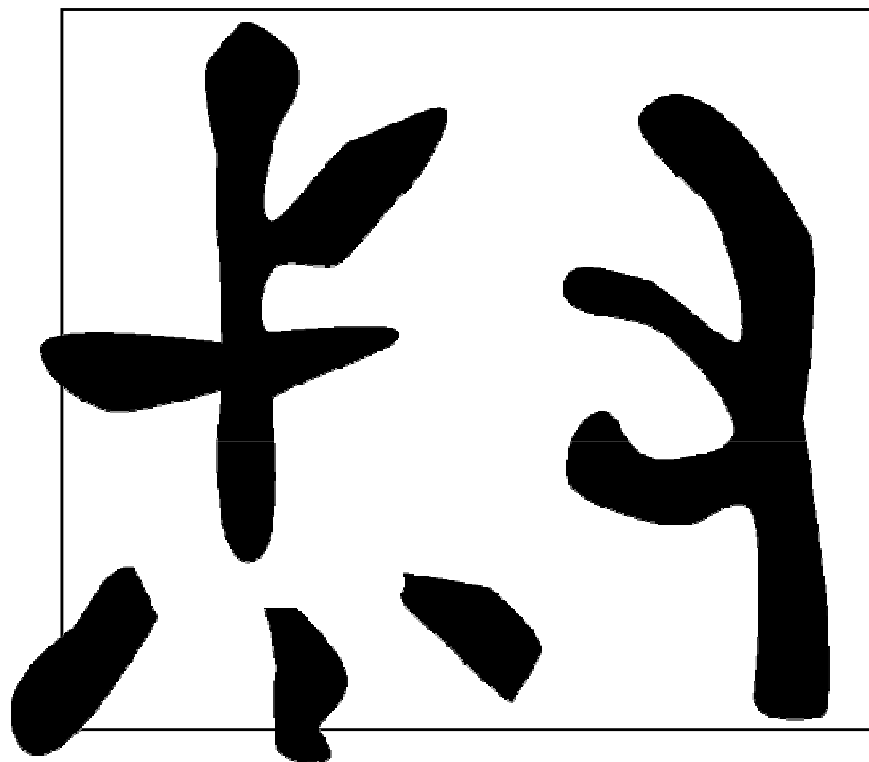


ORGANICAZIONE DELL'AZOTO



Shu (soia)

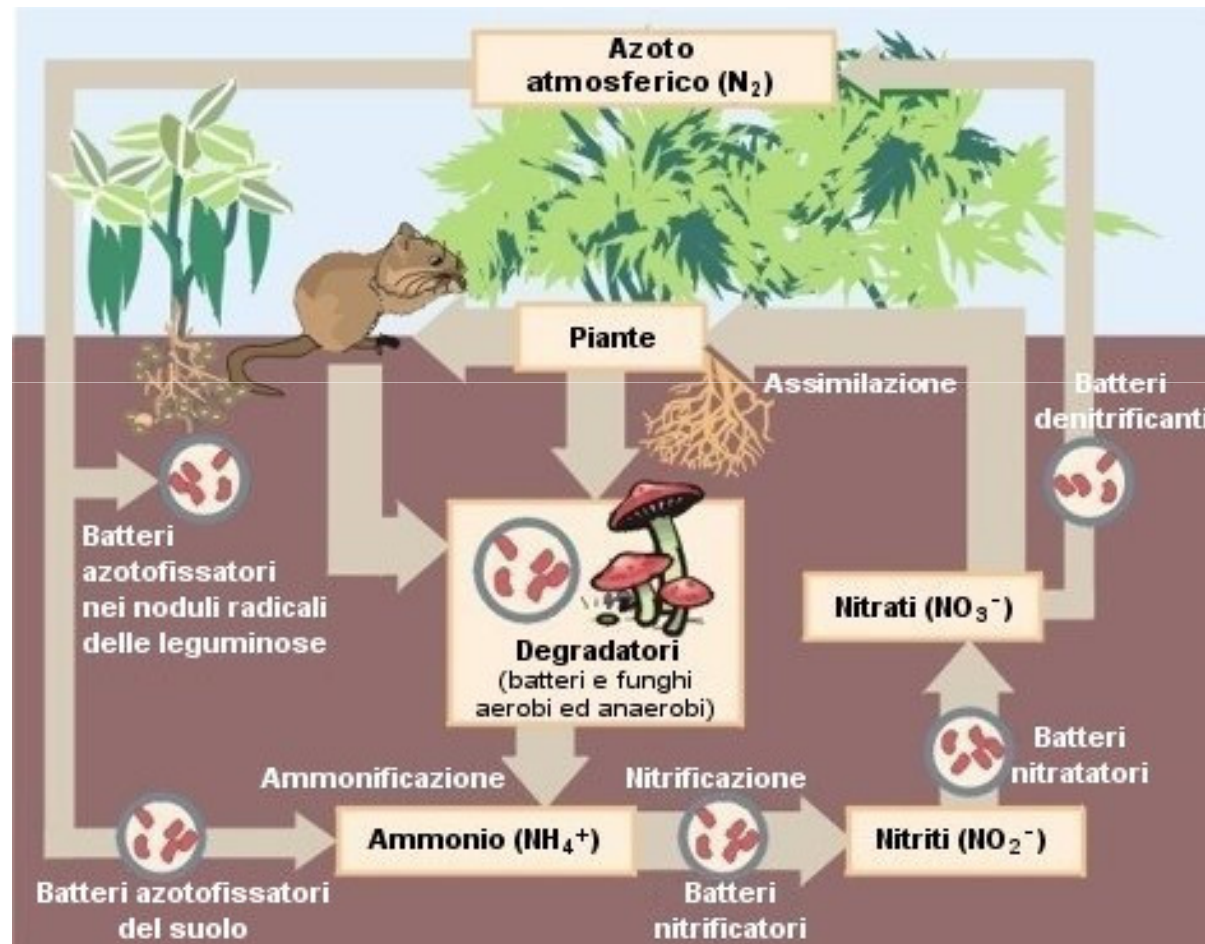
I DIVERSI STATI DI OSSIDAZIONE DELL'AZOTO

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

CICLO DELL'AZOTO



INTERCONVERSIONE TRA LE VARIE FORME

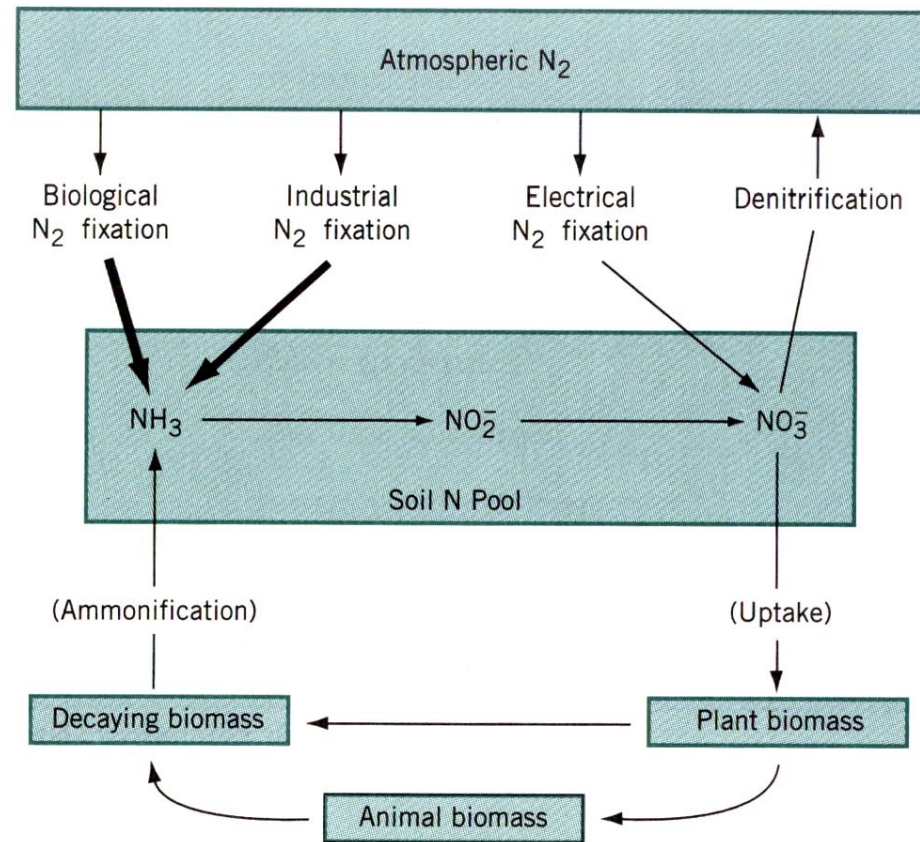


FIGURE 6.1 The nitrogen cycle, illustrating relationships between the three principal nitrogen pools: atmospheric, soil, and biomass.

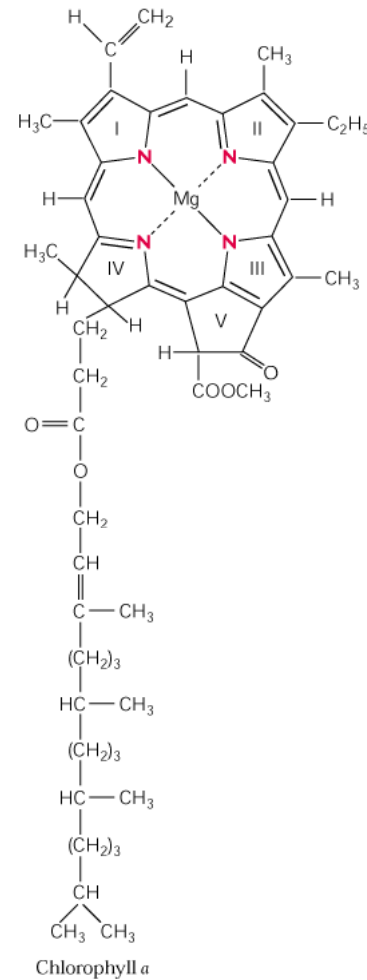
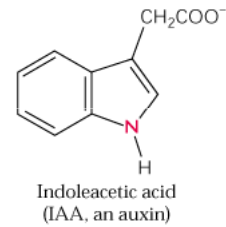
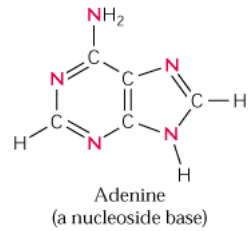
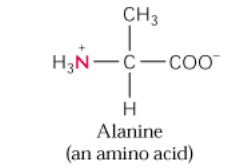
PRINCIPALI PROCESSI NEL CICLO DELL'AZOTO

TABELLA 12.1

Principali processi nel ciclo biogeochimico dell'azoto

Processo	Definizione	Tasso (10 ¹² g anno ⁻¹) ^a
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
Immobilitazione	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

L'azoto è incorporato in composti organici essenziali

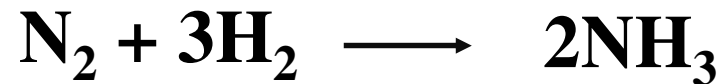


Sintomi di carenza di azoto (soia)



Uso di fertilizzanti azotati

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



250 atm 450° C

fissazione industriale (Haber)

fissazione biologica dell'azoto
T ambiente e P atmosferica



Batteri
Cianobatteri

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 (NH_3)
- nuove pratica agricole per la produzione intensiva di cereali
- uso dei combustibili fossili.

la fissazione dell'azoto è raddoppiata, rispetto al ciclo naturale.

effetti ecologici:

- l'eutrofizzazione delle acque lacustri e dei mari lungo le coste
- 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 ogm che abbiano meno bisogno di fertilizzanti

Le piante possono organizzare l'azoto atmosferico solo in simbiosi con microorganismi

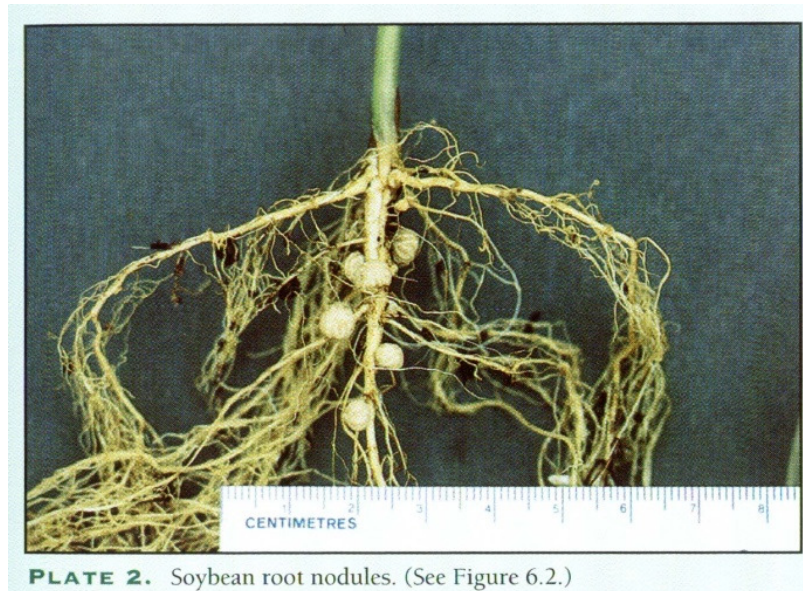
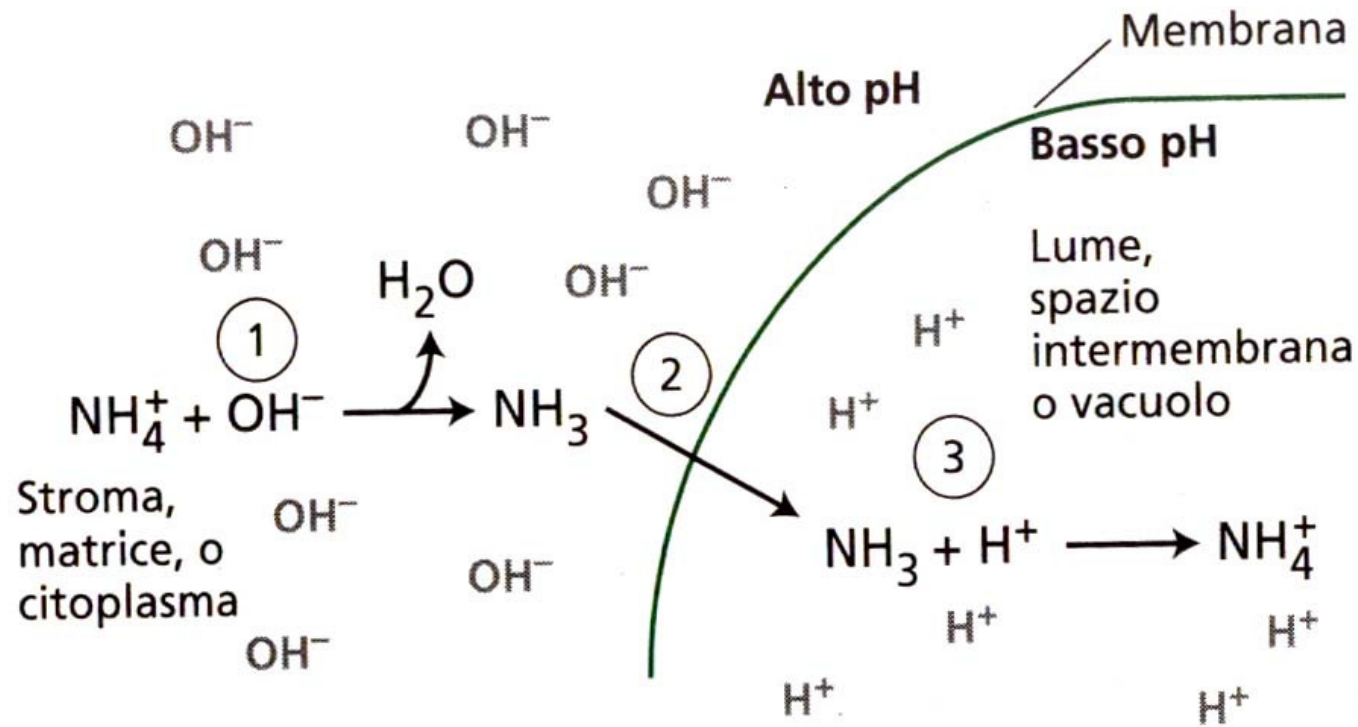


PLATE 2. Soybean root nodules. (See Figure 6.2.)

le piante possono utilizzare come fonte di azoto il **Nitrato (NO_3^-)** o l'ammonio (**NH_4^+**) presente nei suoli

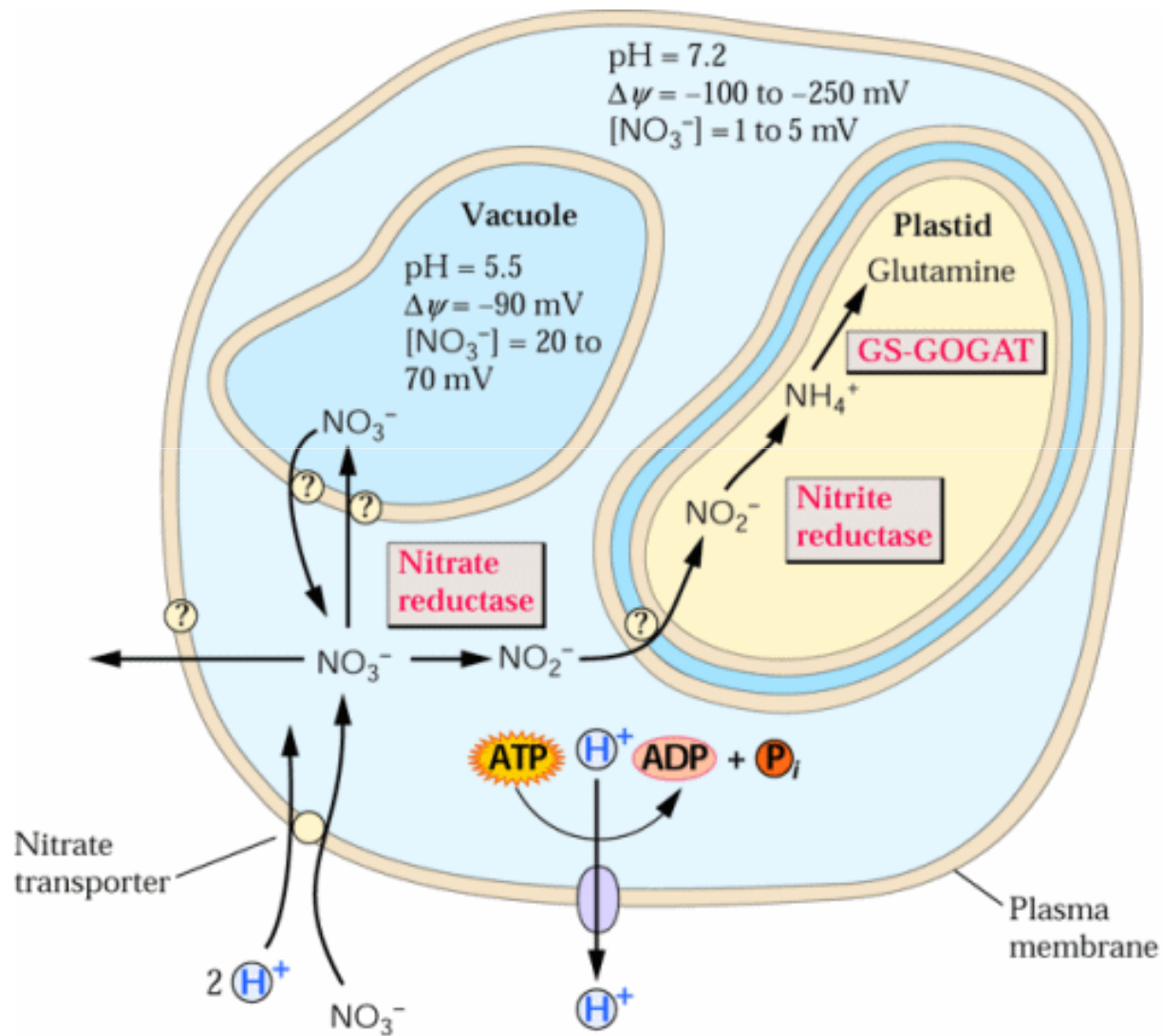
A differenza del nitrato, alte concentrazioni di ammonio sono tossiche per piante ed animali



ASSIMILAZIONE DEL NITRATO

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

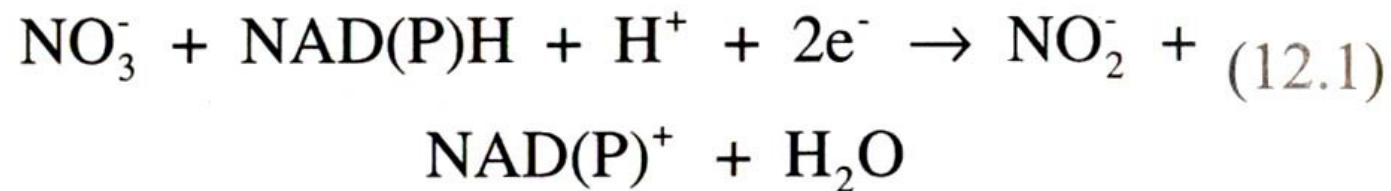
Il nitrato viene trasportato **attivamente** nella cellula (radici)



Riduzione del nitrato a nitrito (citosol)

NITRATO REDUTTASI

L'enzima **nitrato reduttasi** catalizza questa reazione:

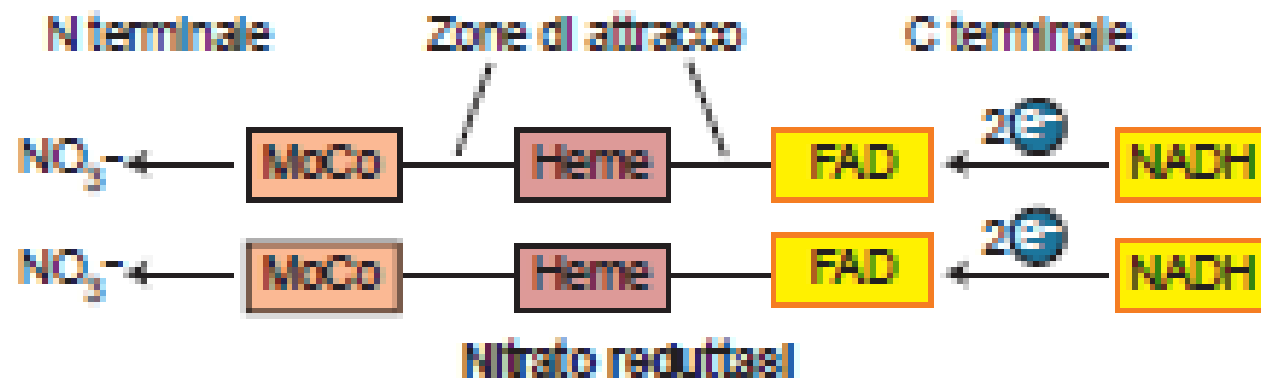


presente sia nelle radici che nelle foglie

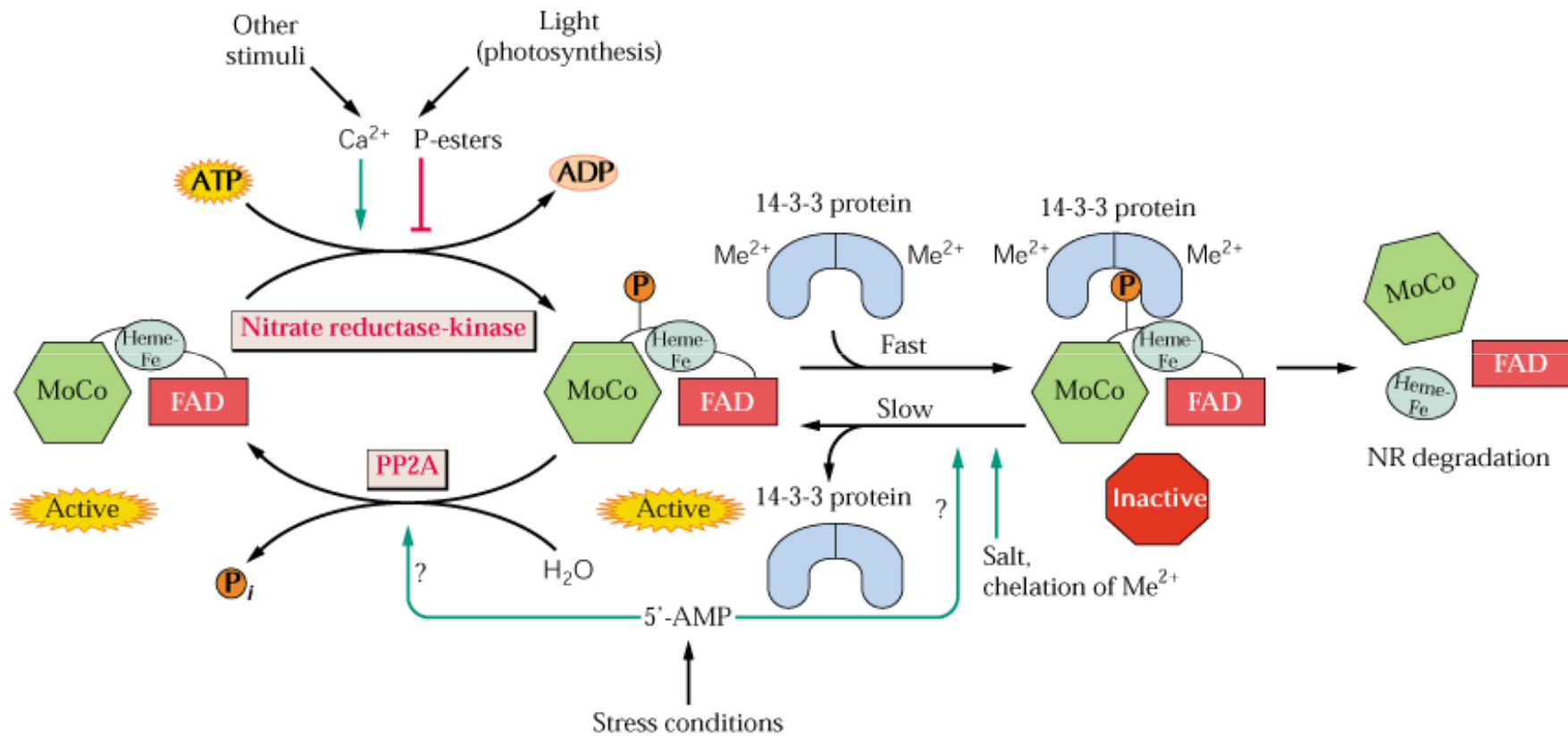
NITRATO REDUTTASI

Omodimero

3 gruppi prostetici: FAD, EME , MOLIBDENO



Regolazione della nitrato reduttasi



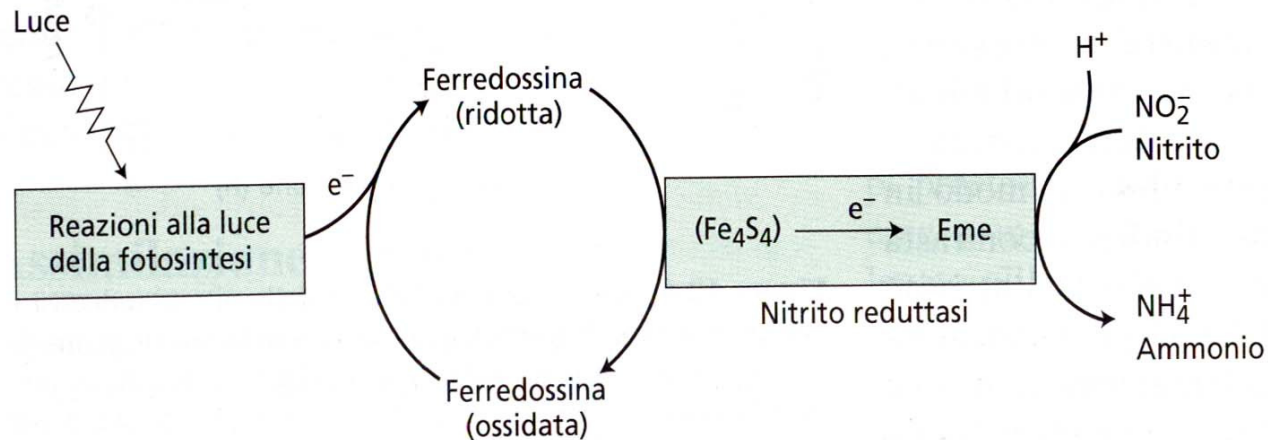
Riduzione del nitrito ad ammonio (plastidi)

Nitrito reduttasi

catalizza la reazione

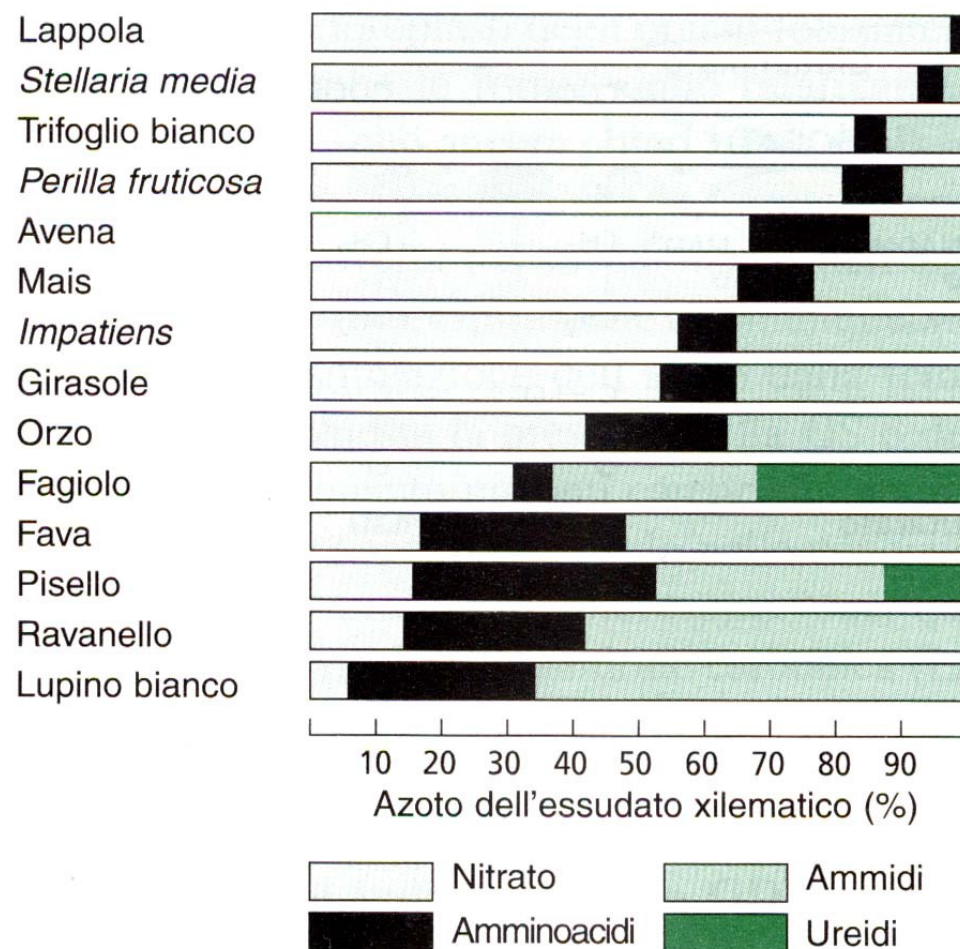


Nelle foglie la fonte di ferredossina ridotta è la **fotosintesi**



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

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



ASSIMILAZIONE DELL'AMMONIO

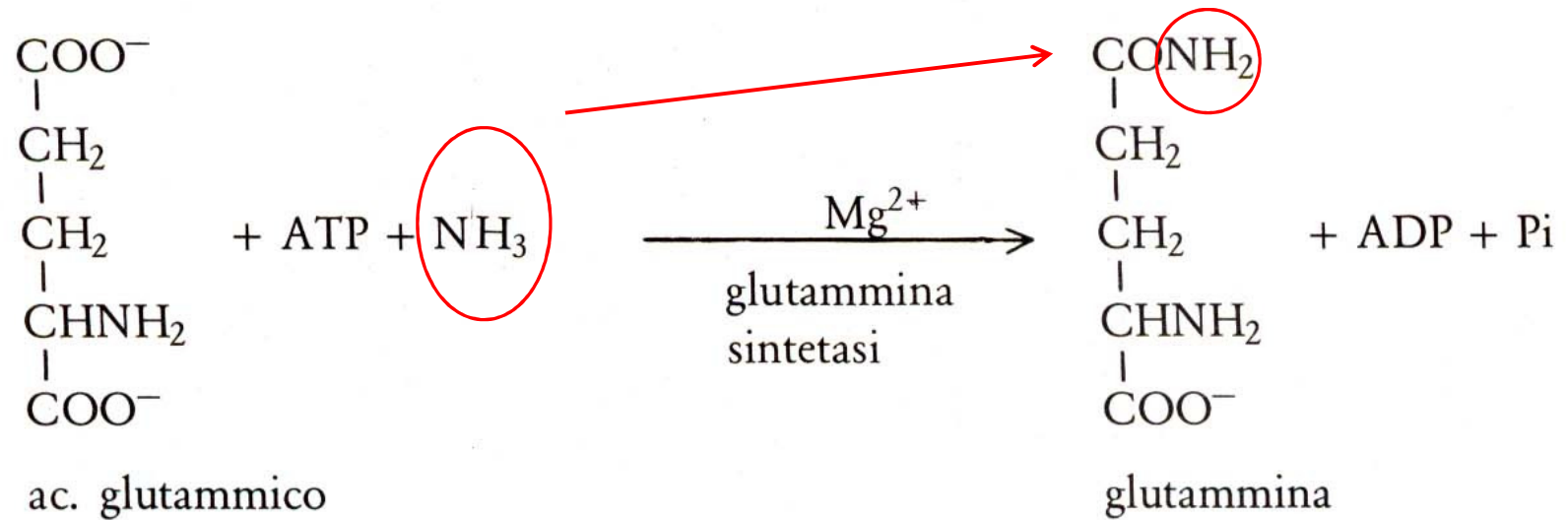
SONO NECESSARI DUE ENZIMI

GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

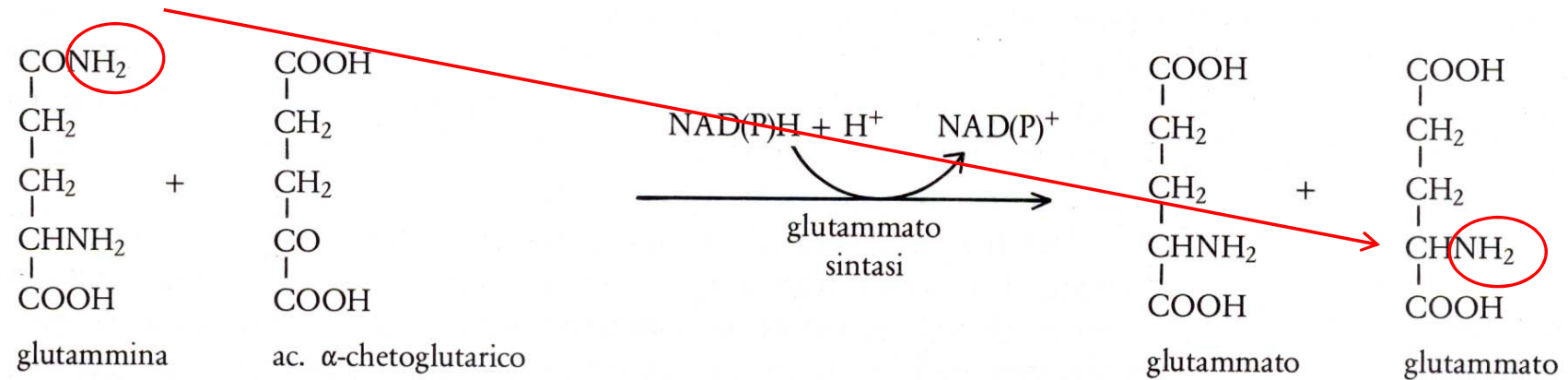
GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

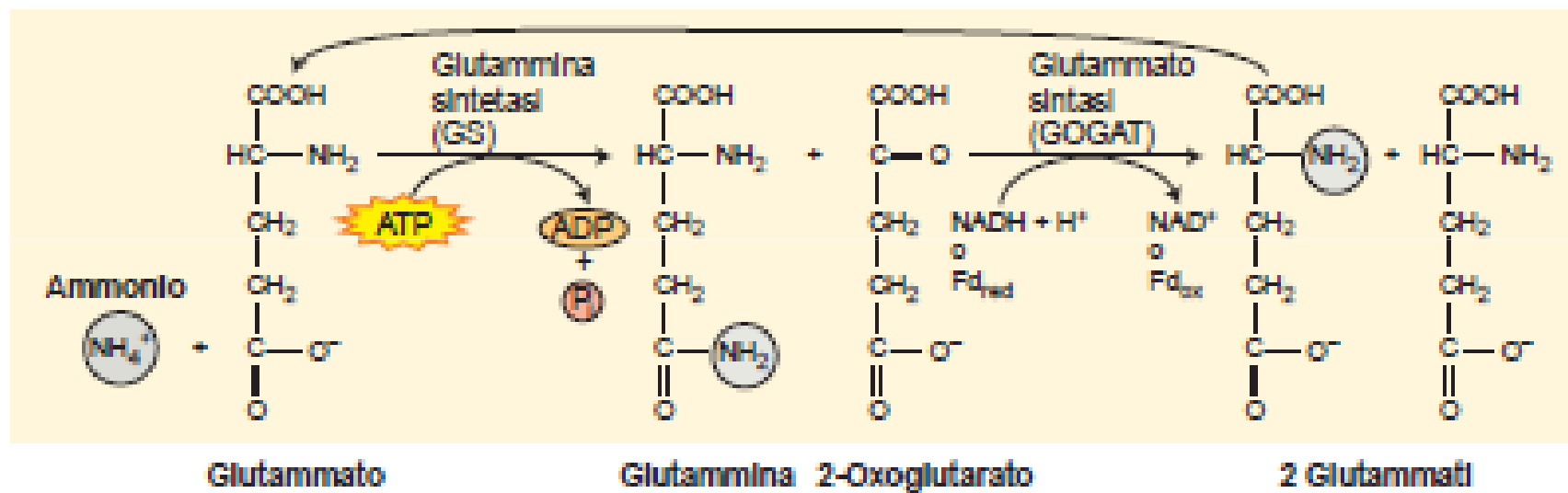
(GOGAT = glutammato oxoglutarato aminotransferasi)

GLUTAMMINA SINTETASI (GS)



GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

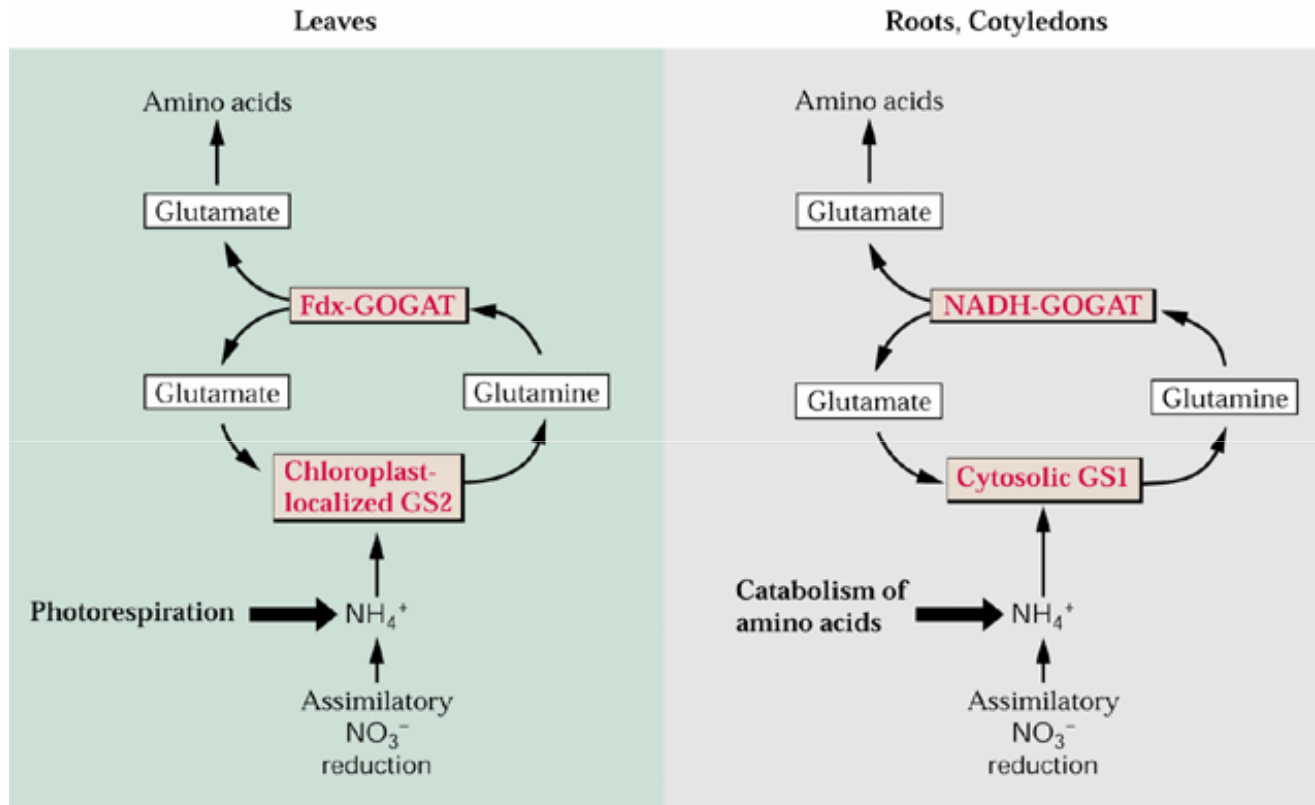




Esistono due isoforme di GS

GS1 (citosolica); soprattutto nelle radici

GS2 (cloroplasto); predominante nelle foglie



GS2: assimilazione primaria azoto nelle foglie e fotorespirazione

GS1: assimilazione primaria azoto nelle radici

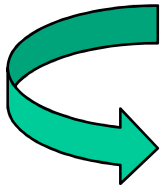
Esistono 2 isoforme di GOGAT

NADH-GOGAT (plastidi di tessuti non fotosintetici)

Fdx-GOGAT (cloroplasti)

Nelle foglie 95% Fdx- GOGAT

mutanti di arabidopsis carenti di Fdx-GOGAT letali
in aria ma non in 1% anidride carbonica

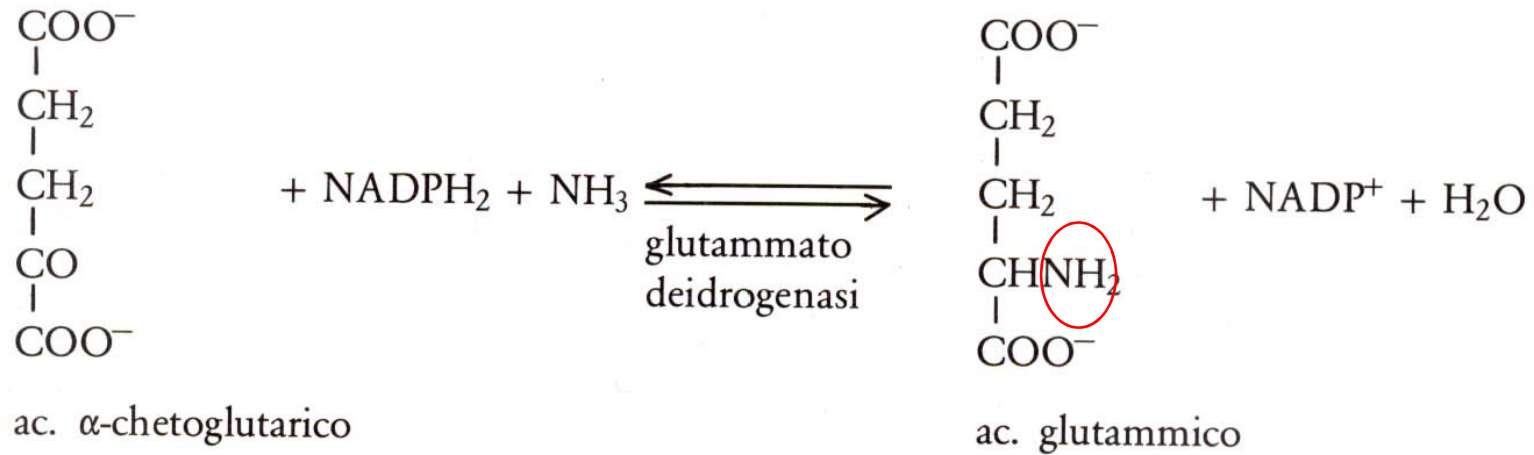


Fdx-GOGAT: assimilazione primaria di azoto nelle foglie e
riassimilazione azoto fotorespiratorio

NADH GOGAT: assimilazione primaria di azoto nelle radici

Presenti altri enzimi

Glutammato deidrogenasi (GDH)



GLUTAMMATO DEIDROGENASI

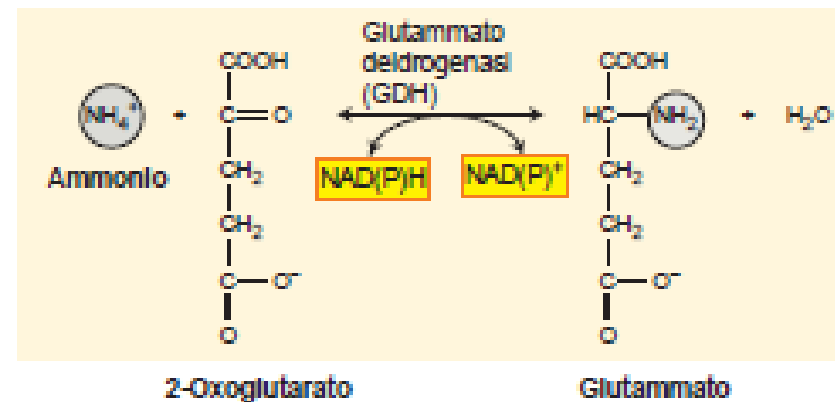
Km per l'ammonio 2-5 mM

assente in cianobatteri

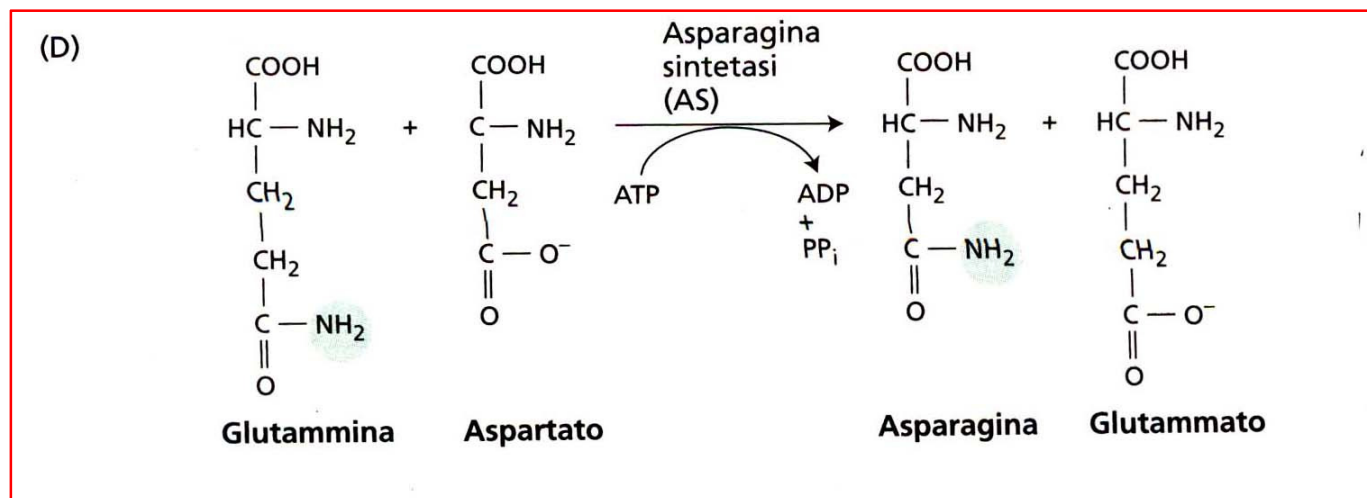
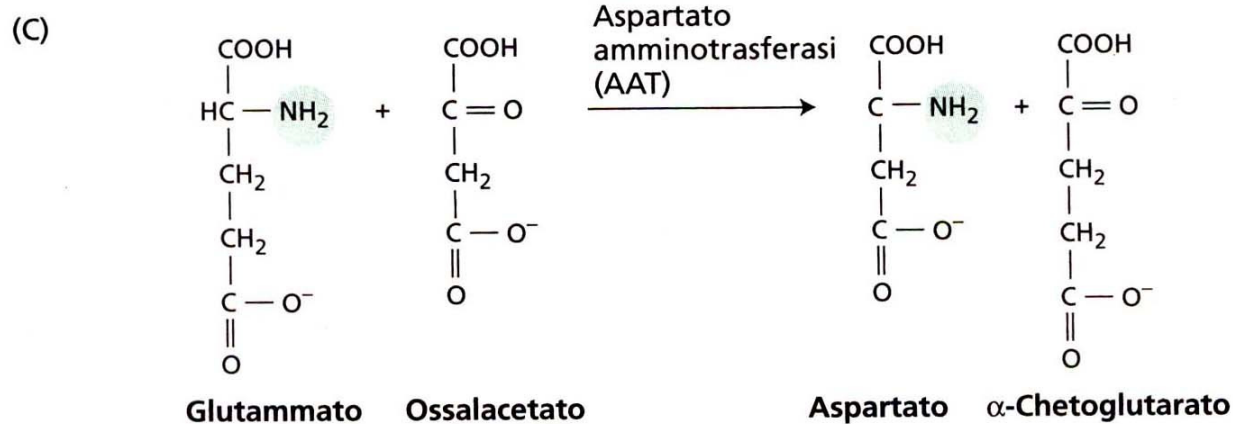
mutanti batterici azotofissatori privi della glutammato deidrogenasi

Presente in mitocondri (NADH) e plastidi NADPH

Funziona nella deaminazione del glutammato per la riallocazione dell'azoto



L'azoto incorporato nella glutamina può essere incorporato in altri aminoacidi
 reazioni di transaminazione (aminotransferasi)



Le piante sintetizzano tutti i 20 acidi

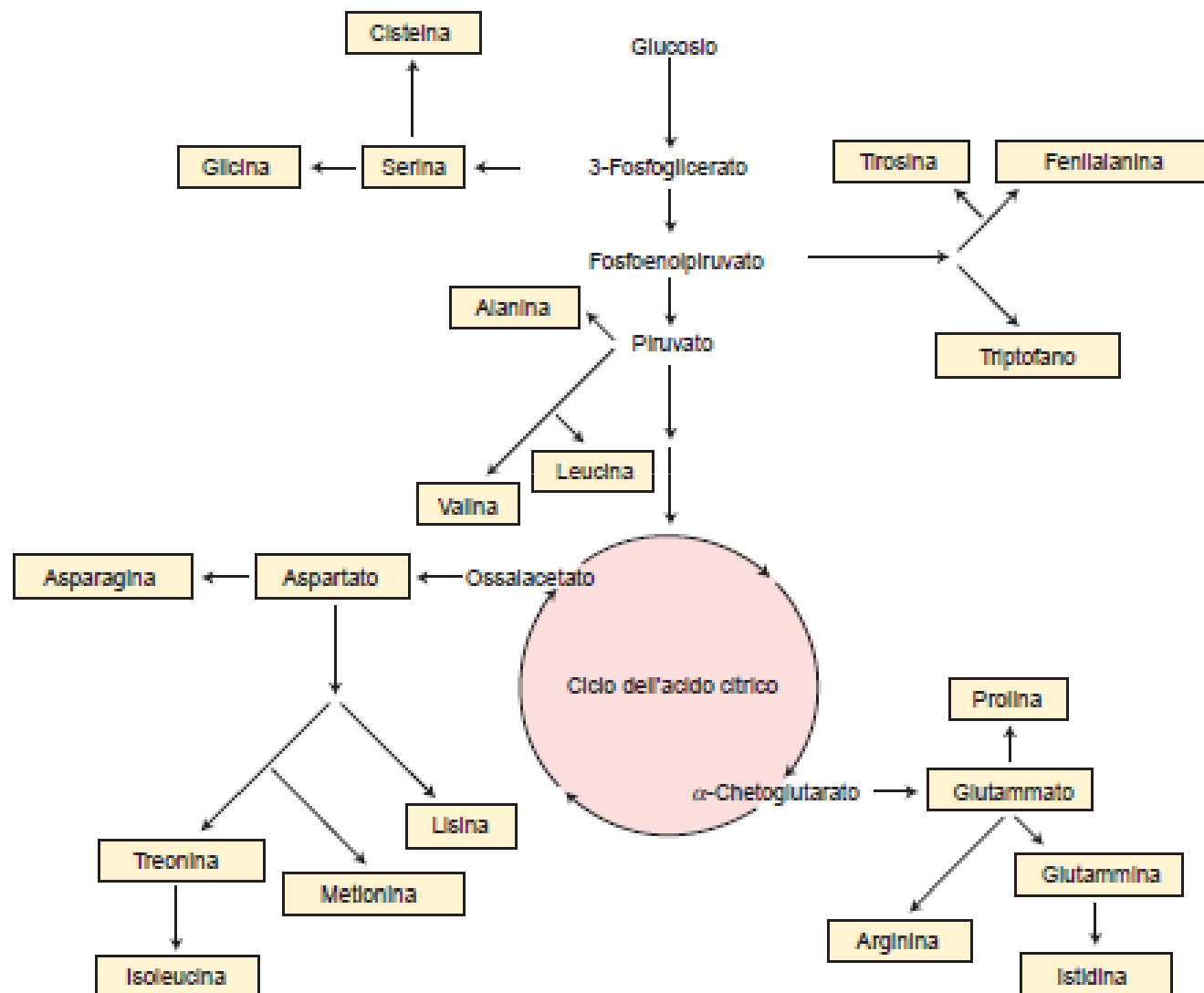
Acidi essenziali (istidina, leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, arginina)

NH₂:

da reazioni di transaminazione con
GLUTAMMINA o GLUTAMMATO

Scheletri carboniosi:

dal 3-P GLICERATO, PEP, PIRUVATO (glicolisi)
 α -chetoglutarato, ossalacetato (ciclo di Krebs)



Asparagina primo aminoacido scoperto:

**sostanza cristallina da estratti di asparago
(forma di trasporto dell'azoto)**

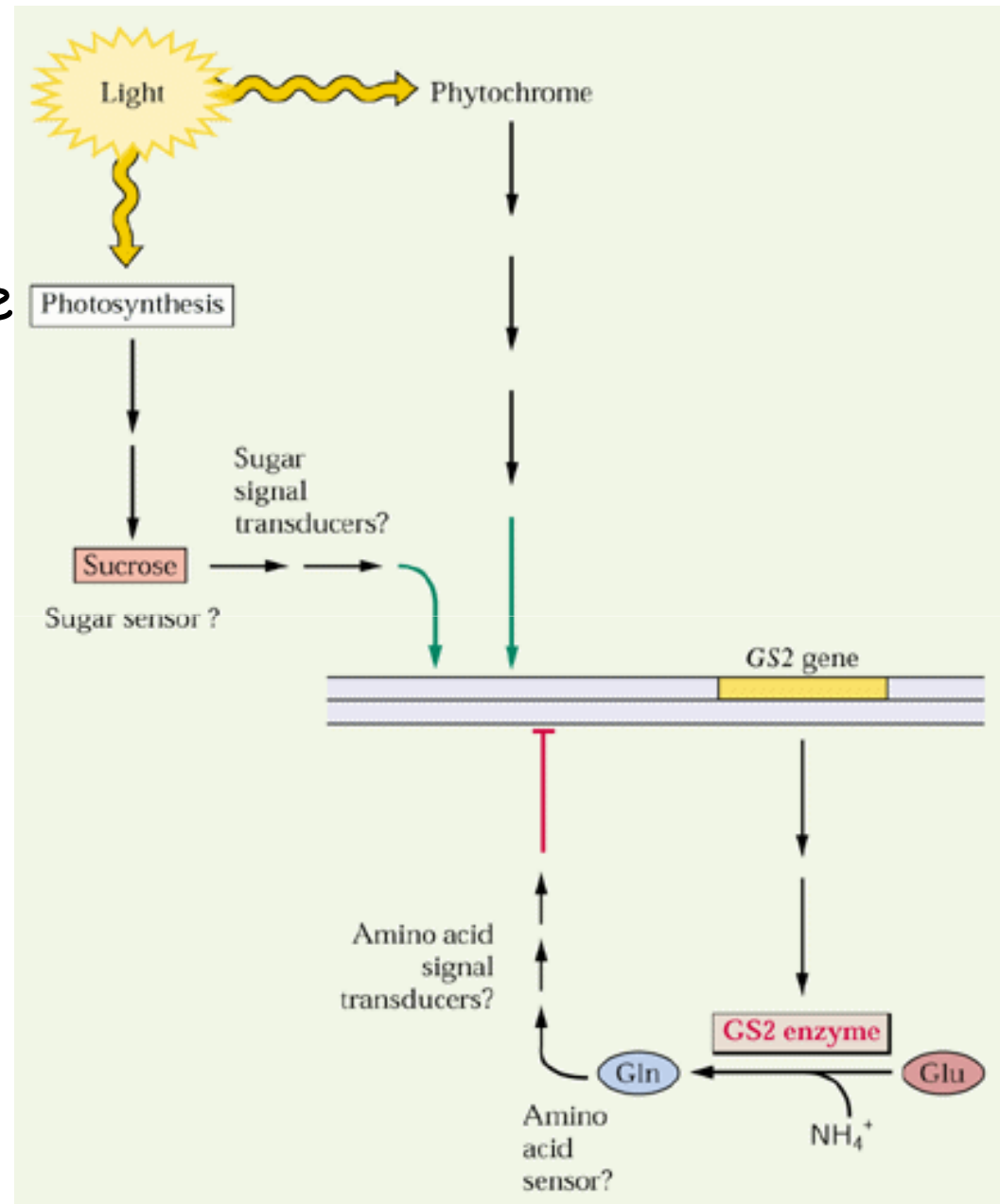
Le quantità aumentano in piante cresciute al buio

**Gli asparagi bianchi hanno un contenuto più
elevato di asparagina perché sono cresciuti
sotto tumuli di terra (aroma più intenso)**



**Geni per la biosintesi espressi prevalentemente al buio
(anche in arabidopsis)**

Regolazione della trascrizione del gene della GS da parte della luce e di metaboliti



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

Fissazione simbiotica dell'azoto	
Pianta ospite	Genere di procariota azoto-fissatore
Piante leguminose: <i>Parasponia</i>	<i>Azorhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Photorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>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> cianobatterio
Canna da zucchero	<i>Acetobacter</i>
Fissazione dell'azoto in batteri liberi	
Tipo di batterio	Genere azoto-fissatore
Cianobatteri (alge verdazzurre)	<i>Anabaena</i> , <i>Calothrix</i> , <i>Nostoc</i>
Altri batteri	
Aerobici	<i>Azospirillum</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Beijerinckia</i> , <i>Derrxia</i>
Facoltativi	<i>Bacillus</i> , <i>Klebsiella</i>
Anaerobici	
Non fotosintetici	<i>Clostridium</i> , <i>Methanococcus</i> (Archeobatterio)
Fotosintetici	<i>Chromatium</i> , <i>Rhodospirillum</i>

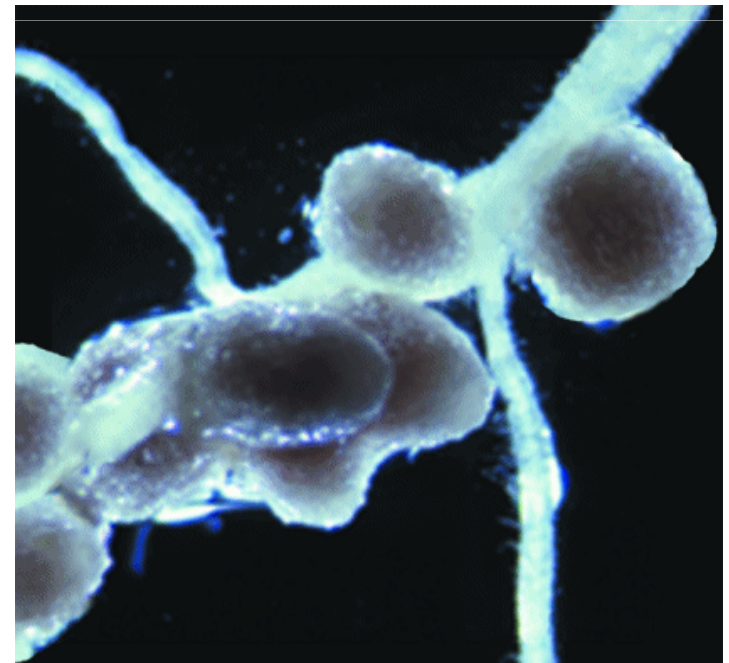
Simbiosi rhizobia/leguminose

TABELLA 12.3
Associazioni fra piante ospite e *Rhizobia*

Pianta ospite	Simbionte <i>Rhizobium</i>
<i>Parasponia</i> (un non legume, definita originariamente <i>Trema</i>)	<i>Bradirhizobium</i> spp.
Soia (<i>Glycine max</i>)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (a crescita lenta), <i>Sinorhizobium fredū</i> (a crescita veloce)
Erba medica (<i>Medicago sativa</i>)	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Sesbania</i> (acquatica)	<i>Azorhizobium</i> (che forma noduli nella radice e sul fusto; i fusti hanno radici avventizie)
Fagiolo (<i>Phaseolus</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i> ; <i>Rhizobium tropiciū</i> ; <i>Rhizobium etli</i>
Trifogli (<i>Trifolium</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
Pisello (<i>Pisum sativum</i>)	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
<i>Aeschynomene</i> (acquatica)	<i>Photorhizobium</i> (rizobi fotosinteticamente attivi che formano noduli sui fusti, associati probabilmente a radici avventizie)

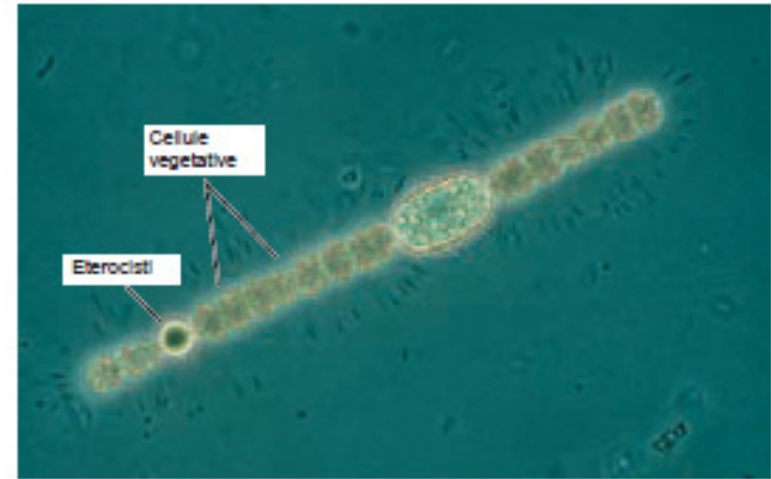


PLATE 2. Soybean root nodules. (See Figure 6.2.)





Soia

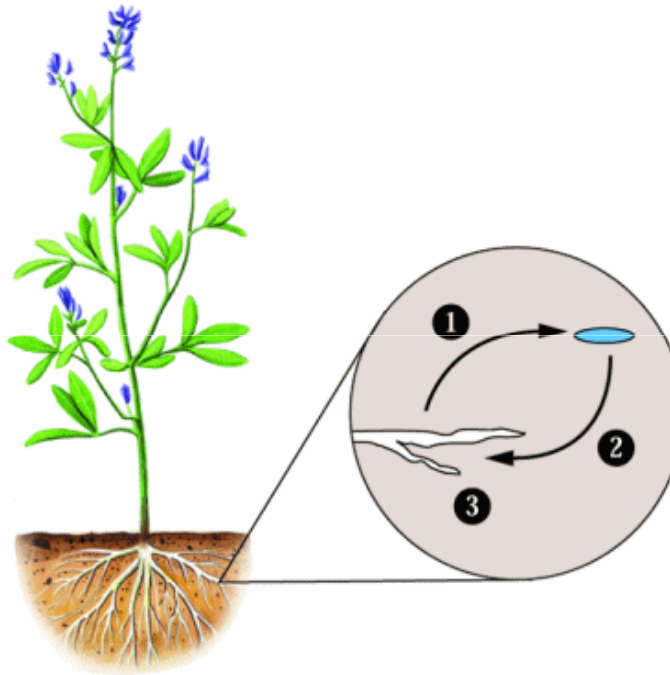


Anabena (cianobatterio
fissa l' N_2 in associazione con
la felce d'acqua Azolla)

Cianobatteri = rifornimento di azoto nelle piantagioni di riso

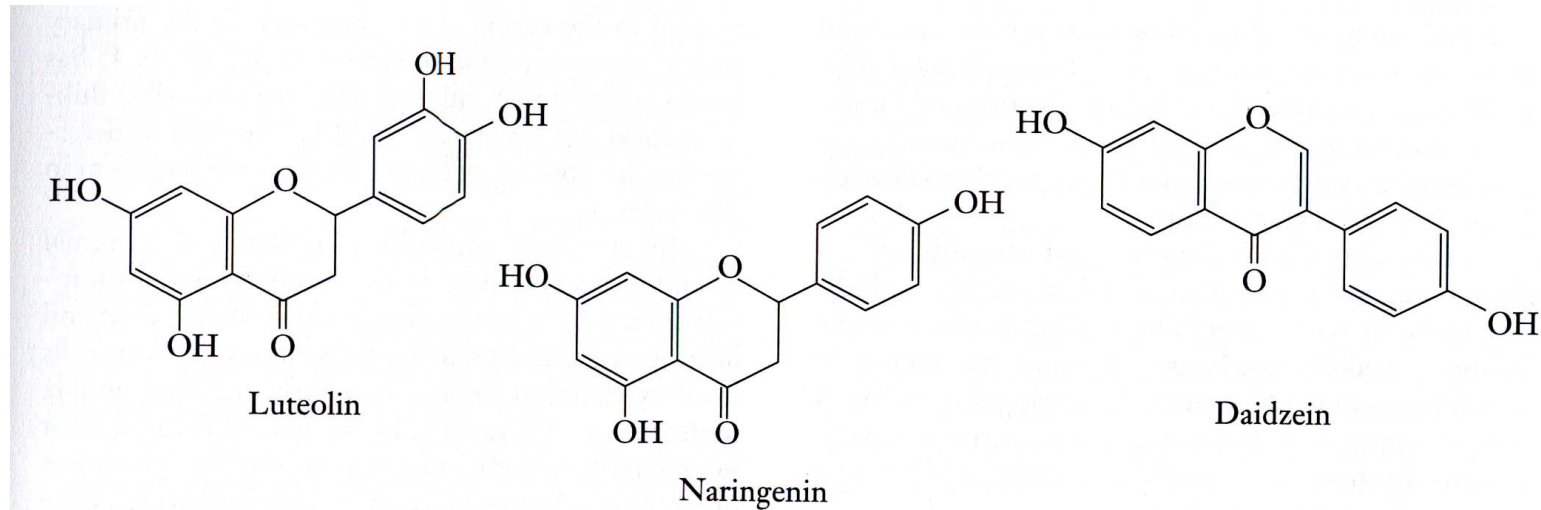
Simbiosi rhizobia/leguminose

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



- 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 elicitori dell'espressione dei geni *nod* batterici



Piante: geni **Nod** (*geni delle noduline*)

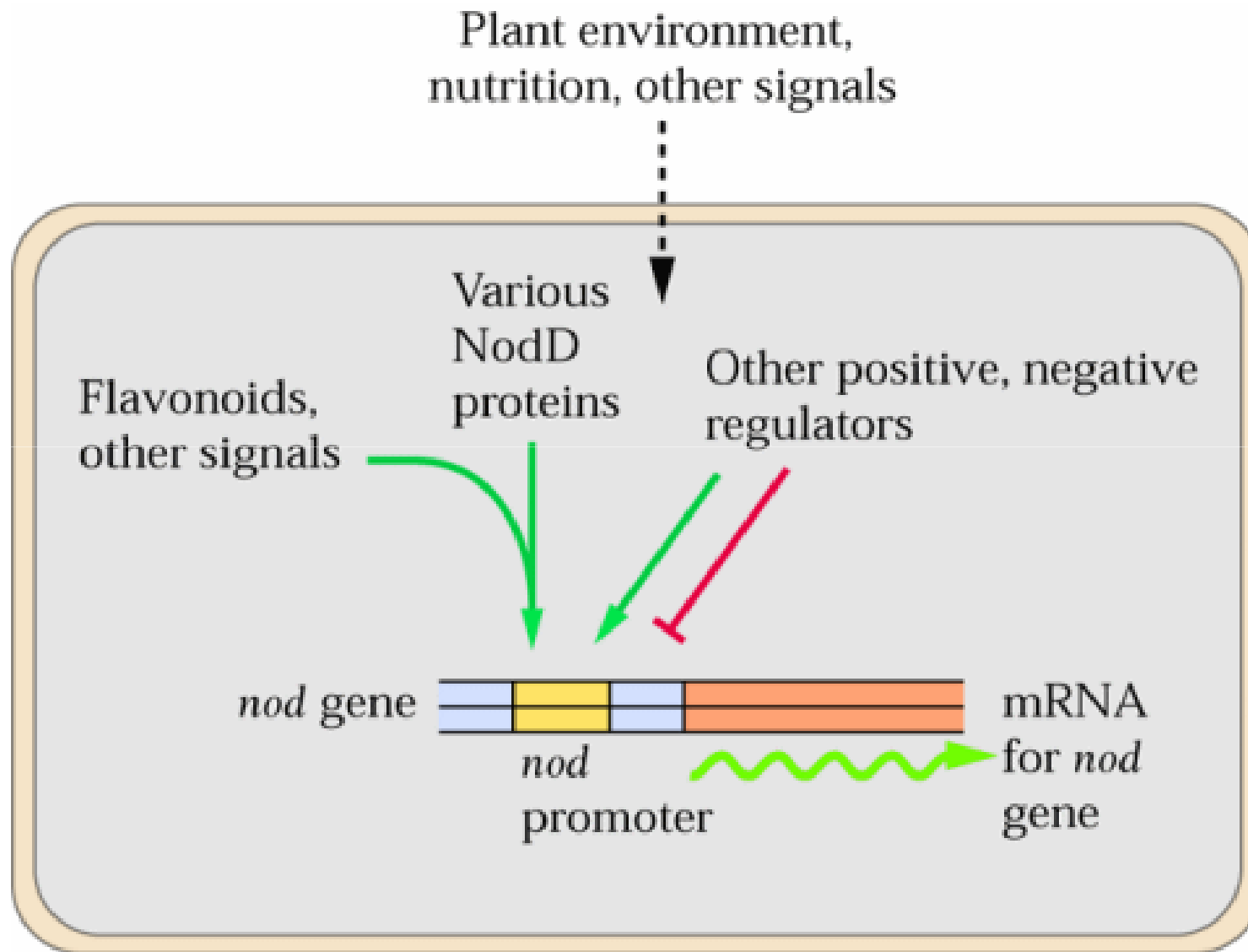
Rizobi: geni **nod** (*geni della nodulazione*)

geni nod **comuni** (nod A, nod B nod C)

geni nod **ospite specifici** (nod P, nod H nod Q; nod E,
Nod F, nod L)

nodD espresso costitutivamente

il prodotto proteico **Nod D** (batterico) regola
la trascrizione degli altri geni *nod*

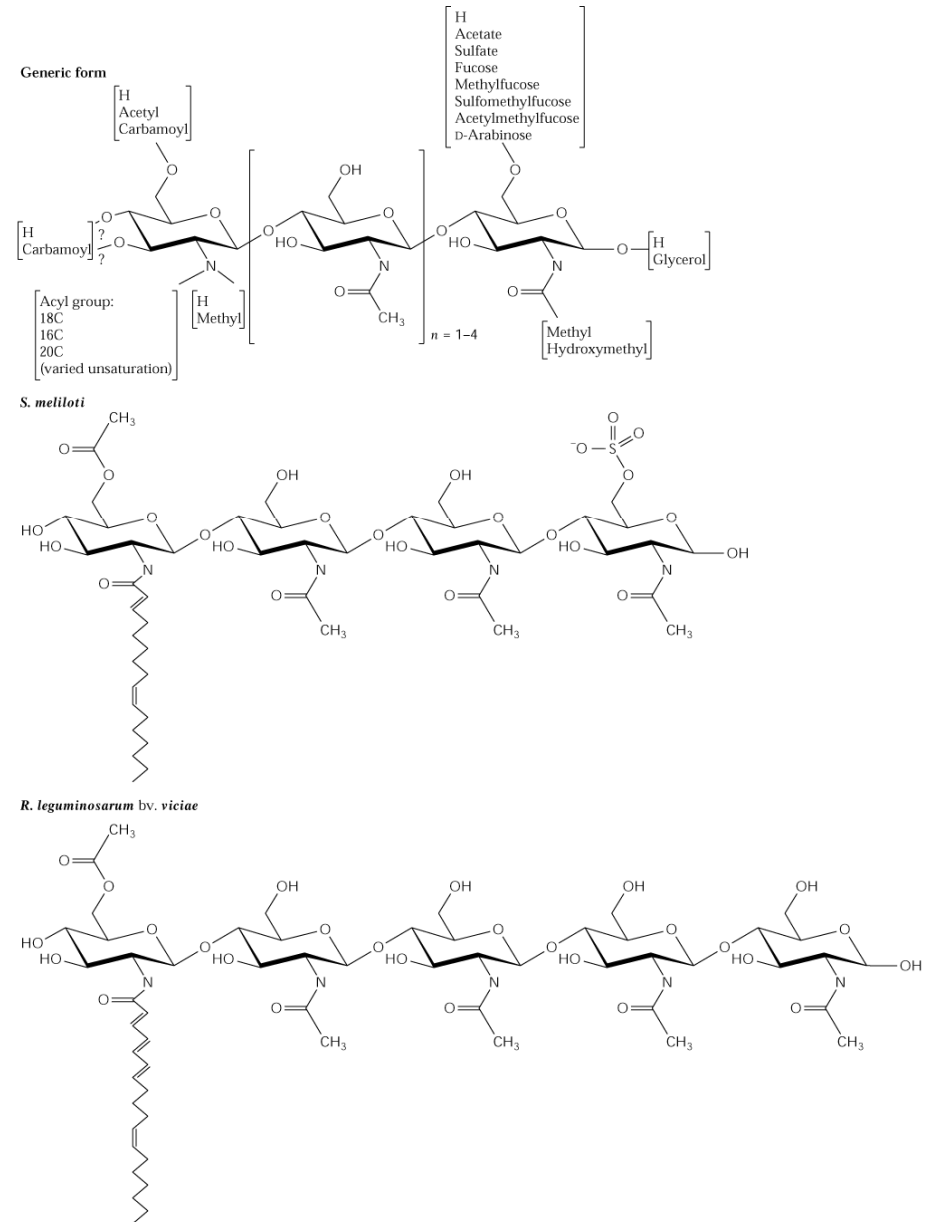


I geni *nod* codificano per enzimi di biosintesi dei fattori Nod



Lipochitin-oligosaccaridi

Segnali per la simbiosi
(fattori di nodulazione)

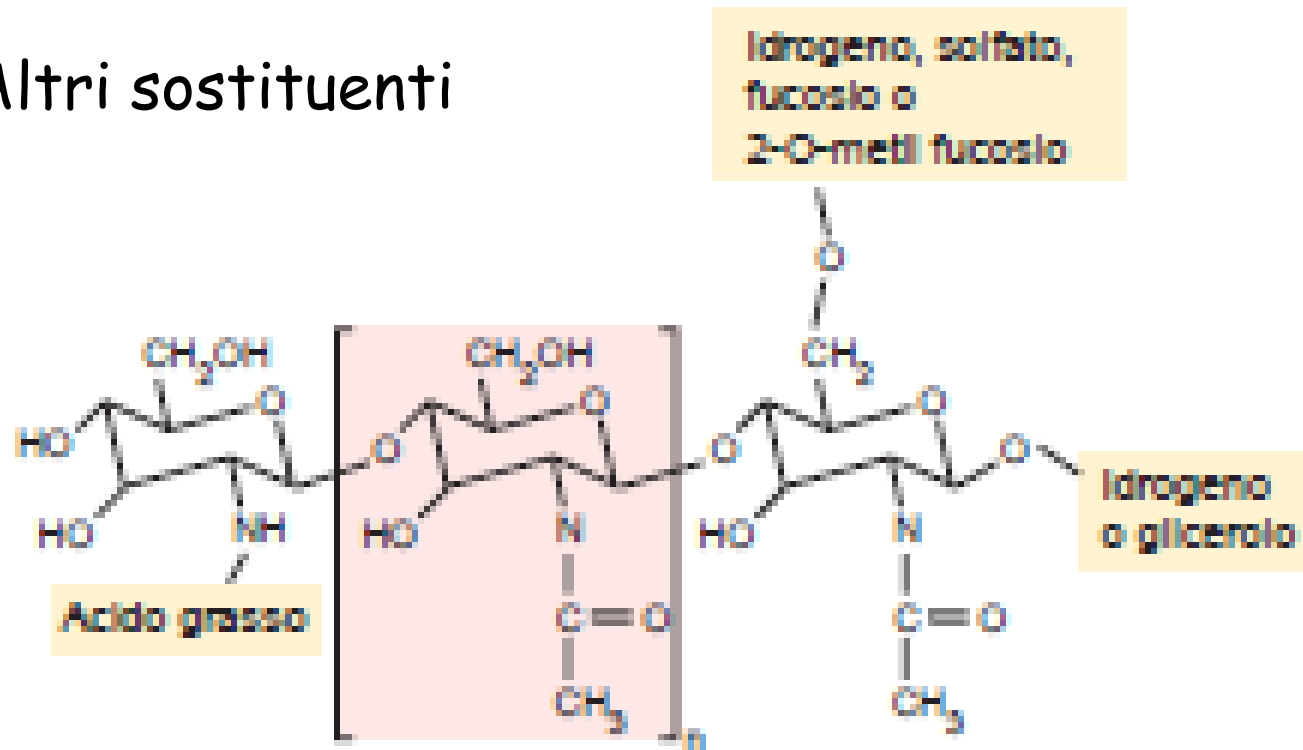


Fattori Nod batterici: lipo-oligosaccaridi

N-acetil glucosamina β 1,4 (3-6 unità)

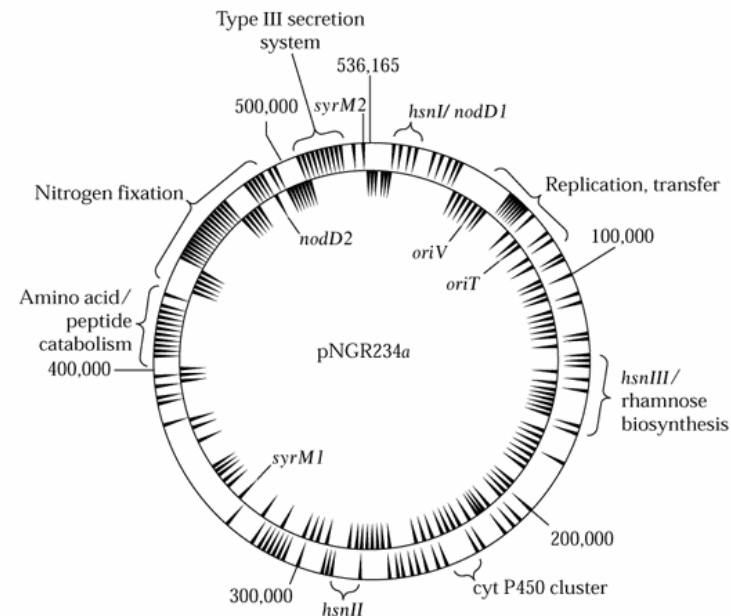
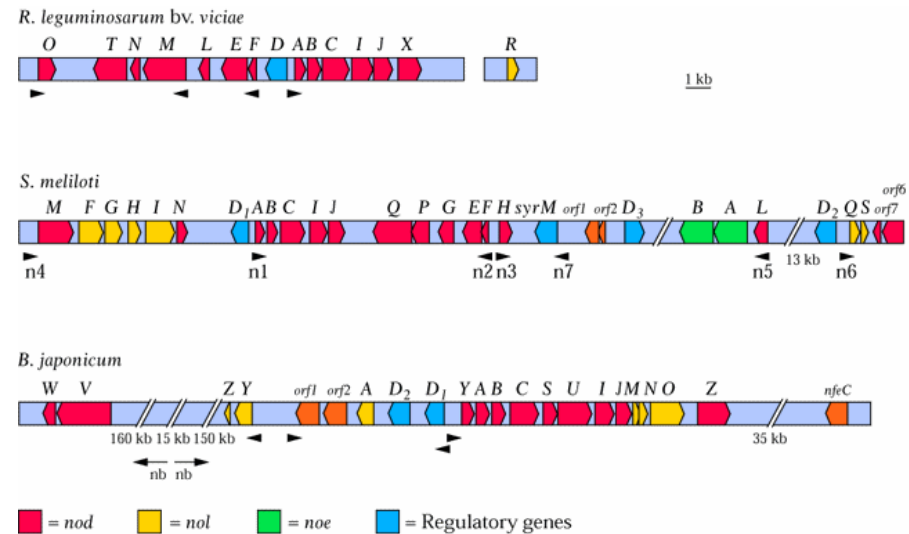
Acido grasso (16, 18 C) in C2 dello zucchero non riducente

Altri sostituenti



Mappe dei geni nod da differenti ceppi di batteri

In alcune specie i geni nod
sono raggruppati su un
plasmide simbiotico



geni nod comuni:

➤ sintesi scheletro di base dei fattori Nod

geni nod ospite specifici:

➤ modificazioni acido grasso in C2

➤ aggiunta di sostituenti ceppo specifici



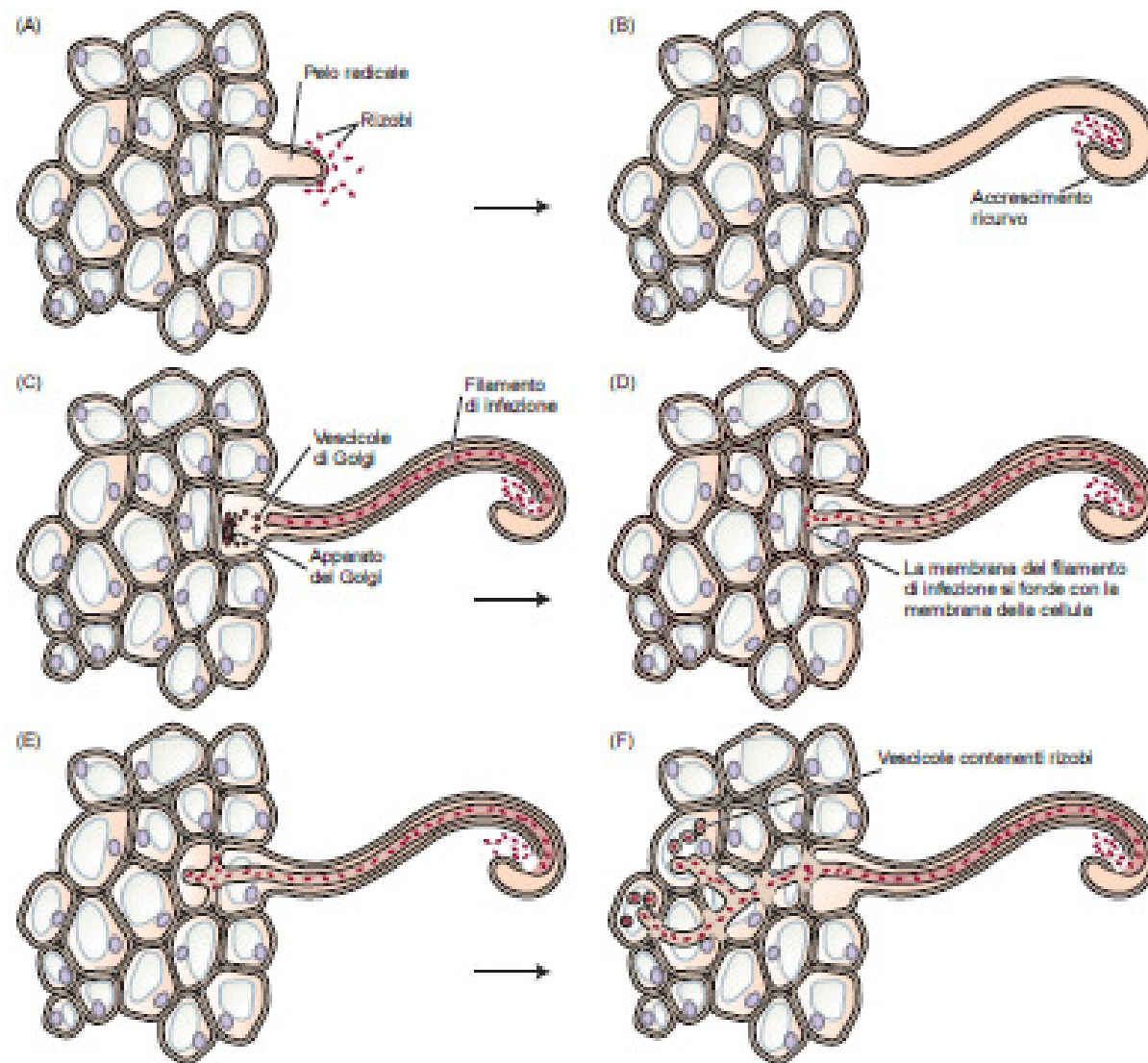
La pianta ospite reagisce a specifici fattori Nod

FORMAZIONE DEL NODULO RADICALE

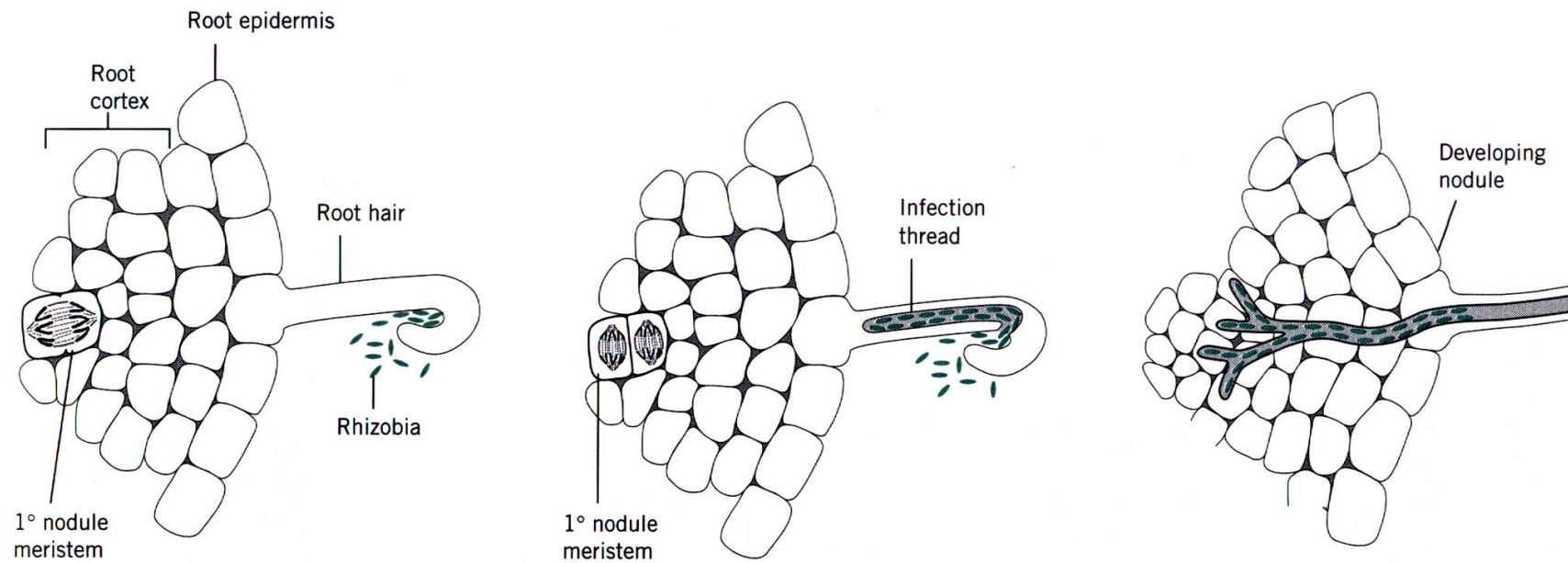
➤ INFEZIONE

➤ ORGANOGENESI

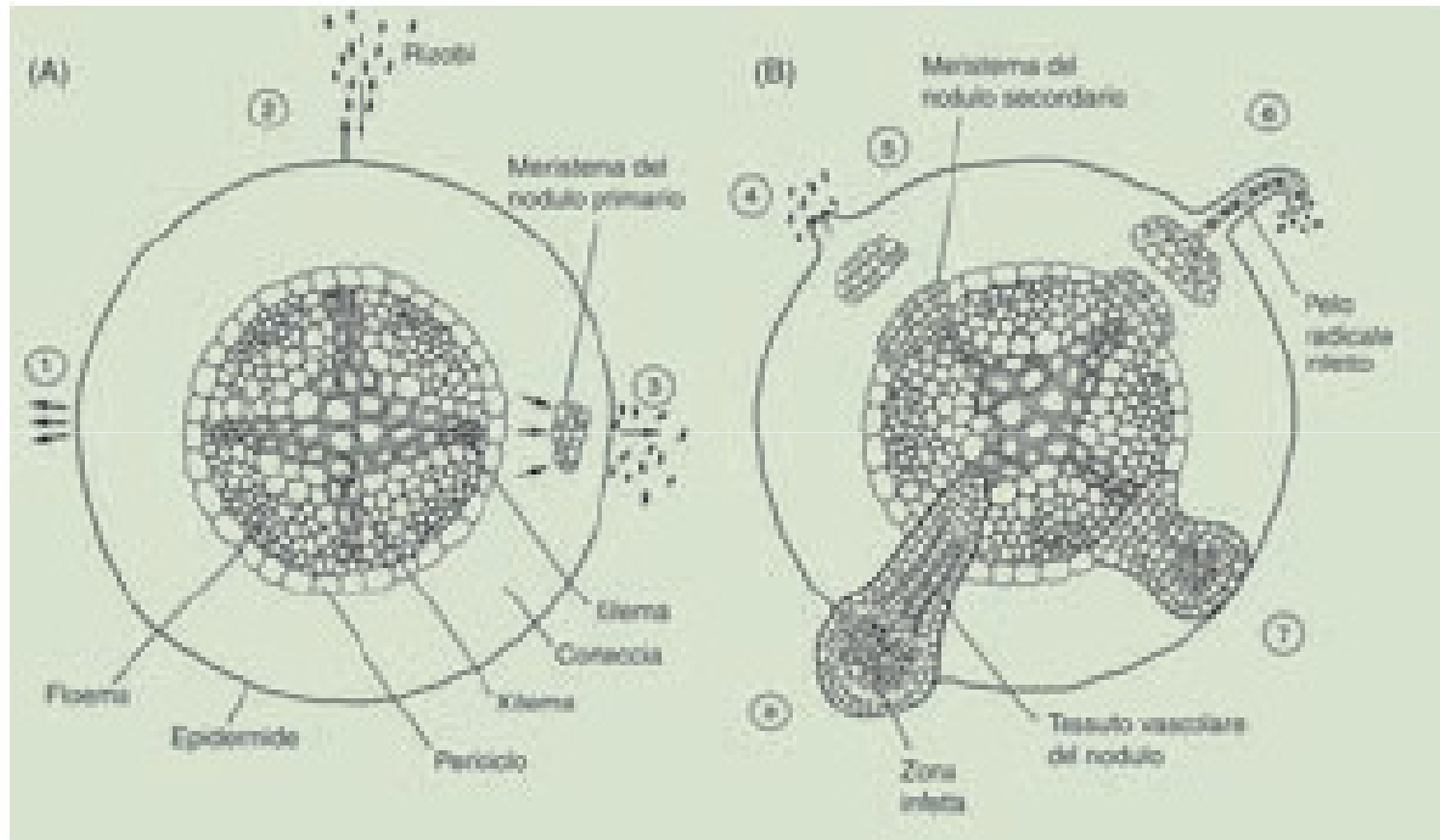
Il processo di infezione



Il filamento di infezione

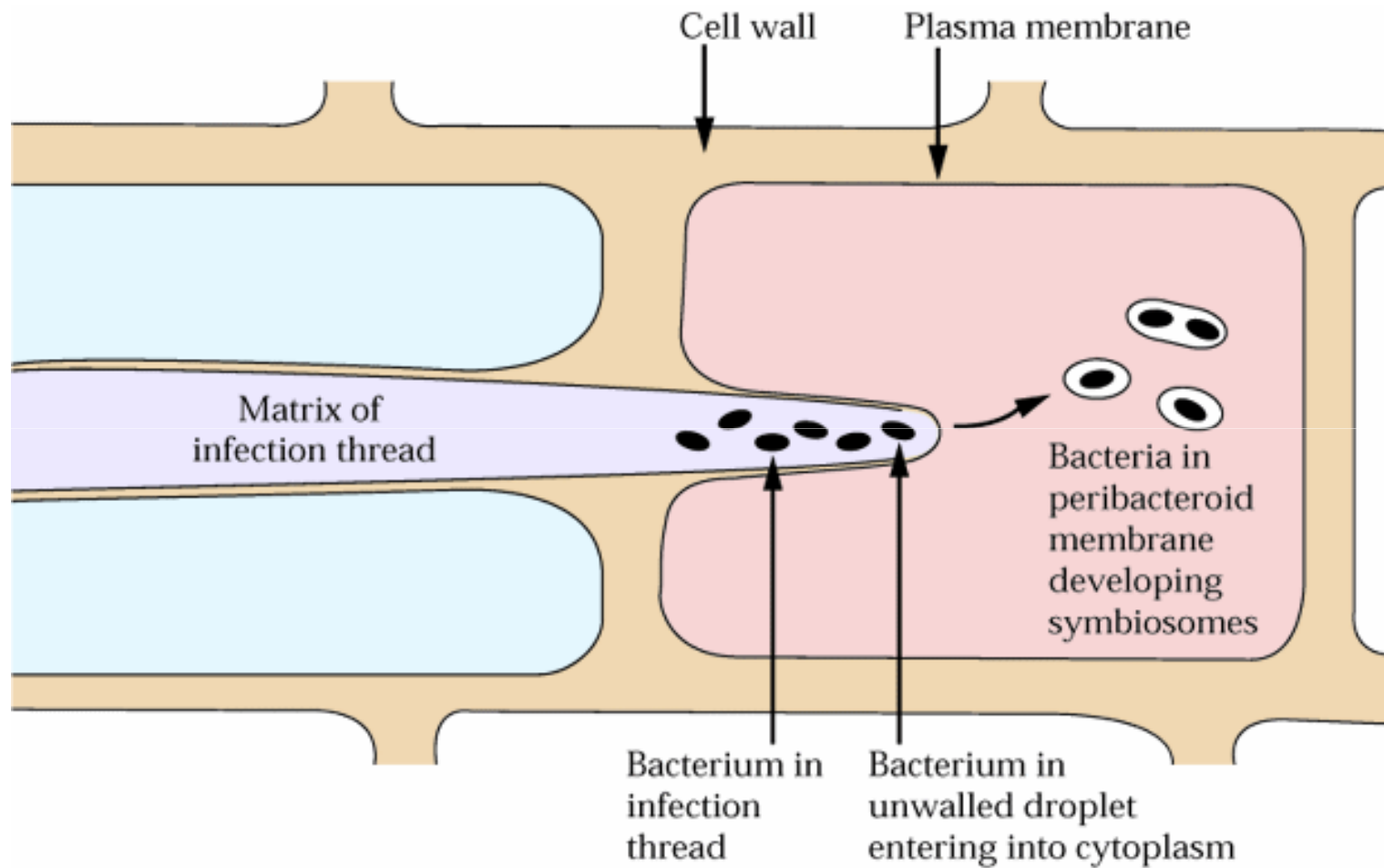


Sviluppo di un nodulo radicale di soia

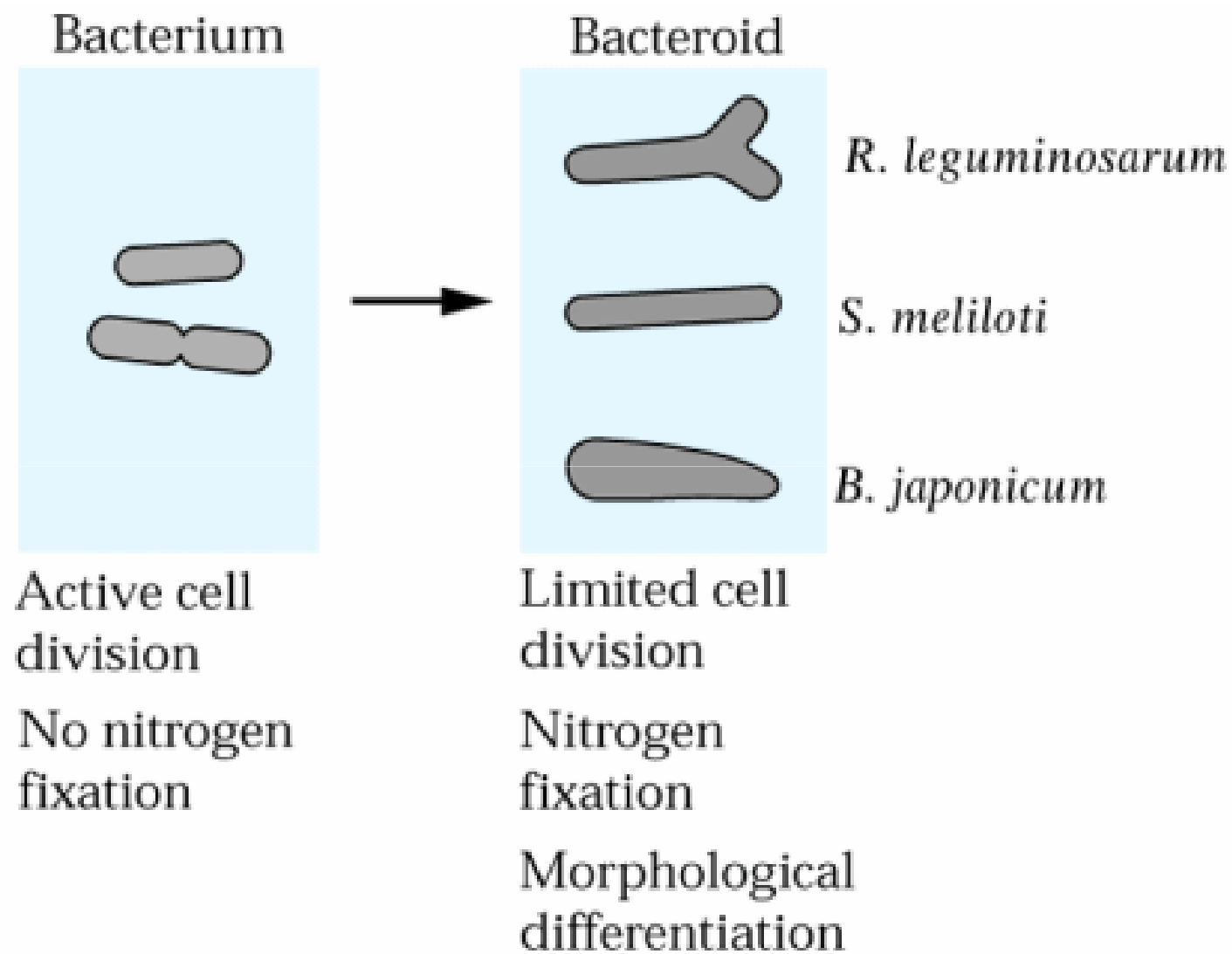


divisioni cellulari in cellule del cortex (meristema primario del nodulo) e del periciclo (meristema del nodulo secondario)

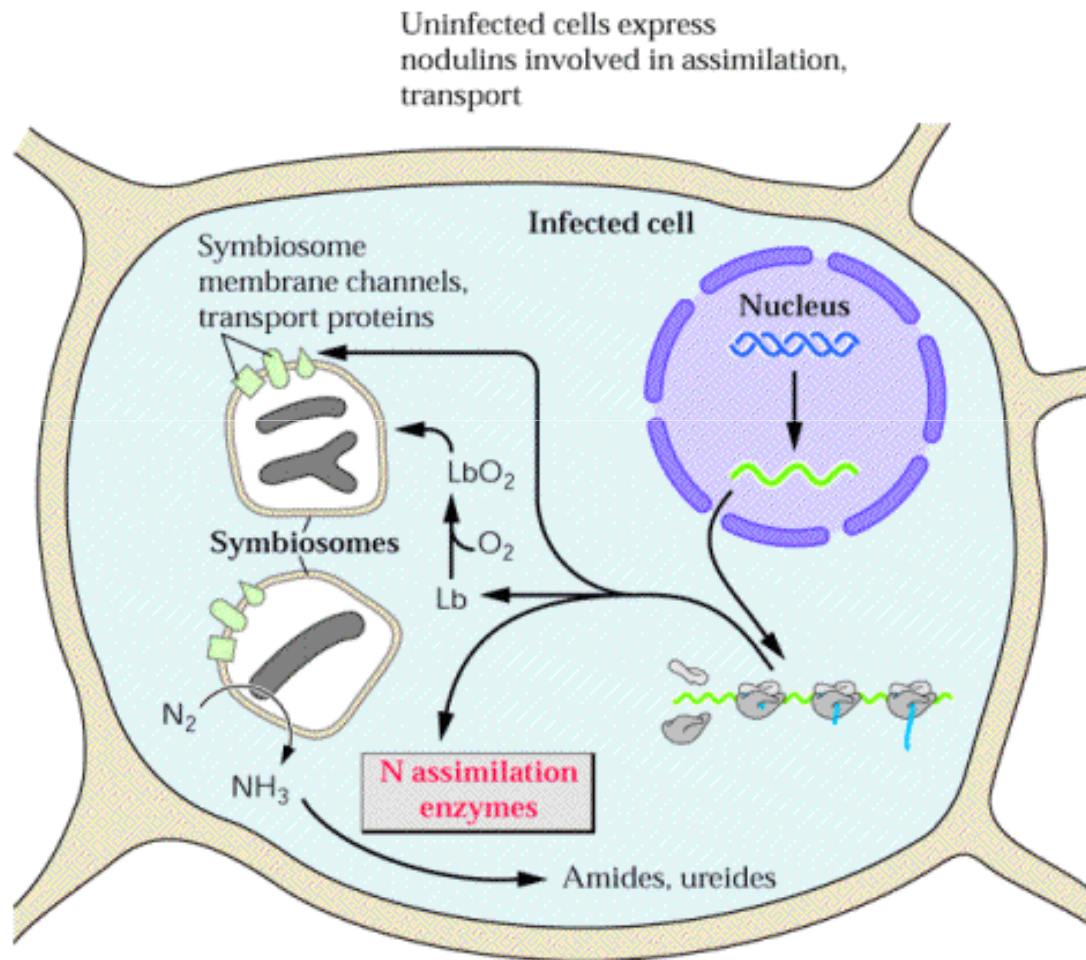
Rilascio dei batteri dal filamento di infezione



Differenze tra batteri e batteroidi



Cellula infettata dai batteroidi

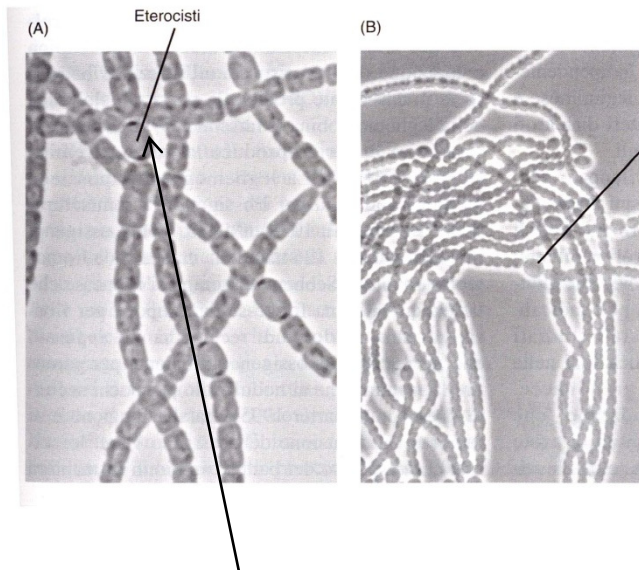


La pianta sintetizza **noduline**:
leghemoglobina
enzimi per l'assimilazione
dell' NH_3
proteine di trasporto

La fissazione di N_2 richiede un ambiente anaerobico

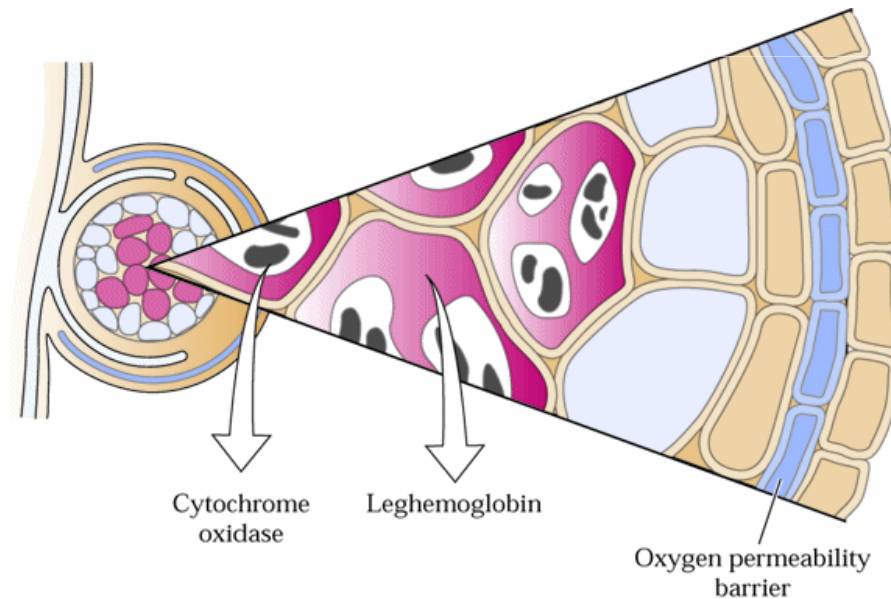
(Vengono trasferiti elettroni ad alta energia e l' O_2 è un accettore di elettroni)

cianobatteri



ETEROCISTI (manca PSII)

simbiosi



nei noduli leghemoglobina

L' N₂ è fissato dalla nitrogenasi

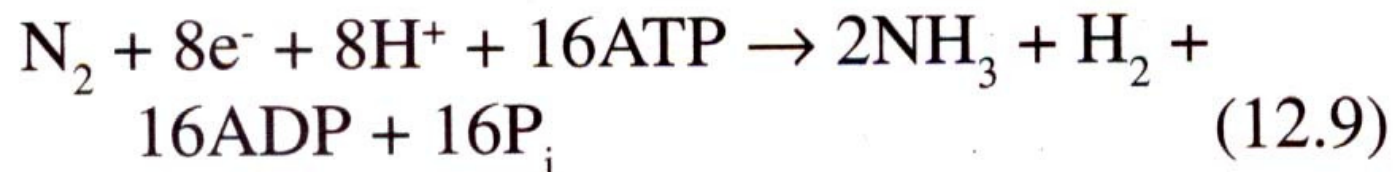
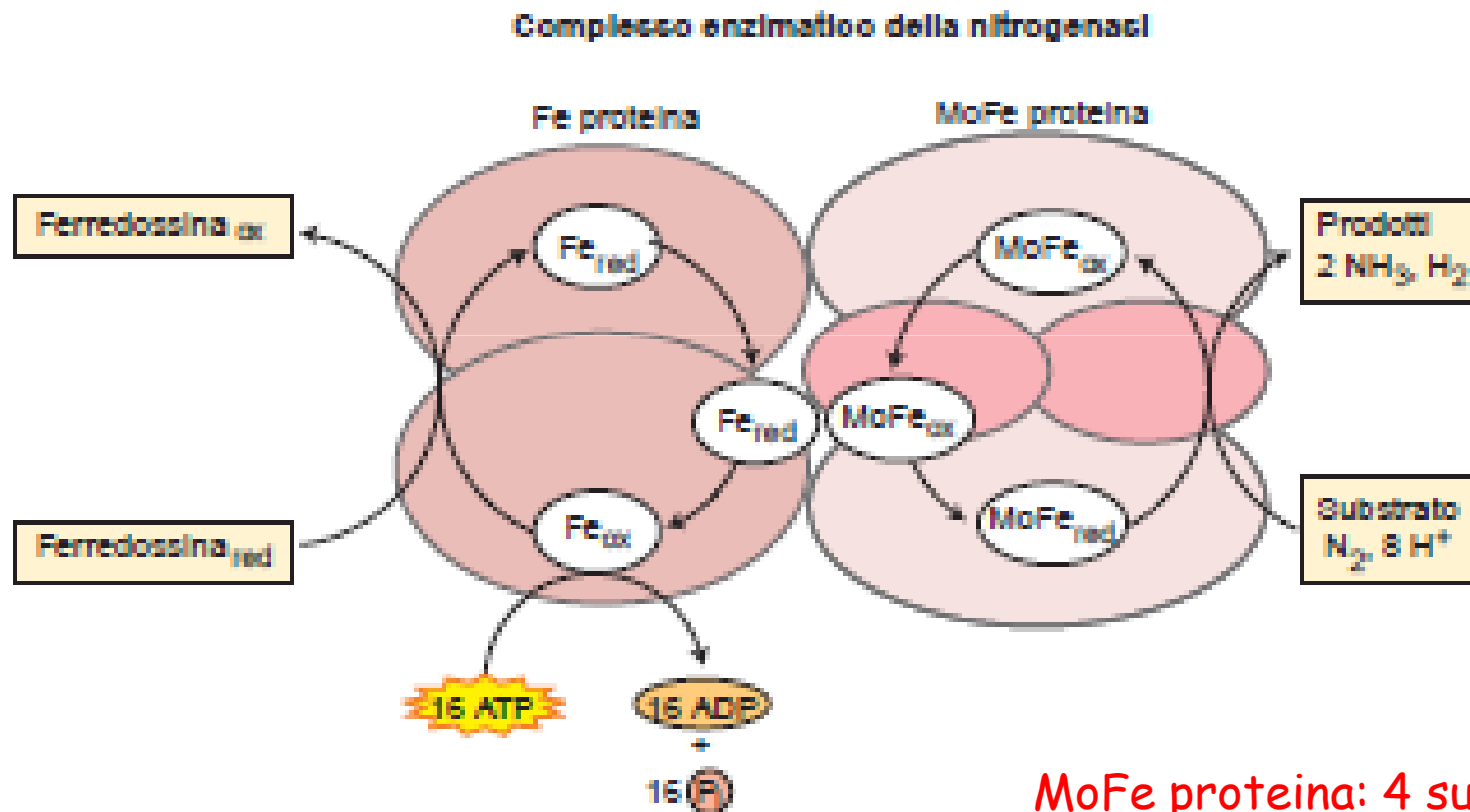


Tabella 12.4 Reazioni catalizzate dalla nitrogenasi

$\text{N}_2 \rightarrow \text{NH}_3$	Fissazione di azoto molecolare
$\text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2 + \text{H}_2\text{O}$	Riduzione del protossido d'azoto
$\text{N}_3^- \rightarrow \text{N}_2 + \text{NH}_3$	Riduzione dell'azide
$\text{C}_2\text{H}_2 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_4$	Riduzione dell'acetilene
$2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2$	Produzione di H ₂
$\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$	Attività idrolitica dell'ATP

Fonte: Da Burris 1976

Schema della reazione catalizzata dalla nitrogenasi

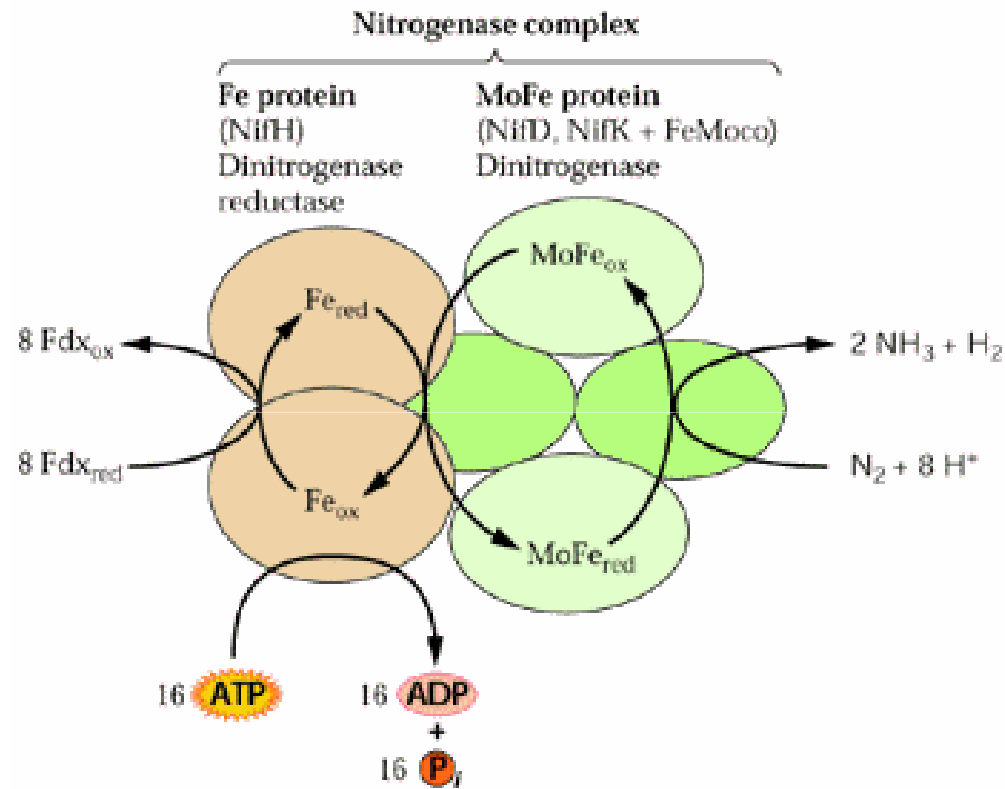


Fe proteina: 2 subunità; 1 Fe₄ S₄
inibita da O₂

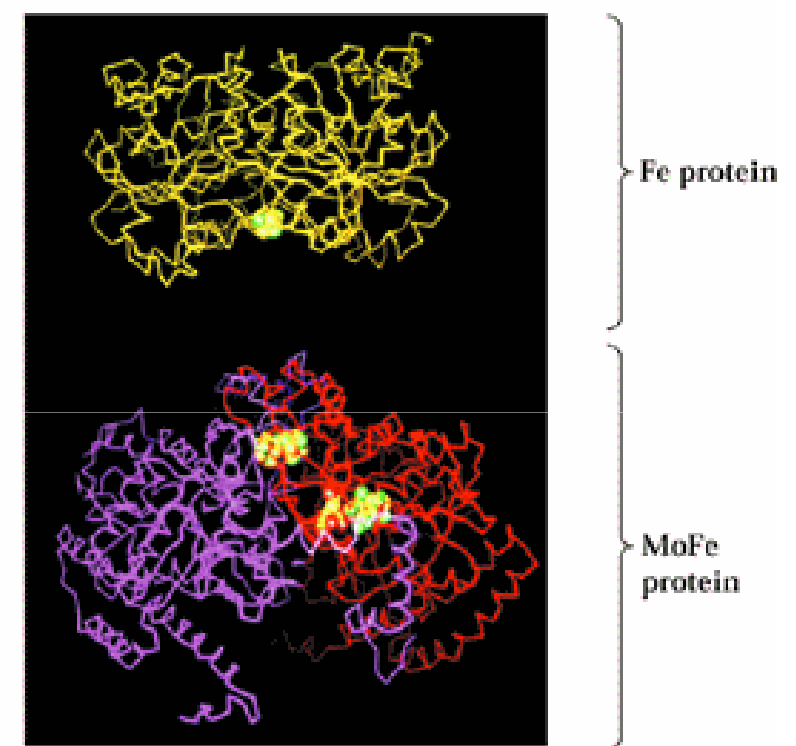
MoFe proteina: 4 subunità;
2 gruppi Mo-Fe-S
inibita da O₂

Struttura della nitrogenasi

(A)



(B)



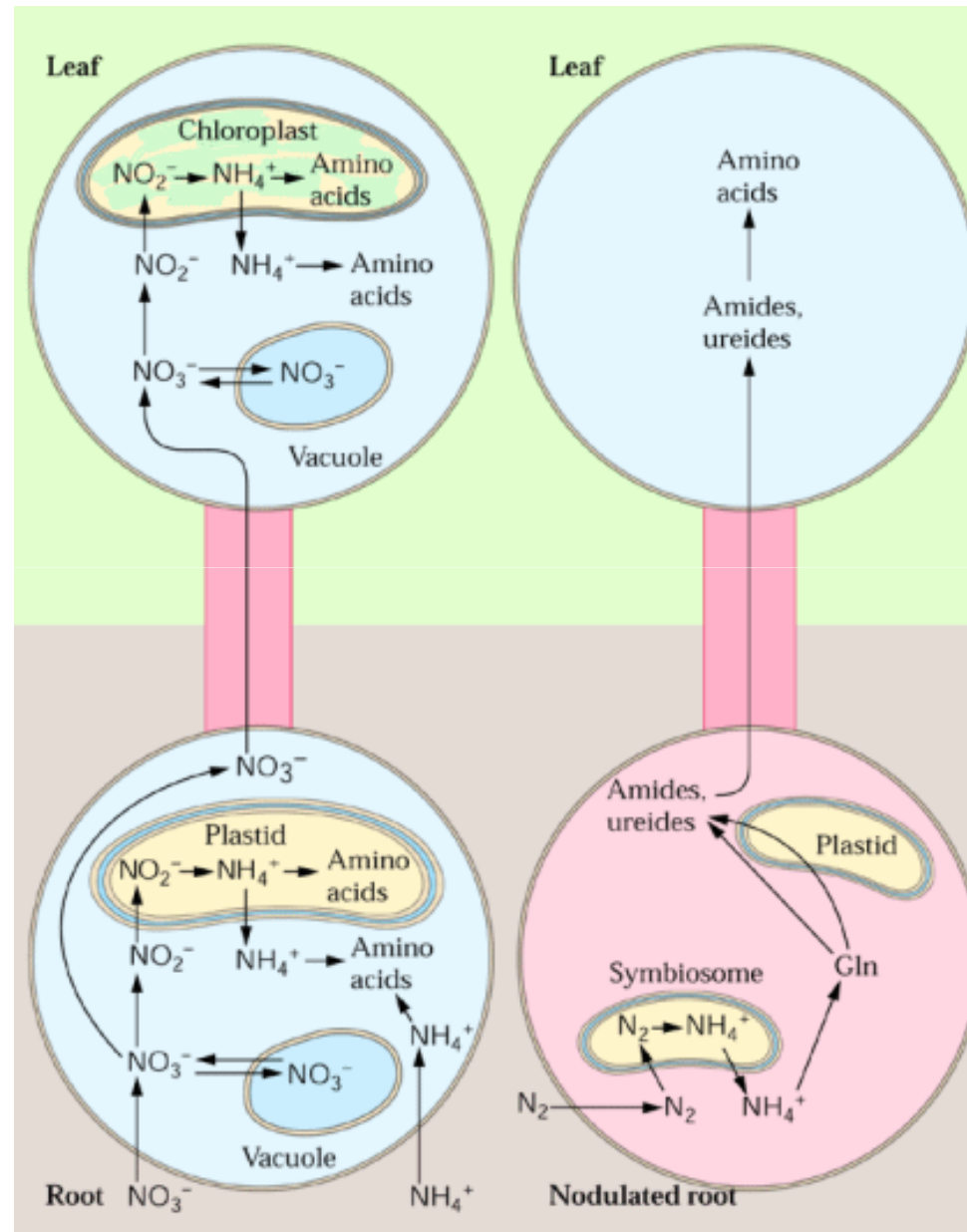
Richiesto un grande input energetico (16 ATP)
a causa dell'inerzia del triplo legame nell' N_2

Vengono consumati 12 g di C per g di N_2 fissato

La resa energetica della reazione è diminuita a causa della
produzione di H_2

Alcune piante possiedono la idrogenasi che riossida l' H_2
recuperando gli elettroni per la riduzione di N_2

assimilazione dell'azoto dal nitrato e dall'azoto molecolare

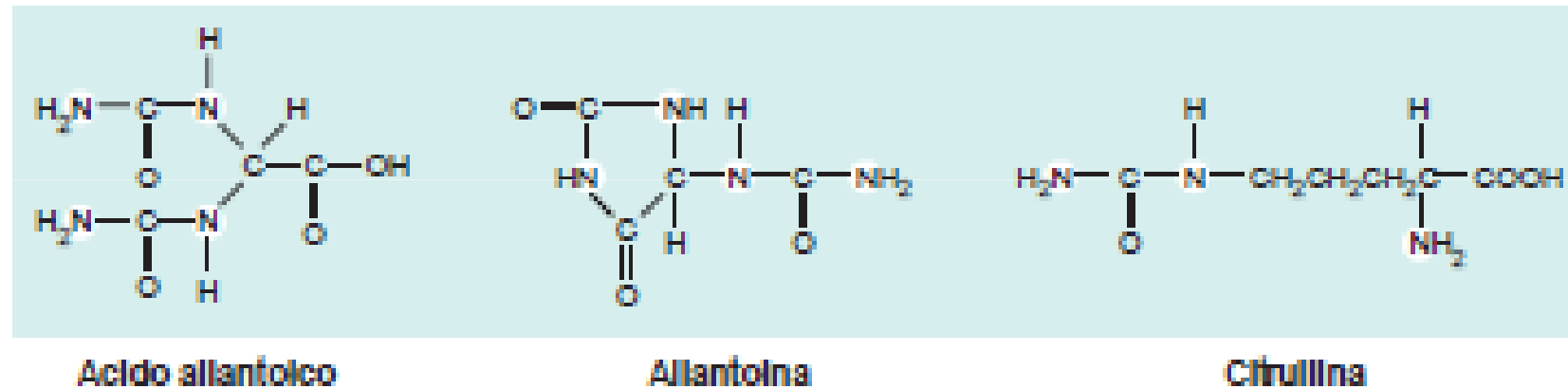


Le forme di trasporto (xilema) dell'azoto sono le **ammidi** (glutammina, asparagina) e le **ureidi** (leguminose tropicali)

Ammidi C/N = **2:1**

Ureidi C:N = **1:1**

UREIDI



la deaminazione di ammidi e ureidi fornisce l'azoto per la sintesi di aminoacidi e basi azotate

ASSIMILAZIONE DELLO ZOLFO

Incorporato in:

Aminoacidi (cisteina metonina)

Centri Fe-S

Siti catalitici

Metaboliti secondari

Assorbito come solfato (SO_4^{2-})

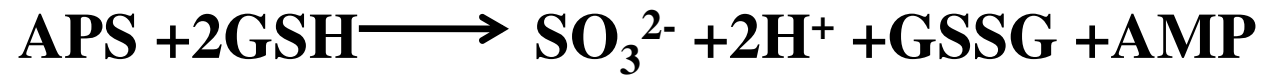
Solfato:

assorbito dal suolo mediante simporto
con il protone

ridotto a cisteina nelle foglie



(ATP solforilasi: 2 isoforme plastidiale e citosolica)



(APS reduttasi)



(Solfito reduttasi)



(Serina acetiltransferasi)

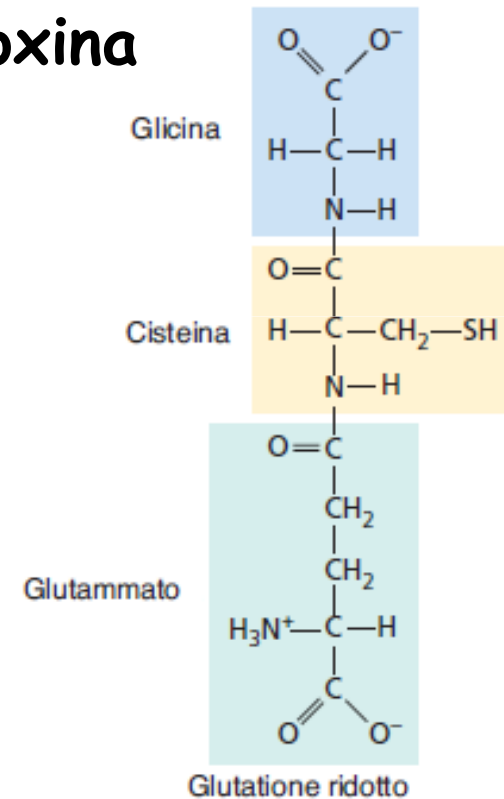


(OAS tiol liasi)

da SO_4^{2-} a S^{2-} = da +6 a -2

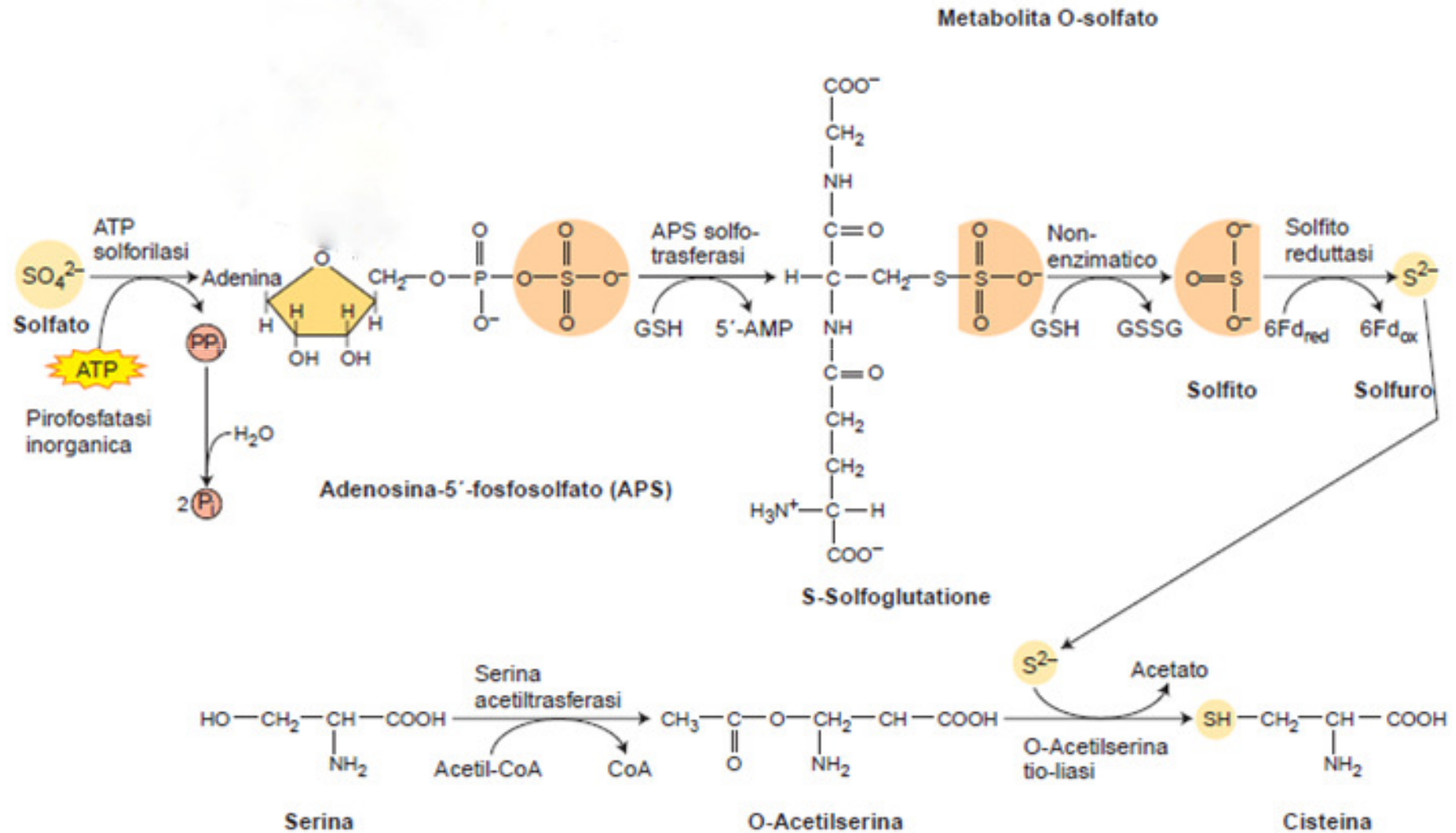
Necessari 8 elettroni

forniti dal glutathione e dalla ferredoxina



Glutatione

Assimilazione del solfato



ASSIMILAZIONE DEL FOSFATO (PO_4^{3-})

assorbito dalle radici tramite simporto con H^+

incorporato in zuccheri fosfati, fosfolipidi nucleotidi

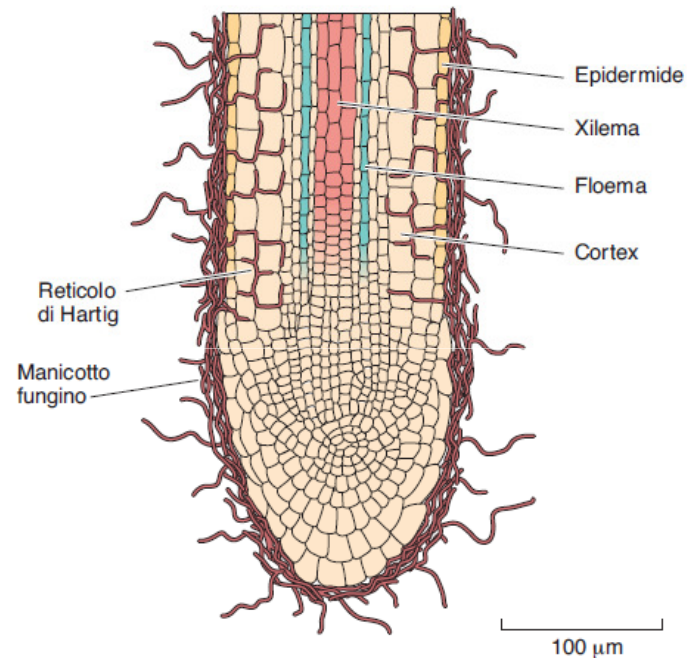
Punto d'ingresso = ATP

$\text{ADP} + \text{P}_i \longrightarrow \text{ATP}$ (mitocondri e cloroplasti)

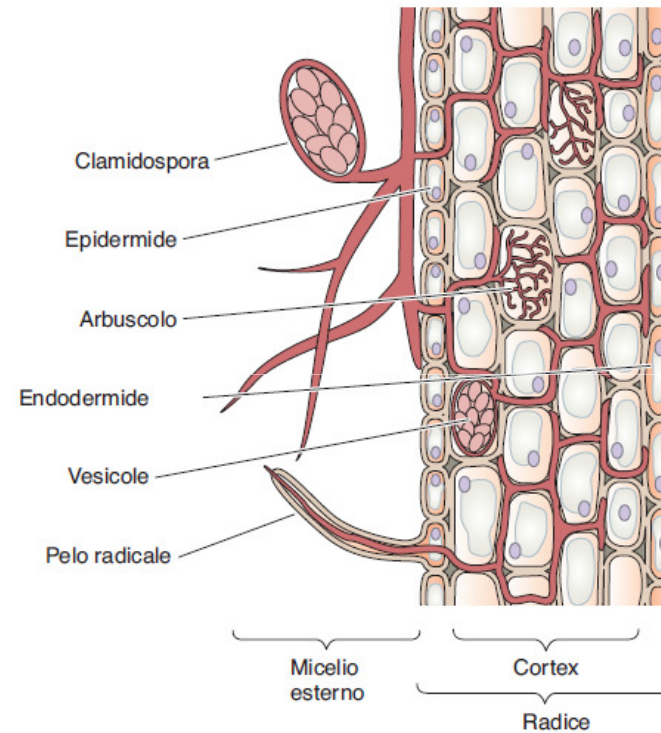
nella glicolisi P_i incorporato nell' 1, 3 bisfosfoglicerato

micorrize

ectotrofica



vescicolo-arbuscolare



L'associazione di funghi micorrizici con le radici incrementa l'assunzione di fosfato e altri nutrienti