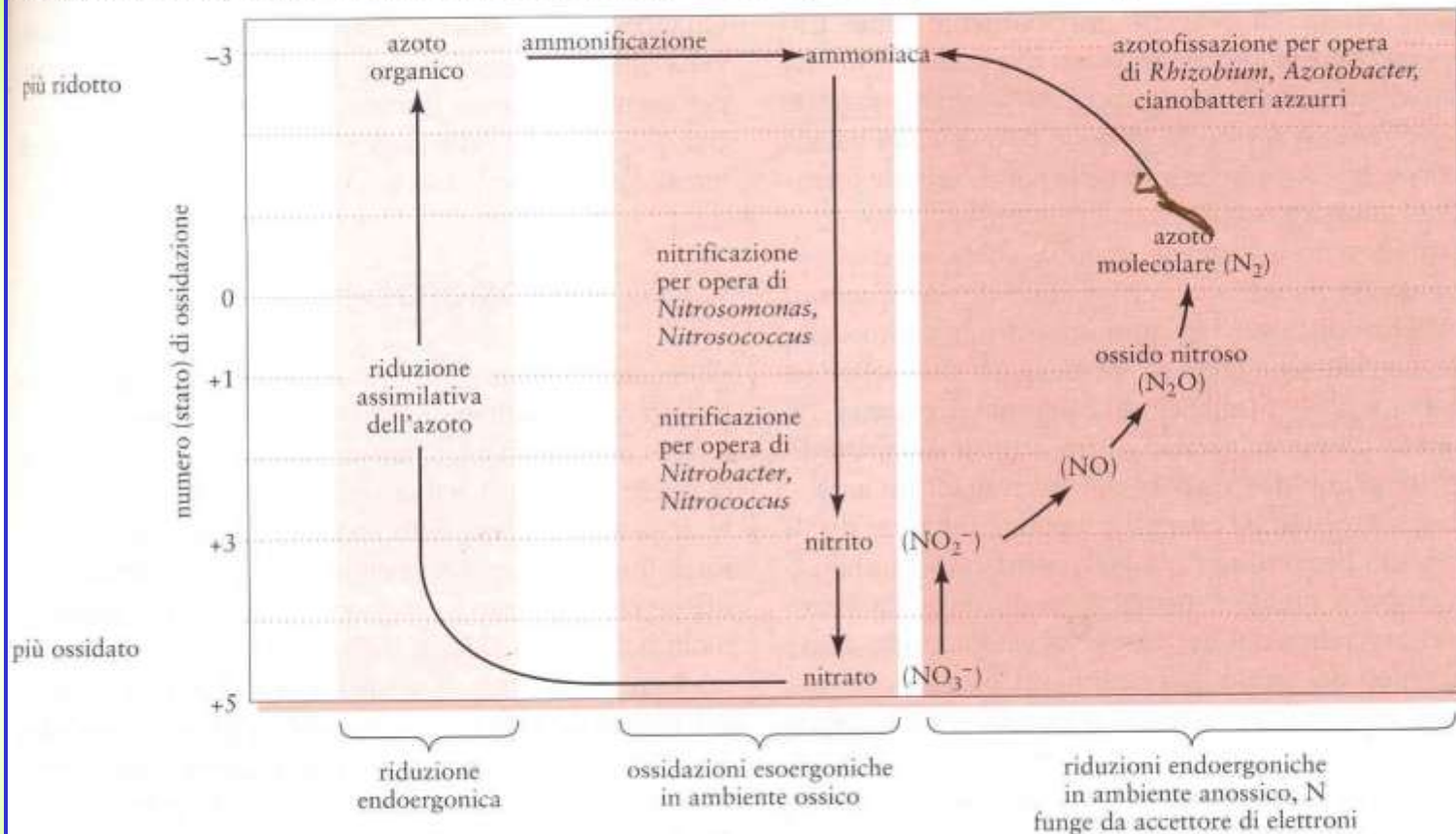


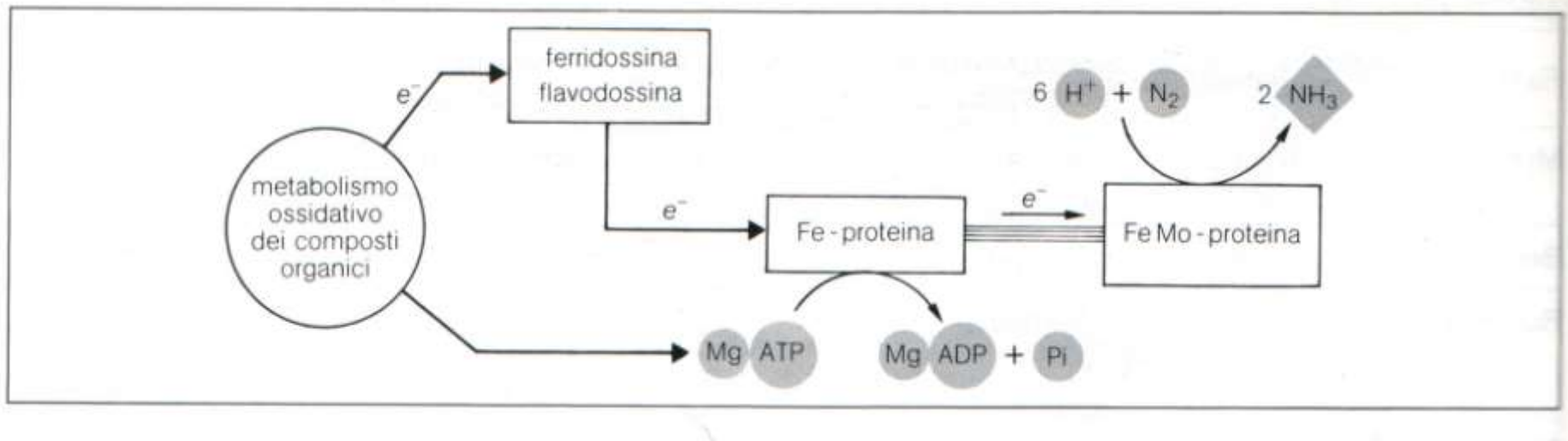
Figura 7.9

Rappresentazione schematica delle trasformazioni e dei numeri (o stati) di ossidazione dei composti che intervengono nel ciclo dell'azoto. Lo stato più ridotto dell'atomo, con carica elettrica -3 , ha il più alto potenziale di energia chimica.



NITROGENASI

L'enzima che consente ai microrganismi di fissare l' N_2 è la **nitrogenasi**, dotata di elevato potere riducente. La nitrogenasi è composta da due proteine, una contenente ferro, l'altra, simile alla ferridossina ma 20 volte più grande, contenente ferro e molibdeno.



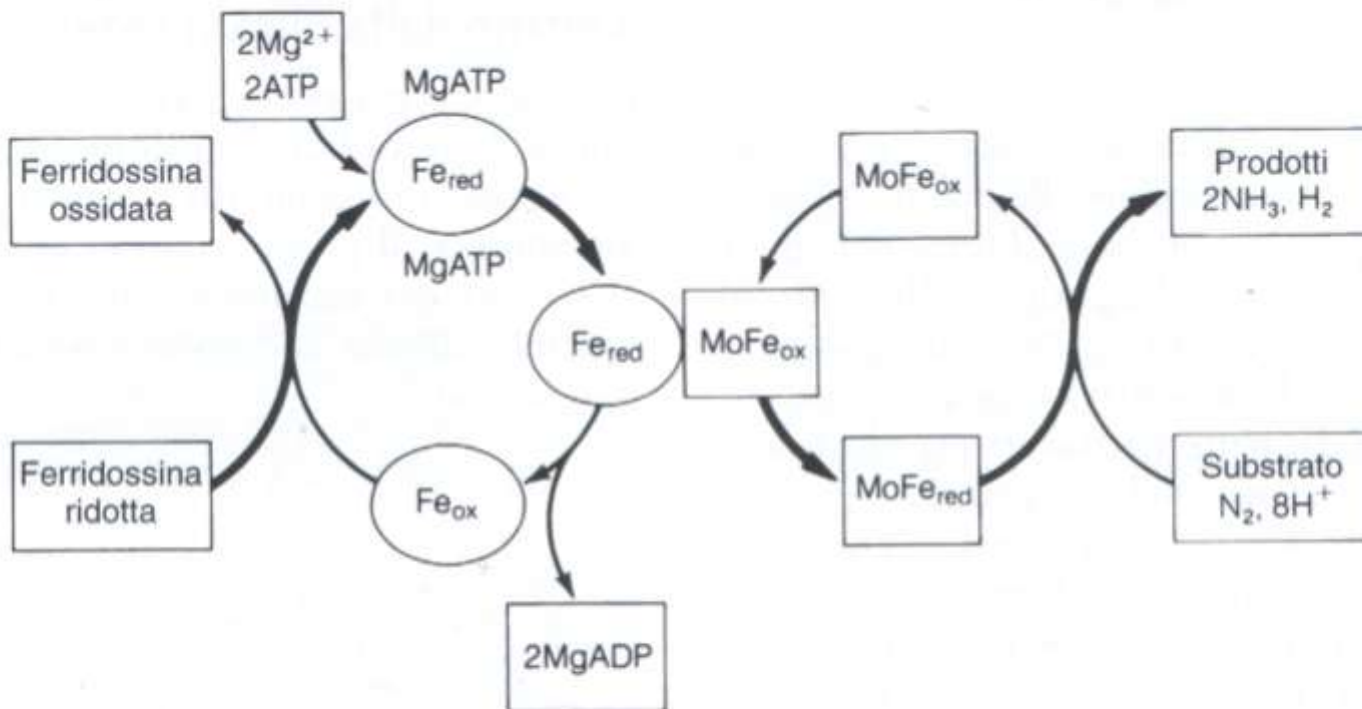


FIGURA 12.7. La reazione catalizzata dalla nitrogenasi. La ferridossina riduce la Fe-proteina mentre avviene il legame con l'ATP. La Fe-proteina riduce la MoFe-proteina e la MoFe-proteina riduce l'azoto. Il flusso di elettroni è rappresentato dalle frecce più scure. (da Dixon e Wheeler, 1986).

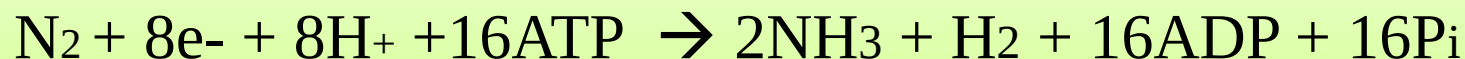


Tabella 7.2 Alcuni substrati ridotti dalla nitrogenasi e relativi prodotti di reazione

Substrato	Prodotto
Azoto molecolare ($\text{N}\equiv\text{N}$)	NH_3 , H_2
Azide ($[\text{N}\equiv\text{N}-\text{N}]^-$)	N_2 , N_2H_4 , NH_3
Ossido nitroso ($\text{N}\equiv\text{N}-\text{O}$)	N_2
Cianuro ($[\text{C}\equiv\text{N}]^-$)	CH_4 , NH_3 , CH_3NH_2
Alchil cianuri ($\text{R}-\text{C}\equiv\text{N}$)	$\text{R}-\text{CH}_3$, NH_3
Cianammide ($\text{N}\equiv\text{CNH}_2$)	CH_4 , NH_3 , CH_3NH_2
Acetilene ($\text{HC}\equiv\text{CH}$)	$\text{CH}_2=\text{CH}_2$
Alchini ($\text{R}-\text{C}\equiv\text{CH}$)	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}_2$
Alleni ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{CH}_2$)	$\text{CH}_3-\text{CH}=\text{CH}_2$
Protoni (H^+)	H_2

Da Smith e Gallon (1993)

Riduzione assimilativa dei nitrati

A livello radicale le cellule trovano disponibili ioni NH_4^+ prodotti direttamente dai simbionti, oppure ioni ammonio e nitrati assorbiti direttamente dal terreno. Lo ione ammonio è utilizzato direttamente per l'organicaione, invece i **nitrati** (ed i **nitriti**, che solo raramente sono assorbiti) hanno bisogno di una **riduzione** che può avvenire principalmente nelle radici o nelle foglie.

La riduzione, favorita dalla luce e dalle alte temperature, si attua in due tappe:

- ✚ nel citoplasma il nitrato viene ridotto a nitrito ad opera della **nitrato riduttasi**;

- ✚ nei proplastidi della radice, o nei cloroplasti delle foglie, il nitrito formatosi viene ridotto ad ammoniaca ad opera di una **nitrito riduttasi**.

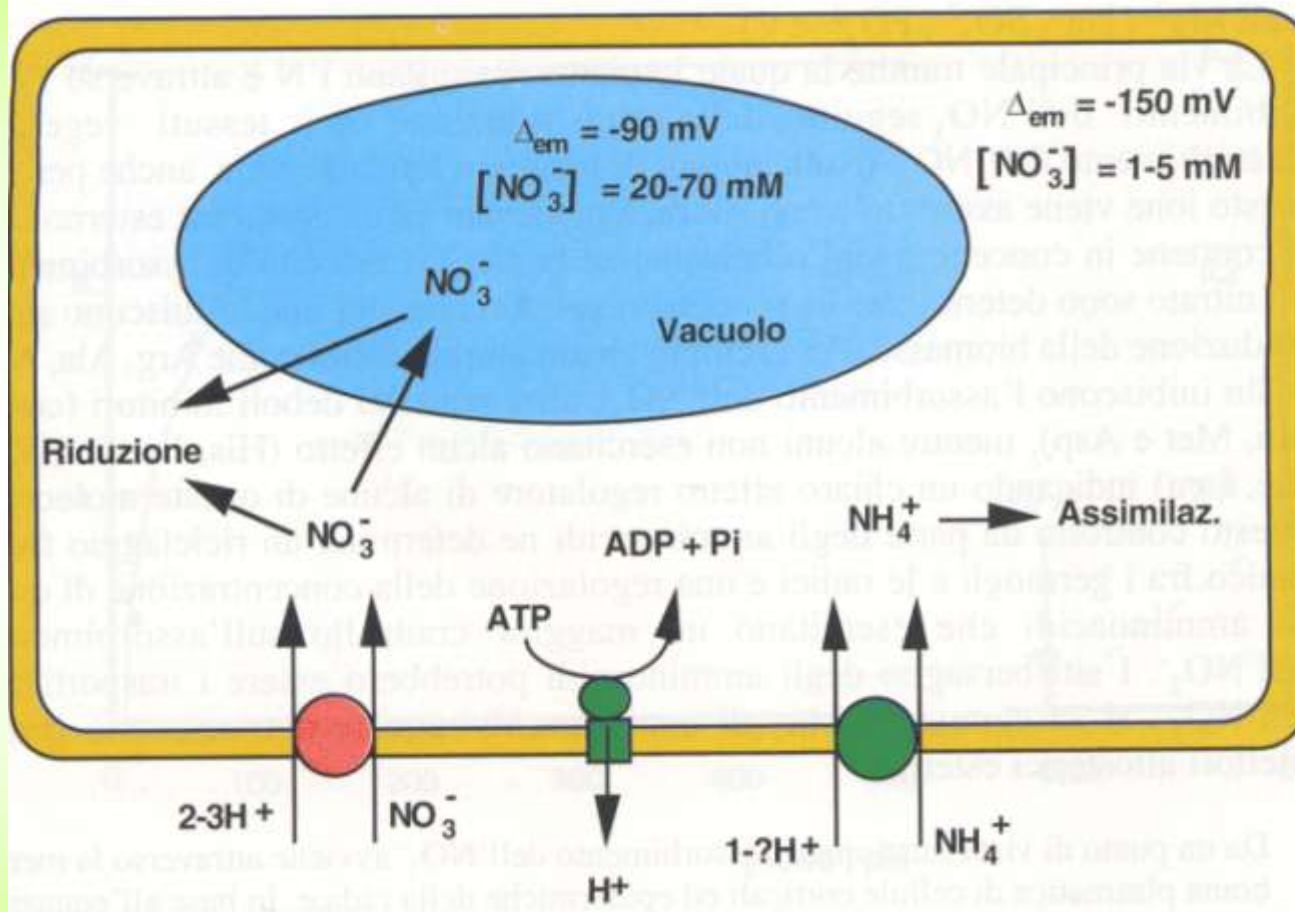


Figura 8.2 Schema generale dell'assorbimento dell'ammonio e del nitrato nelle cellule radicali. Una H^+ -ATPasi di membrana genera un gradiente di H^+ che permette il cotrasporto di NH_4^+ e dell' NO_3^- . Il nitrato viene accumulato nel vacuolo e ridotto, mentre l'ammonio viene assimilato immediatamente in amminoacidi e/o ammidi. Da Crawford (1995), modificato.

NITRATO RIDUTTASI E NITRITO RIDUTTASI

Figura 20.9. La figura illustra la composizione della *nitrato riduttasi* delle cellule vegetali eucariote, ed il processo di *riduzione* dei *nitrati* a *nitriti*. Il donatore di idrogeno e di elettroni è, in questo caso, il NADPH, ma può essere anche il NADH.



Figura 20.10. La figura illustra la composizione della *nitrito riduttasi* di cellule vegetali superiori, ed il processo di riduzione dei *nitriti* a *ione ammonio*. Il donatore di idrogeno ed elettroni è la ferridossina (allo stato ridotto).



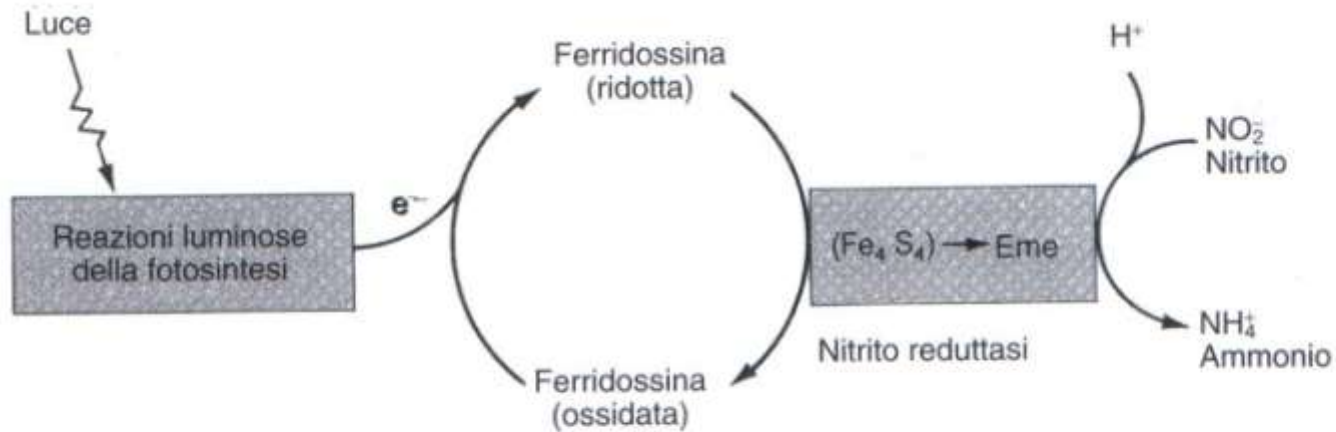
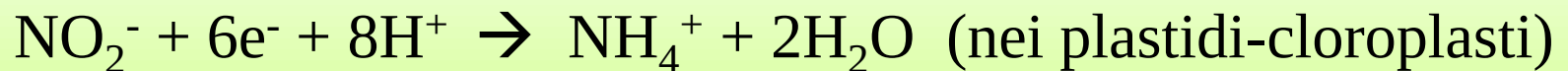


FIGURA 12.10. Modello di accoppiamento mediato dalla ferridossina fra il flusso di elettroni della fotosintesi e la riduzione del nitrito da parte della nitrito reduttasi. L'enzima contiene due gruppi prostetici, l' Fe_4S_4 e l'eme, che partecipano alla riduzione del nitrito in ammonio.

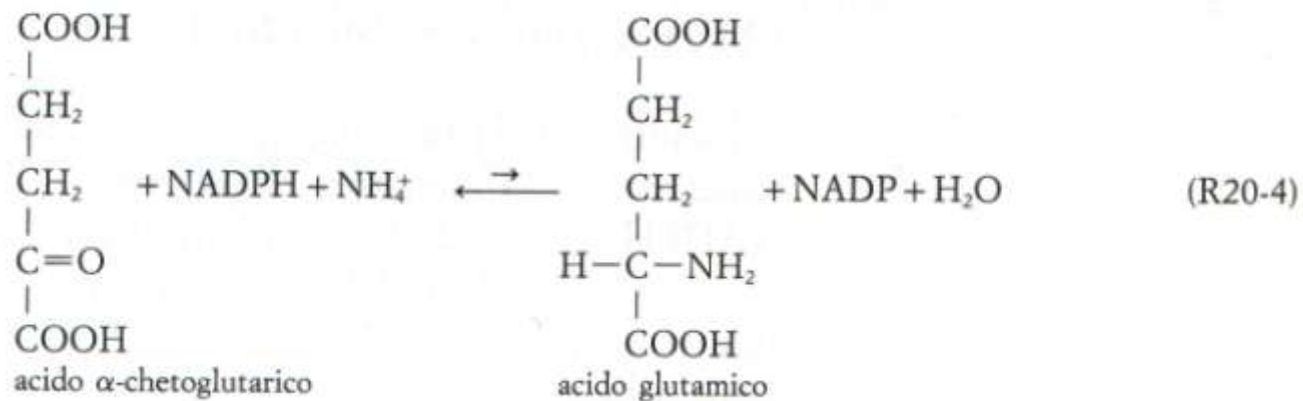


ORGANICAZIONE DELL'AZOTO

L'ammoniaca è rapidamente incorporata in composti organici

L'azoto ammoniacale, assorbito come tale, fissato biologicamente, o prodotto con la riduzione dei nitrati, è trasformato in acido glutamico o glutamina. Gli enzimi deputati a tali reazioni sono: la glutamato deidrogenasi, la glutamina sintetasi, la glutamato sintetasi.

Lo ione NH_4^+ , ad opera della glutamato deidrogenasi, viene incorporato nell'acido α -chetoglutarico con formazione di acido glutamico, secondo la reazione:



La glutamina sintetasi in presenza di ATP e ioni Mg^{2+} , determina la formazione di glutamina a partire da acido glutamico, secondo la reazione:

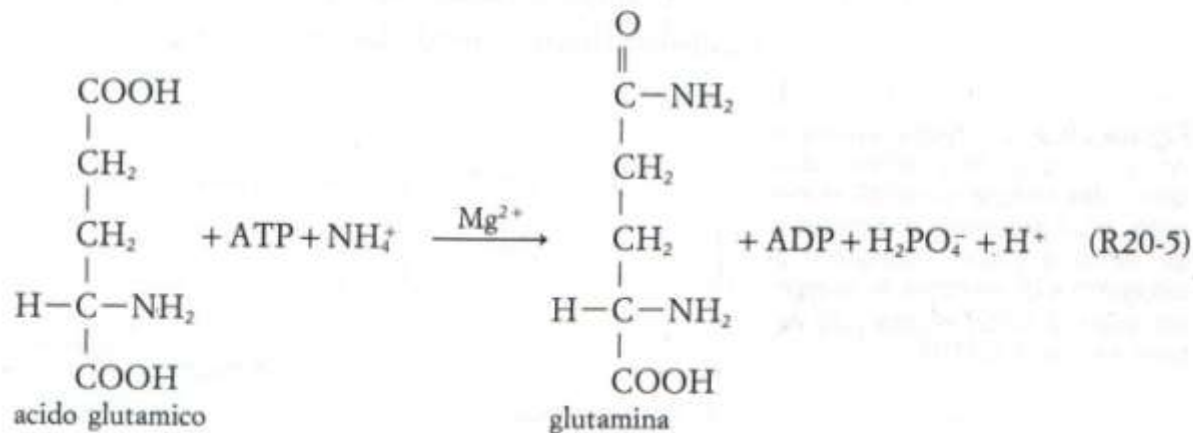
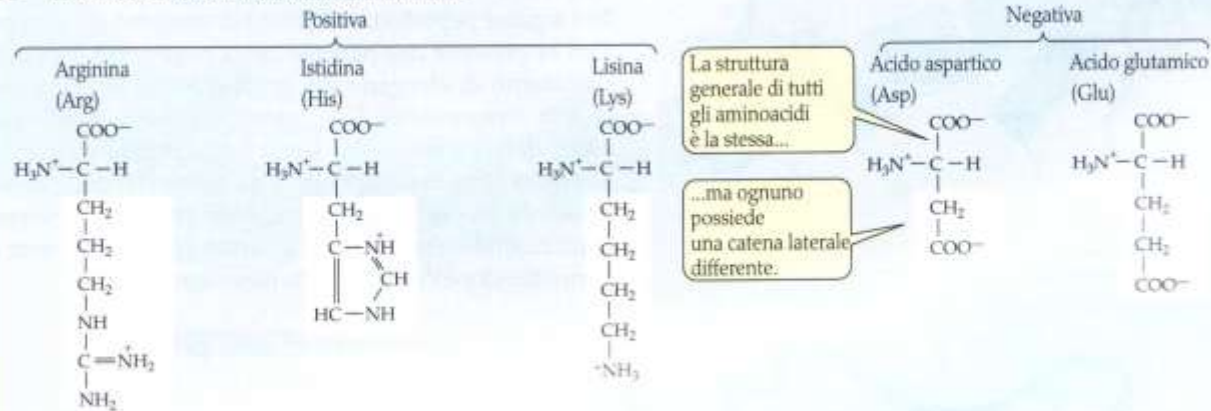


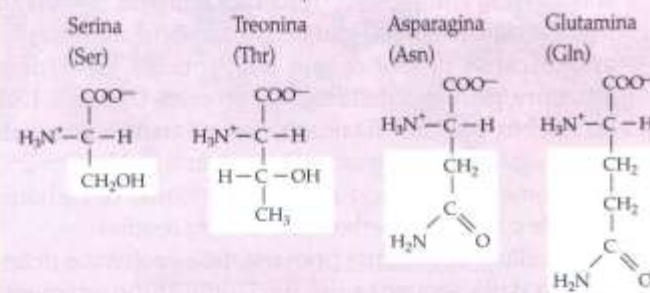
Tabella 3.1

I venti aminoacidi presenti nelle proteine

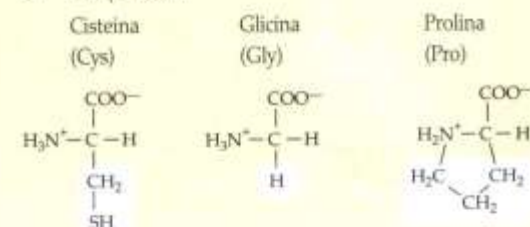
A. Aminoacidi con catena laterale carica elettricamente



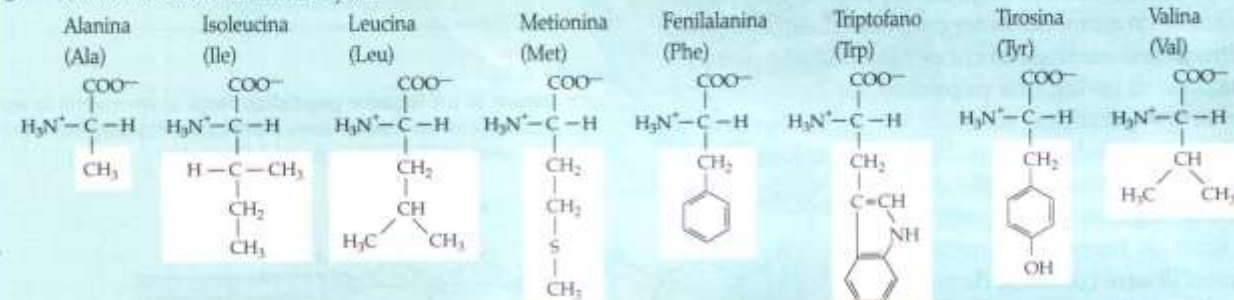
B. Aminoacidi con catena laterale polare ma elettricamente scarica



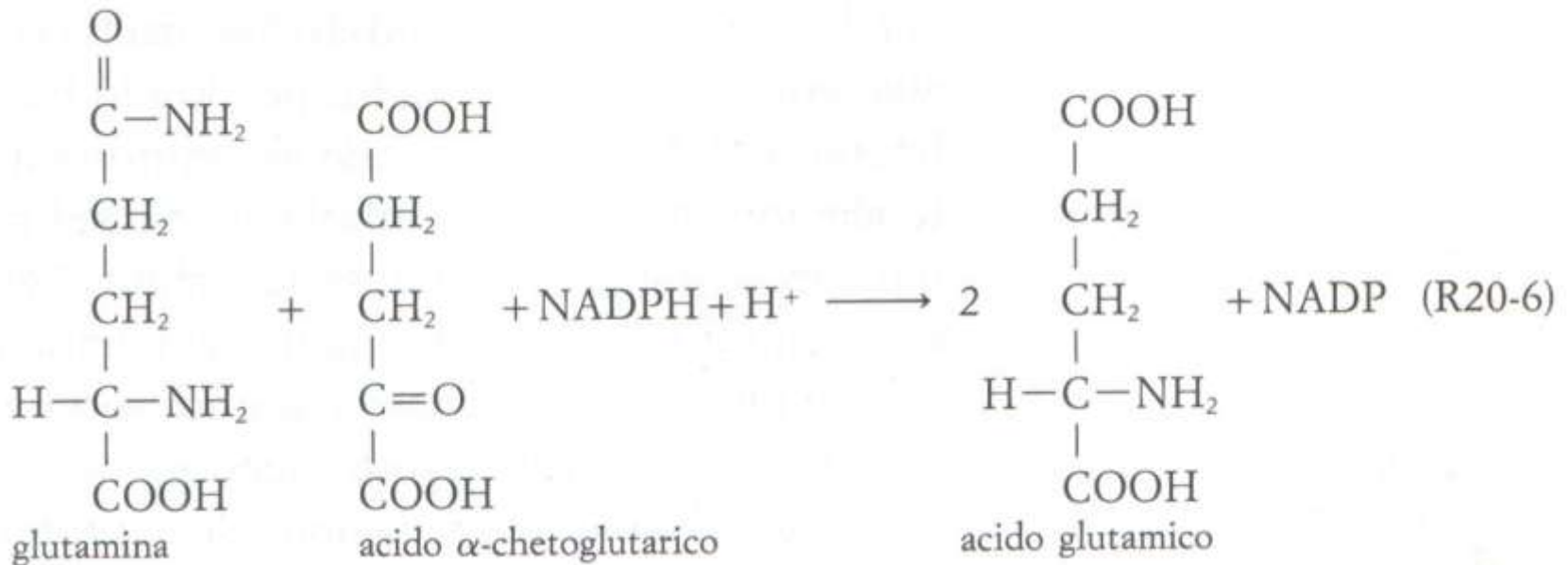
C. Casi particolari



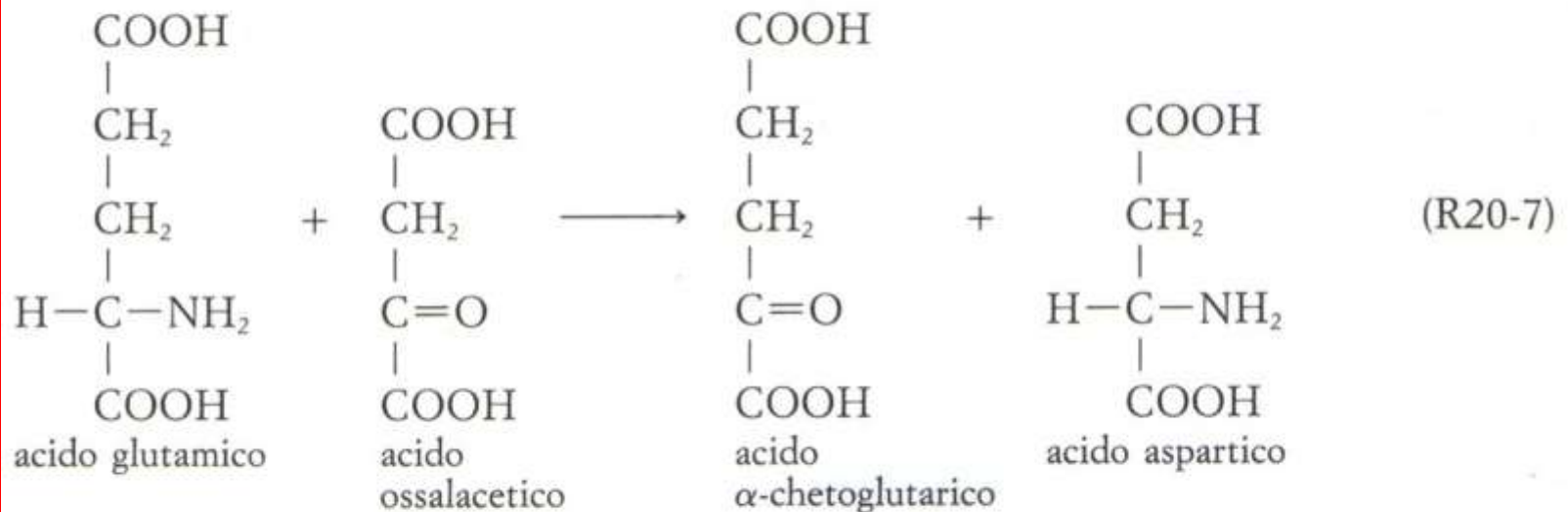
D. Aminoacidi con catena laterale idrofoba



La **glutamato sintetasi** opera un trasferimento riduttivo, senza necessità di ATP, di un gruppo aminico della glutamina su una molecola di acido α -chetoglutarico, con produzione di due molecole di acido glutamico.



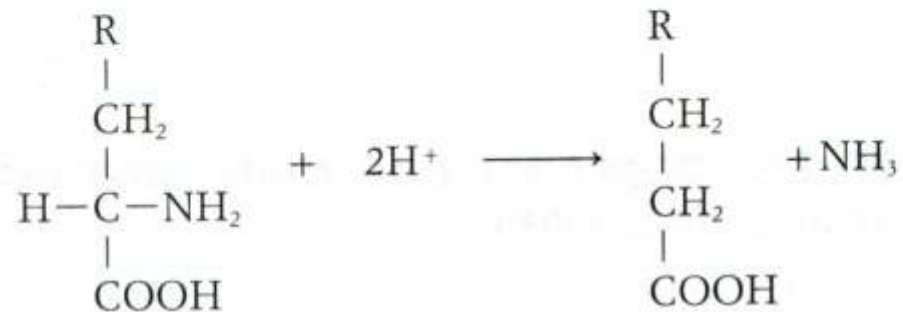
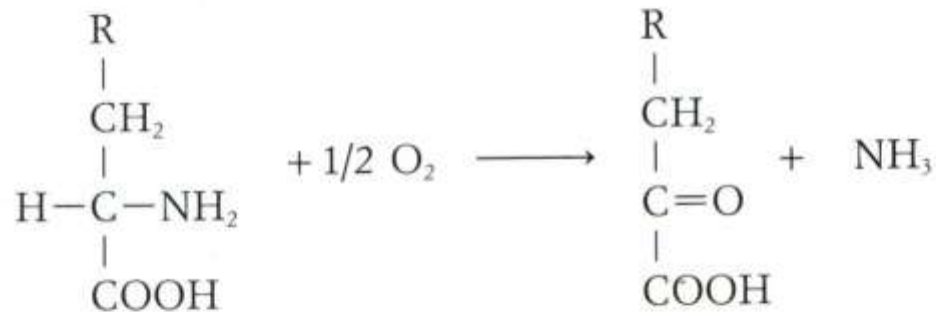
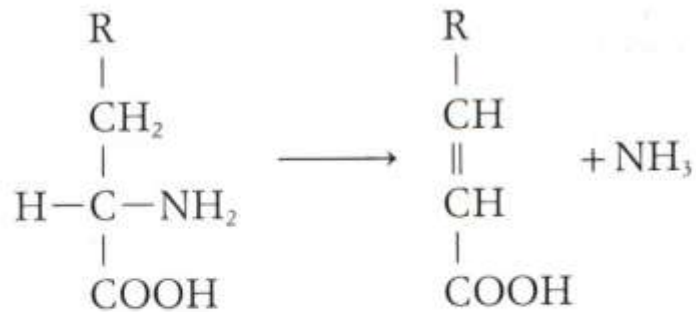
Tutti gli altri aminoacidi vengono sintetizzati per **transaminazione**, a partire dagli α -chetoacidi. Coenzima delle reazioni di transaminazione è la *vitamina B6*. La reazione R20-7 ne dà un esempio:



Le altre sostanze azotate vengono sintetizzate a partire da pochi precursori metabolici, provenienti per lo più dalla glicolisi e dal ciclo di Krebs.

AMMONIFICAZIONE

Degradazione delle sostanze organiche azotate



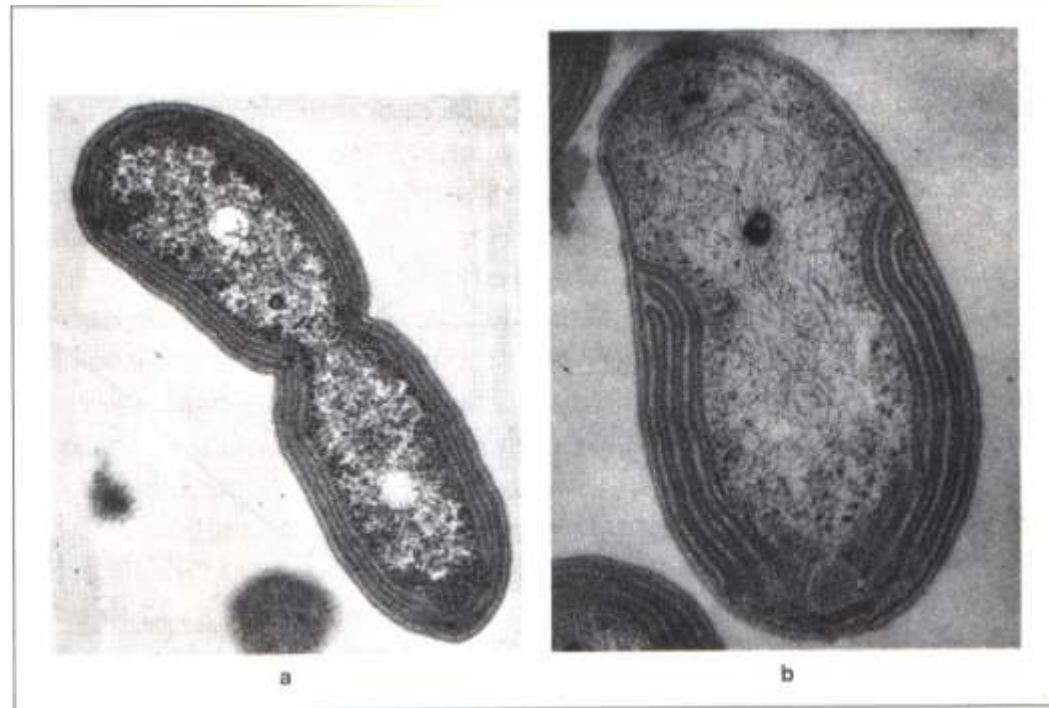
NITRIFICAZIONE

L'ammoniaca prodotta con l'ammonificazione, o pervenuta al terreno con le piogge, ha varie destinazioni ed alimenta diversi processi. La nitrificazione interessa una grossa frazione dell' NH_4^+ ed ha un'importanza biologica ed agraria enorme.

L'ossidazione dell' NH_4^+ a nitrato avviene ad opera di microrganismi chemiolitotrofi, identificati da Winogradski nei generi *Nitrosomonas* e *Nitrobacter*.

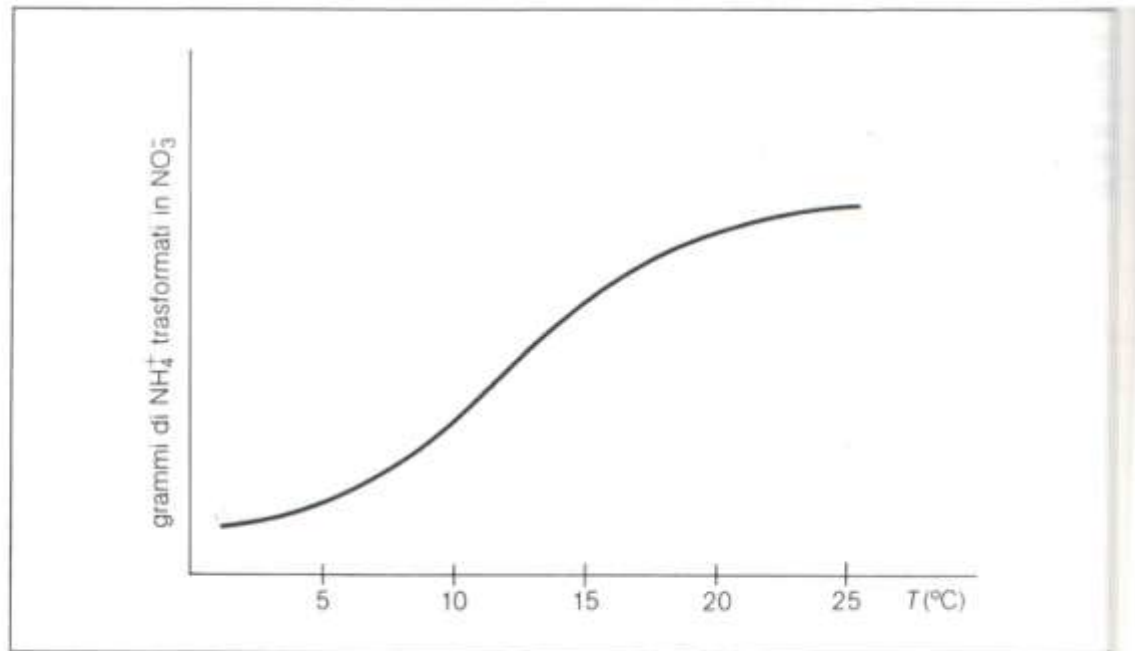
In un primo tempo *Nitrosomonas* effettua la **nitrosazione** che ossida NH_4^+ a NO_2^- . Successivamente *Nitrobacter* ossida il nitrito a nitrato secondo la reazione di **nitrificazione**.

Figura 20.11. Microfotografie elettroniche di sezioni sottili di batteri nitrificanti. Da notare le membrane interne caratteristiche. (a) *Nitrosomonas marina* (30 000 $\times$); (b) *Nitrobacter agilis* (51 250 $\times$). [Per gentile concessione di S.W. Watson, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, Mass.]



INFLUENZA DELLA TEMPERATURA SULLA NITRIFICAZIONE

Figura 20.12. Influenza della temperatura sulla nitrificazione, espressa come grammi di nitrato prodotto. L'optimum si ottiene a 25 °C.



DENITRIFICAZIONE

Il nitrato prodotto può essere assorbito dai vegetali, assimilato dai microrganismi, lisciviato, ridotto chimicamente o biologicamente. Alcuni microrganismi, definiti **denitrificanti**, usano il nitrato come accettore finale di idrogeno ed elettroni. Molti sono in grado di ridurre i nitrati a nitriti ed ammoniaca, invece i denitrificanti propriamente detti producono in anaerobiosi molecole di N_2 ed N_2O .

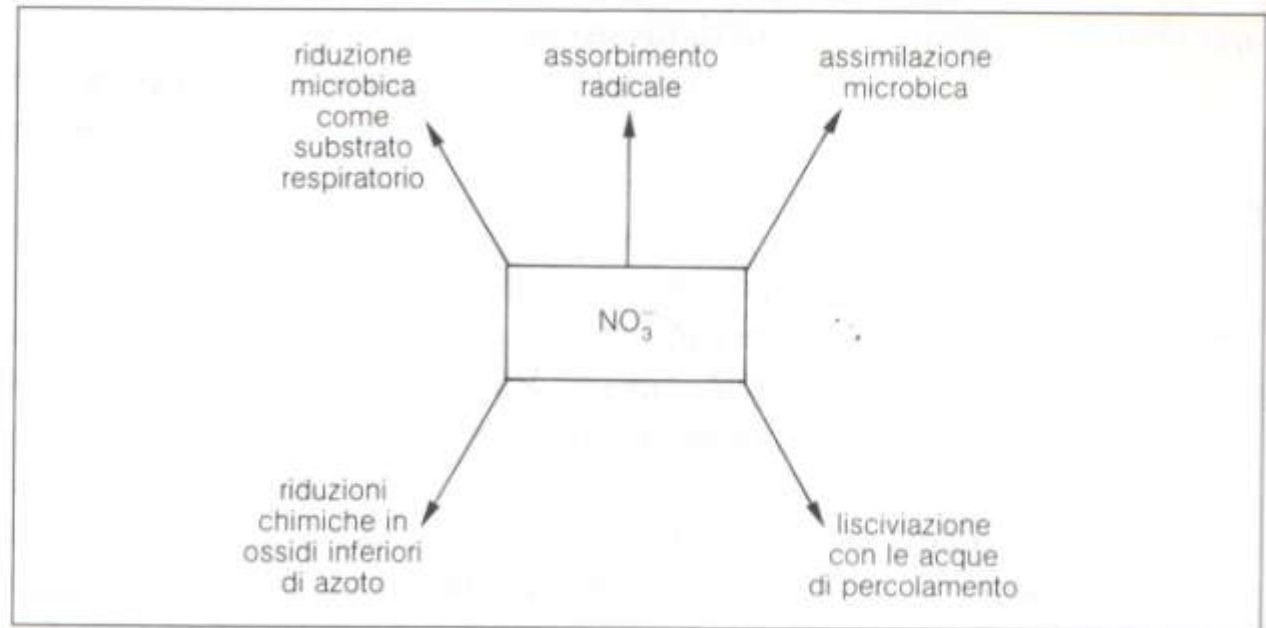


Figura 20.13. Diversa destinazione nel terreno dello ione nitrato.

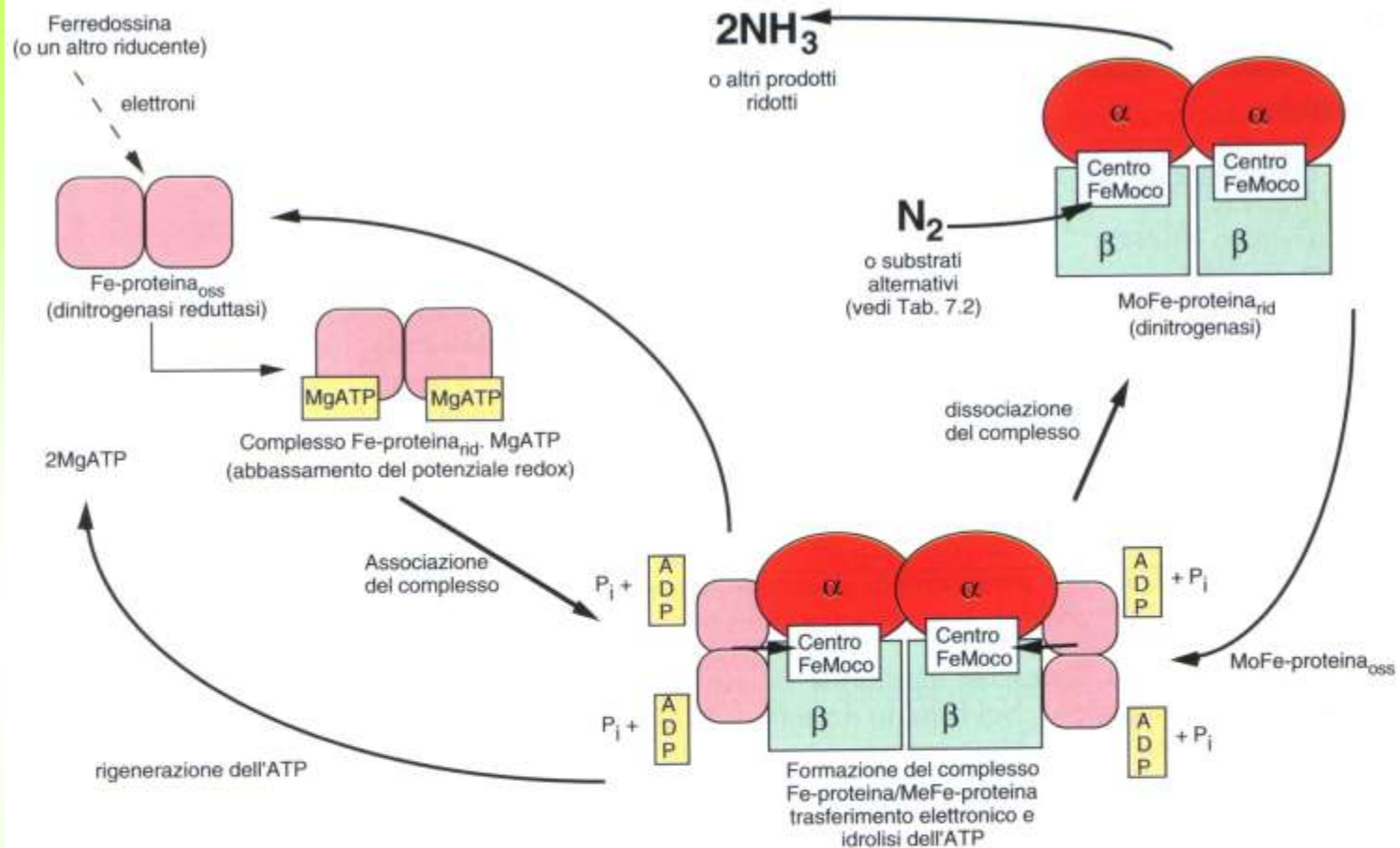
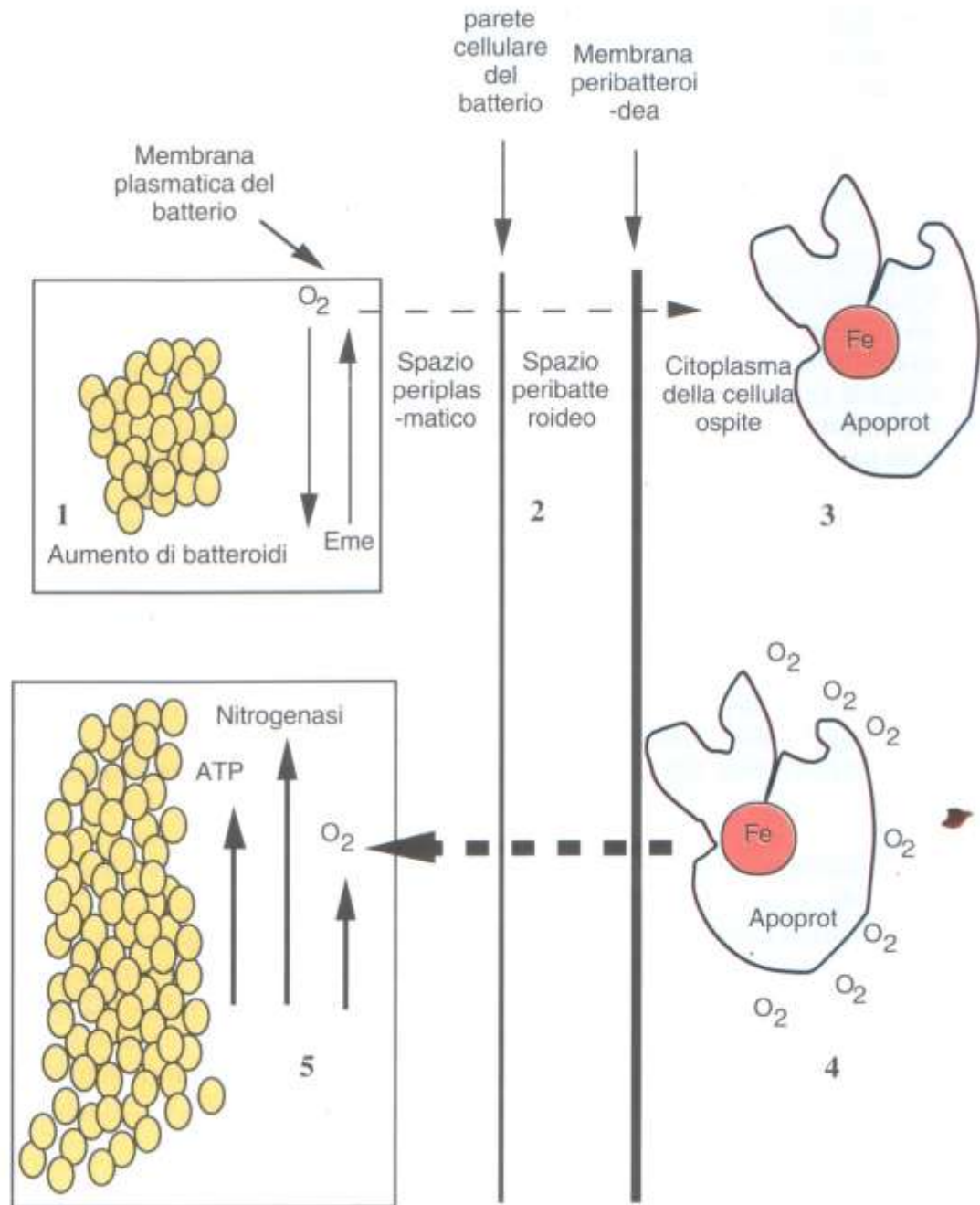


Figura 7.2 Trasferimento di elettroni nel sistema enzimatico della nitrogenasi. Gli elettroni provenienti dalla ferredossina vengono ceduti alla dinitrogenasi reduttasi che a sua volta si lega a due MgATP per formare il complesso ridotto MgATP-dinitrogenasi reduttasi. Questo processo altera la conformazione della dinitrogenasi reduttasi e permette il passaggio di elettroni verso la dinitrogenasi. La dinitrogenasi e la dinitrogenasi reduttasi formano un complesso e un elettrone passa alla dinitrogenasi, mentre il MgATP viene idrolizzato. Occorrono 8 elettroni per ridurre l'azoto molecolare e quindi occorre un ciclo di riduzioni per poter portare la dinitrogenasi a un livello adeguato per ridurre l' N_2 . Per ogni ciclo passa solo un elettrone e vengono idrolizzati 2 MgATP. Da Burris e Roberts (1993), modificato.

Figura 7.4 Sequenza che mette in relazione le diverse componenti biochimiche coinvolte nella fissazione biologica dell' N_2 . 1 aumento della richiesta di O_2 dovuta al proliferare di batteroidi e sintesi della porzione emica; 2 esportazione dell'eme attraverso le diverse barriere cellulari; 3 associazione del protoeme e dell'apoproteina sintetizzata nel reticolo endoplasmatico della cellula ospite per formare la Lb; 4 entrata in funzione della Lb, inizio del trasporto di O_2 ai batteroidi e conseguente fosforilazione ossidativa e sintesi di nitrogenasi; 5 creazione di un ambiente a tensioni di O_2 tali da permettere il funzionamento della nitrogenasi senza pericolo di danneggiamento.



Strategia di comportamento

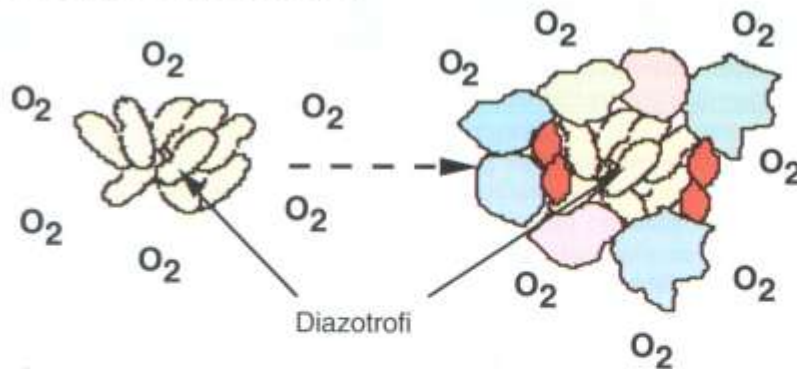
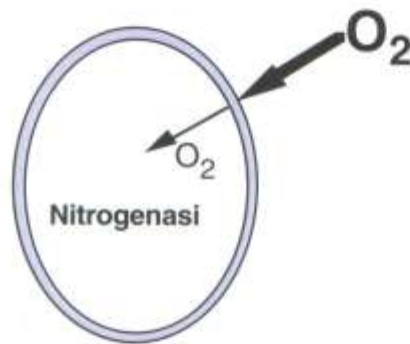


Figura 7.3 Alcune strategie adottate dai diazotrofi per competere con l'ossigeno. Da Smith e Gallon (1993), modificato.

Barriere strutturali



Meccanismi biochimici

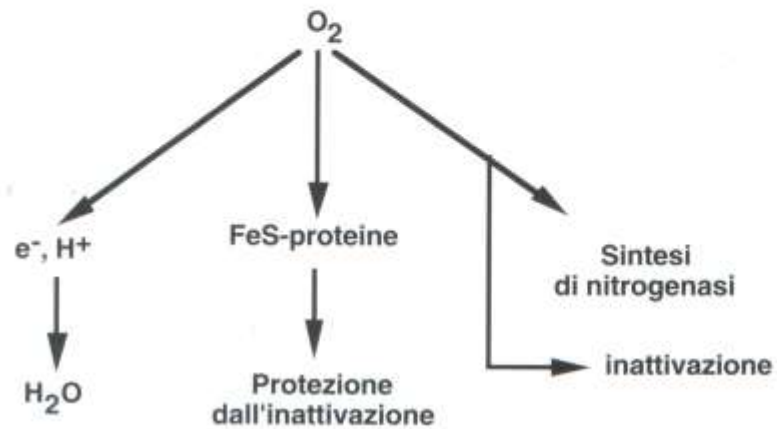


Tabella 7.3 Strategie utilizzate dai diversi diazotrofi per impedire l'inattivazione della nitrogenasi dovuta alla presenza di ossigeno.

Organismo	Strategia
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Evitazione
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Evitazione, consumo limitato di O ₂ dovuto alla respirazione
<i>Azospirillum</i>	Migrazione
<i>Azotobacter</i>	Protezione con FeS-proteine
Batteri fotosintetici	Evitazione, consumo limitato di O ₂ dovuto a respirazione
Noduli radicali di leguminose	Barriere strutturali (noduli radicali)
Noduli actinorrizici	Barriere strutturali (vescicole)
Cianobatteri formanti eterocisti	Barriere strutturali (triplo ispessimento di parete)

Da Smith e Gallon (1993), modificato.