

Geni nod comuni:

nodA, nodB, nodC

Geni nod ospite specifici:

nodP, nodH, nodQ, nodE, nodF, nodL

**Solo uno dei geni nod, il *nodD*, è espresso costitutivamente:**

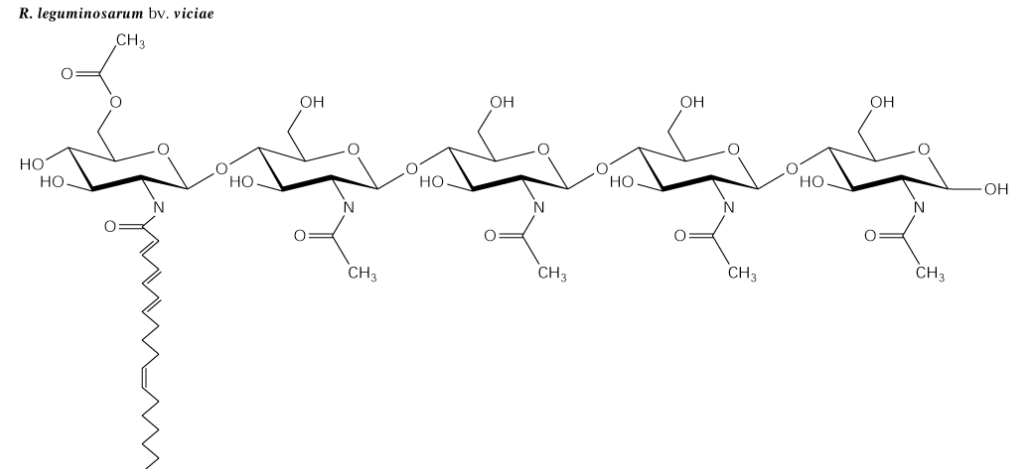
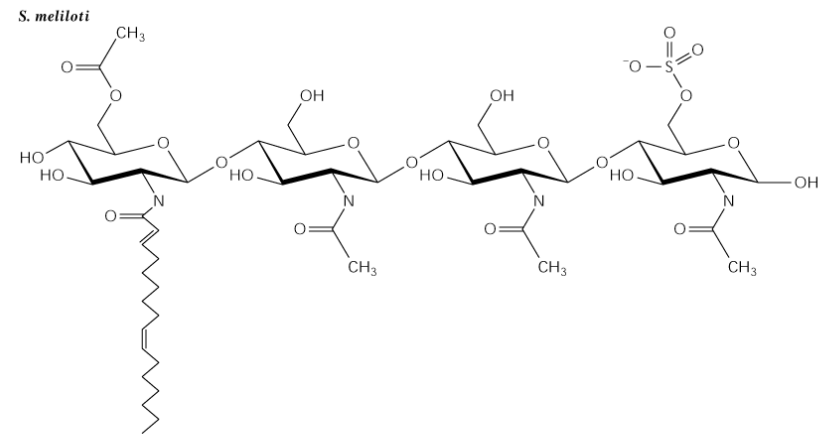
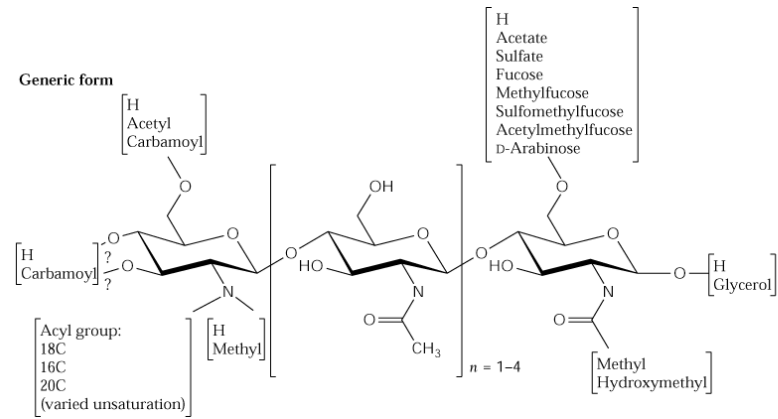
prodotto proteico **NodD** (batterico) che regola la trascrizione degli altri geni *nod* che codificano per proteine di nodulazione coinvolte nella produzione dei fattori Nod

# I geni *nod*, attivati da NodD, codificano per enzimi di biosintesi dei fattori Nod

I fattori Nod sono  
lipo-chitin-oligosaccaridi

Struttura base:  
N-acetylglucosamina

Sono segnali per la simbiosi  
(fattori di nodulazione)



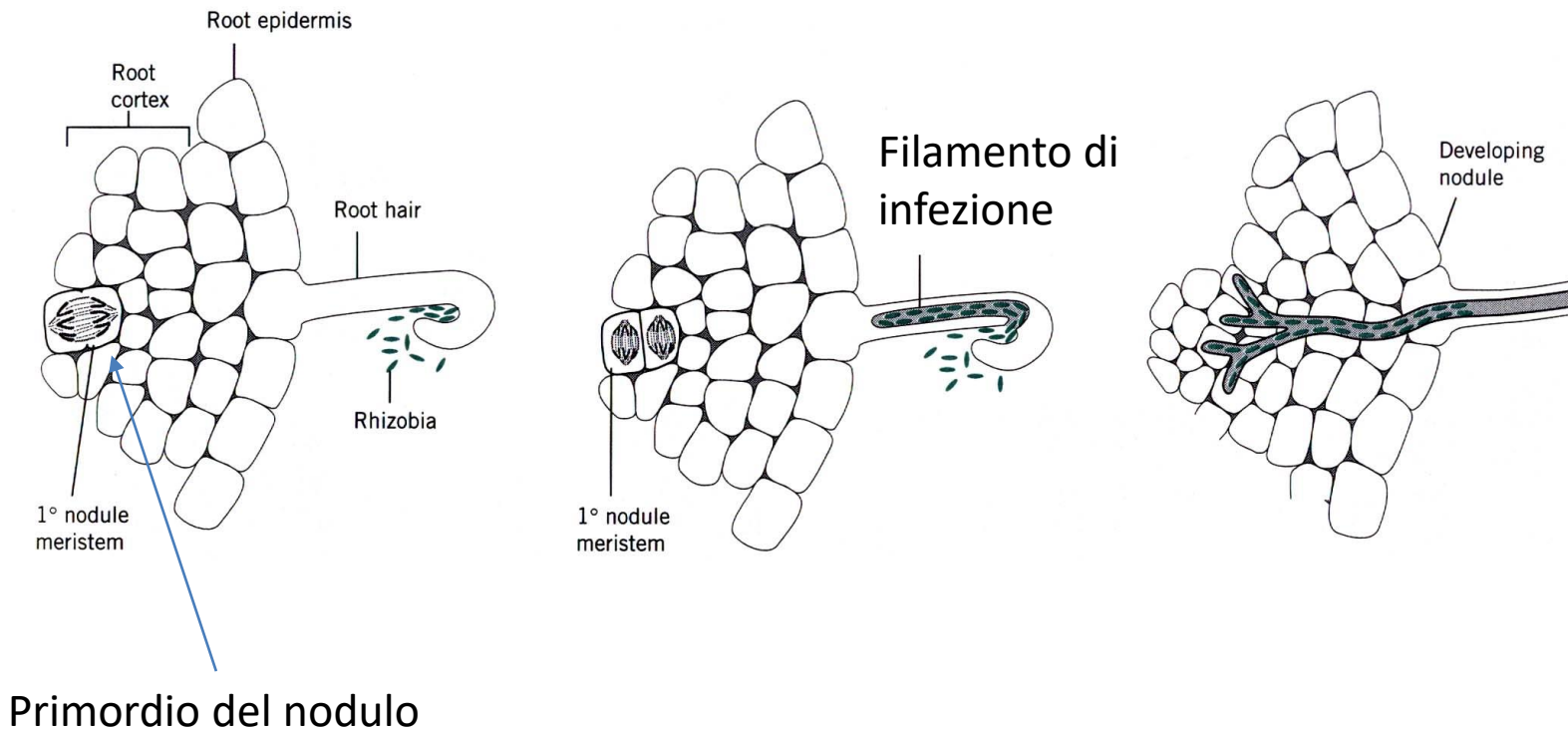


## **FORMAZIONE DEL NODULO RADICALE**

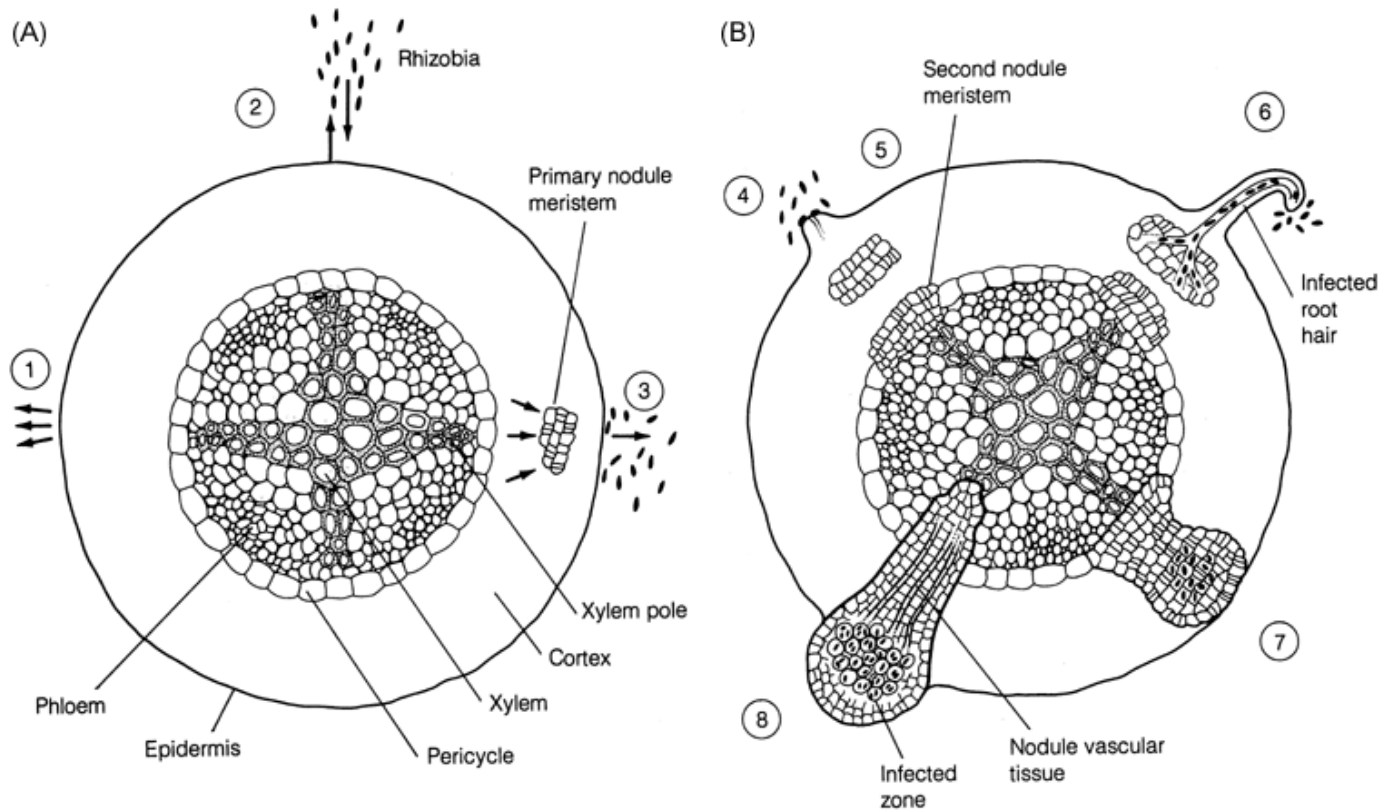
➤ **INFEZIONE**

➤ **ORGANOGENESI**

# Il processo di infezione

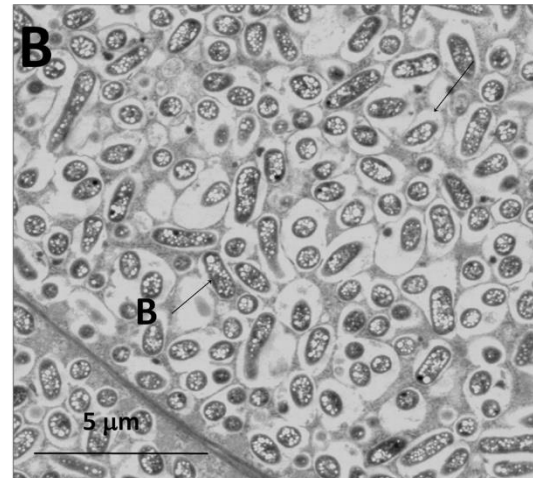
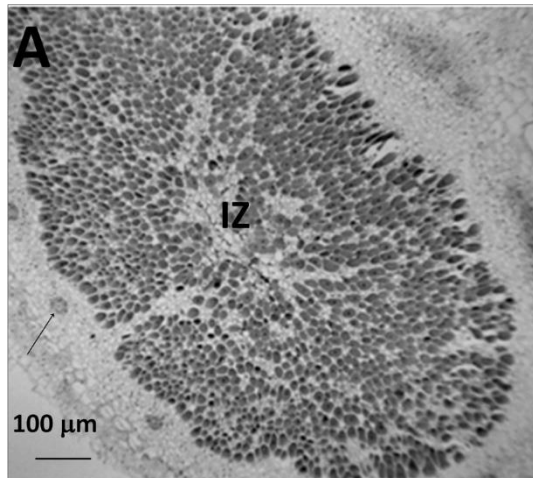
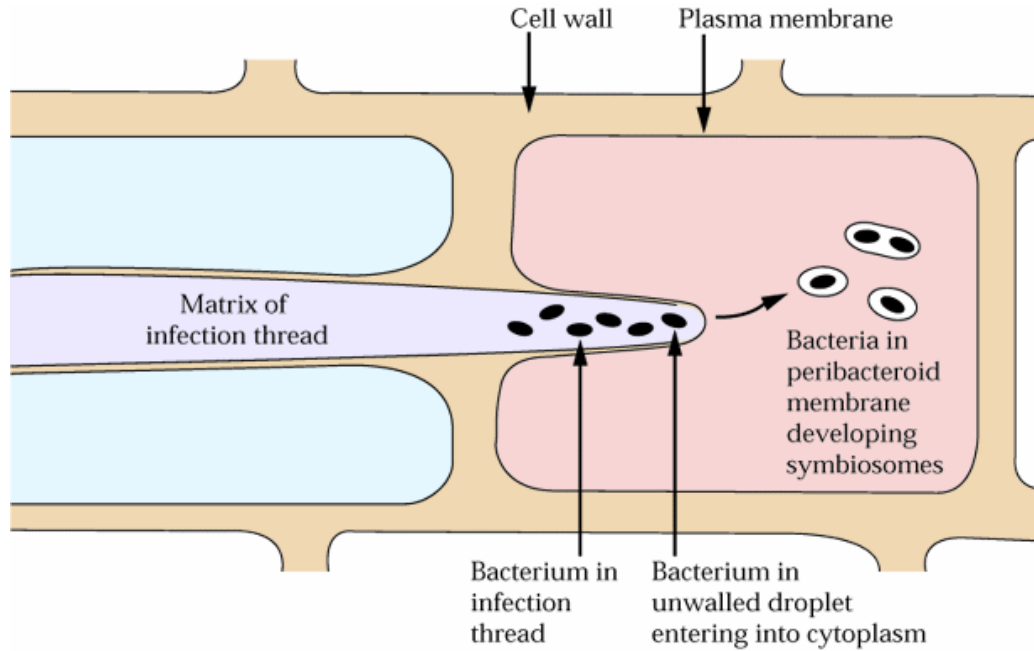


# Sviluppo di un nodulo radicale di soia

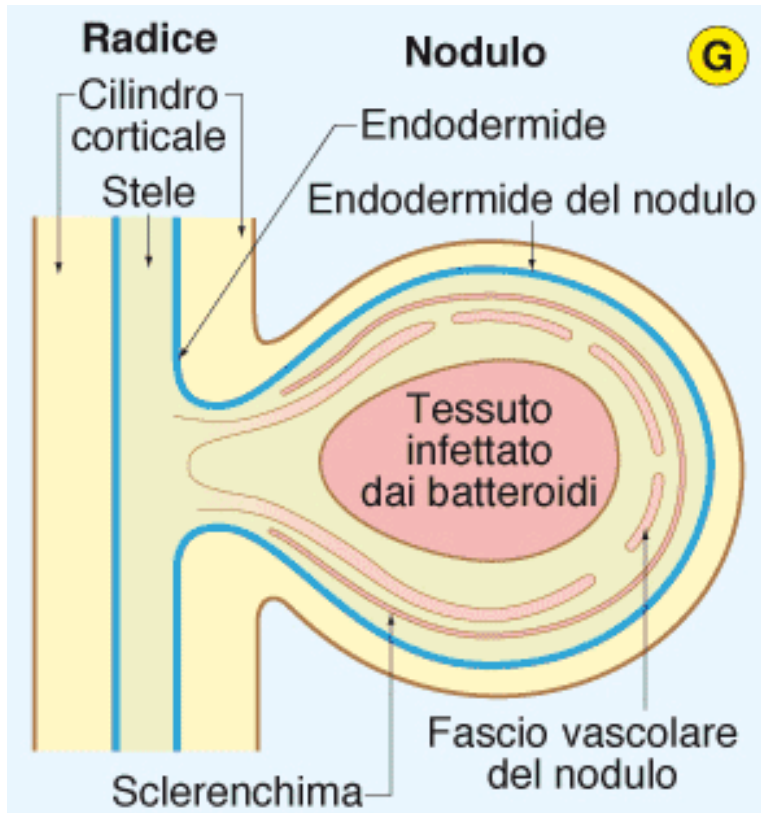


Divisioni cellulari in cellule del cortex (meristema primario del nodulo) e del periciclo (meristema secondario del nodulo)

# Rilascio dei batteri dal filamento di infezione



Batteroidi +  
membrana  
paribatteroidea =  
simbiosoma



Colorazione rosa del tessuto di infezione interno:  
 leghemoglobina (emoglobina vegetale) nel citosol delle cellule infettate dai  
 simbiosomi

$N_2$  è fissato dalla **nitrogenasi** (in tutti i procarioti diazotrofi)



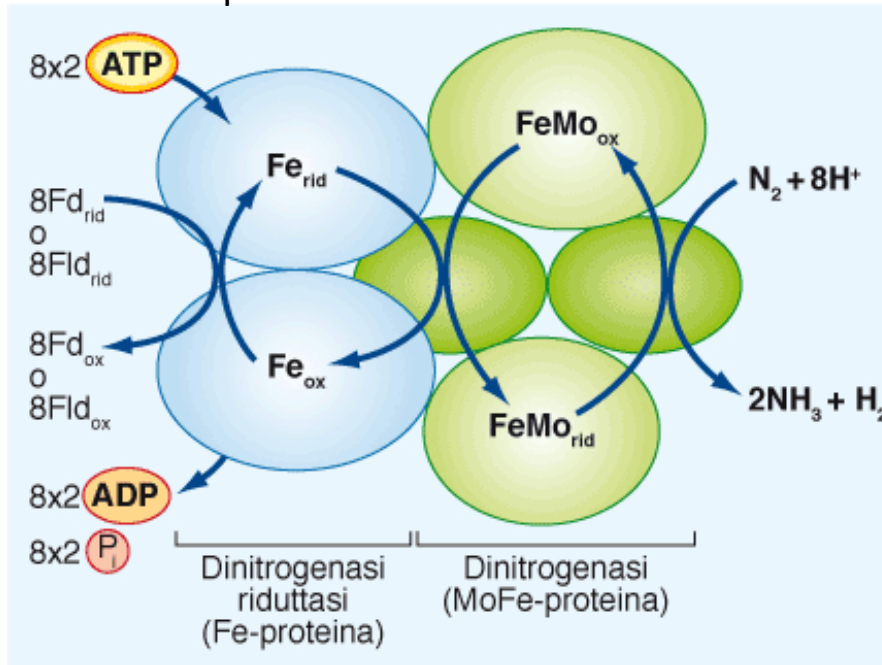
**Tabella 12.4** Reazioni catalizzate dalla nitrogenasi

$N_2 \rightarrow NH_3$	Fissazione di azoto molecolare
$N_2O \rightarrow H_2 + H_2O$	Riduzione del protossido d'azoto
$N_3^- \rightarrow N_2 + NH_3$	Riduzione dell'azide
$C_2H_2 \rightarrow C_2H_4$	Riduzione dell'acetilene
$2H^+ \rightarrow H_2$	Produzione di $H_2$
$ATP \rightarrow ADP + P_i$	Attività idrolitica dell'ATP

Fonte: Da Burris 1976

# Schema della reazione catalizzata dalla nitrogenasi

Complesso fatto da 2 enzimi distinti



Donatore elettronici:

ferredossina  
o  
flavodossina

6 eventi di trasferimento di  $e^-$  per ogni  $N_2$  da ridurre

**Fe proteina (dinitrogenasi riduttasi):**  
Omodimero ( $\alpha_2$ ) di 40-70 kDa  
2 subunità  
1 gruppo 4Fe-4S per ogni dimero  
inibita da  $O_2$

**MoFe proteina (dinitrogenasi):**  
Eterotetramero ( $\alpha_2, \beta_2$ ) di 250 kDa  
4 subunità  
2 gruppi Mo-Fe-S (cofattori FeMo);  
2 gruppi Fe-S (gruppi P)  
inibita da  $O_2$

Richiesto un **grande input energetico** (16 ATP)

Vengono consumati **12 g di C per g di N** fissato

La resa energetica della reazione è diminuita a causa della **produzione di H<sub>2</sub>** (perdita del 30-60% dell'energia fornita alla nitrogenasi).

**Consumo di 2 elettroni e idrolisi di 4 ATP.**

Alcuni batteri/piante possiedono l'enzima **idrogenasi irreversibile** che ossida H<sub>2</sub> a 2 H<sup>+</sup> con produzione di NADH:

NADH può essere ossidato attraverso la catena respiratoria per produrre 3 ATP. Consumo di O<sub>2</sub>