
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARMELO RIGANO, AMODIO FUGGI, GIOVANNI ALIOTTA,
VINCENZA VONA, VITTORIA DI MARTINO RIGANO

Riduzione del Nitrato a Nitrito in un'Alga Unicellulare

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 63 (1977), n.1-2, p.
149–153.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1977_8_63_1-2_149_0>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia vegetale. — *Riduzione del Nitrato a Nitrito in un'Alga Unicellulare* (*). Nota (**) di CARMELO RIGANO, AMODIO FUGGI, GIOVANNI ALIOTTA, VINCENZA VONA e VITTORIA DI MARTINO RIGANO, presentata dal Corrisp. E. MARRÈ.

SUMMARY. — Strain 0206 of *Cyanidium caldarium*, a thermophilic acidophilic alga, is able to use nitrate as the sole nitrogen source.

Usually the alga is grown in the laboratory in very acidic media. When nitrate is the nitrogen source, nitrite appears in the external medium. However, when the nitrite concentration in the medium reaches $15 \mu\text{M}$ it remains constant at this low level.

When the alga is transferred to neutral pH, the nitrite concentration in the medium increases sharply. This increase is linear with time. This phenomenon constitutes an excellent method for measuring the reduction of nitrate to nitrite *in vivo*. The nitrite formation from nitrate is strongly inhibited by exogenously added ammonia.

La riduzione assimilativa del nitrato nei vegetali e nei batteri avviene in due tappe: nella prima tappa si ha la riduzione del nitrato a nitrito ad opera della nitrato riduttasi; nella seconda tappa si ha la riduzione del nitrito ad ammonio ad opera della nitrito riduttasi [1]. In condizioni fisiologiche la riduzione del nitrato ad ammonio è un processo altamente controllato sicché non si ha mai accumulo né di nitrito né di ammoniaca nel mezzo esterno.

Misurare la velocità di riduzione del nitrato a nitrito *in vivo* è molto difficile, ed esistono pochi lavori in proposito. Morton [2] nei funghi ha inibito la nitrito riduttasi con inibitori (fluoruri) che non hanno azione sulla nitrato riduttasi. Stevens e Van Baalen [3] hanno ottenuto un mutante di un'alga azzurra privo di nitrito riduttasi. In ambedue i casi la velocità di riduzione del nitrato a nitrito può essere misurata come accumulo di nitrito.

Cyanidium caldarium è un'alga unicellulare acidofila e termale che viene coltivata in laboratorio a pH acidi (per aggiunta di acido solforico). Di questa alga esistono più ceppi [4]: il ceppo 0206 può utilizzare il nitrato come sorgente d'azoto [5]. Recentemente è stato osservato nel nostro laboratorio che quando questo ceppo di *C. caldarium* è coltivato su nitrato, c'è comparsa nel mezzo esterno di nitriti i quali però, per tutto il periodo di crescita dell'alga, si mantengono sempre intorno al basso valore di $15 \mu\text{M}$, senza mai aumentare di concentrazione. È stato anche osservato però che, se l'alga coltivata a basso pH viene trasferita in un mezzo intorno alla neutralità, allora la concentrazione dei nitriti nel mezzo tende ad aumentare nel tempo in maniera

(*) Lavoro eseguito presso l'Istituto di Botanica, Fac. Scienze, dell'Università di Napoli con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

(**) Pervenuta all'Accademia l'8 agosto 1977.

lineare. Questo fenomeno, come sarà detto in questo lavoro, può costituire un mezzo molto valido per misurare la velocità di riduzione del nitrato a nitrito *in vivo*.

MATERIALE E METODI

C. caldarium, ceppo 0206, ci è stato fornito dal Prof. T. D. Brock dell'Università del Wisconsin, che lo ha isolato a partire da acque termali dello Yellowstone National Park (USA).

L'alga è coltivata in laboratorio a 42 °C ed a pH 1,9 utilizzando nitrato come sola sorgente d'azoto [5]. I nitriti erano dosati per colorimetria [5].

RISULTATI E DISCUSSIONE

C. caldarium, come già detto, è un'alga acidofila che vive in natura in ambienti caldi ed acidi. Come dimostrato da Fukuda [6] esso ha un optimum di crescita a pH 2 e non è capace di crescere a pH superiori a 5. Doemel e Brock [7] hanno trovato che in natura *C. caldarium* vive nell'intervallo di pH 0,05-5.

Malgrado questa sua spiccata acidofilia, *C. caldarium* è capace di respirare e di fotosintetizzare per lungo tempo anche a pH 7,5 (Tabella I).

TABELLA I.

Valori della velocità di respirazione e di fotosintesi a pH 3 ed a pH 7,5 trovati per l'alga Cyanidium caldarium.

pH	Respirazione	Fotosintesi reale
3	5,7	25
7,5	7,84	31,6

Le misure sono state fatte alla temperatura di 41 °C servendosi di un ossigrafo. Le misure a pH 7,5 sono state eseguite in tampone fosfato 0,01 M. I valori delle velocità di respirazione e di fotosintesi (reale) sono espressi come nmoli di O₂ consumati o liberati/minuto/10⁹ cellule.

Cellule di *C. caldarium* (prelevate da una coltura su nitrato in fase esponenziale di crescita) venivano lavate più volte per centrifugazione, riospese in nuovi mezzi di coltura contenenti nitrato e mantenuti alla temperatura di 42 °C. Di questi nuovi mezzi di coltura, uno era a pH 2 ed un altro era a pH 7,5. Ad intervalli regolari erano prelevati campioni nei quali, dopo allontanamento delle cellule per centrifugazione, venivano dosati i nitriti.

Sia a pH 2 che a pH 7,5 c'è comparsa di nitrito. Nella sospensione a pH 2 però, raggiunta in pochi minuti una concentrazione di circa 15 nmoli/ml, la produzione di nitrito si arresta bruscamente e non aumenta nel tempo (non mostrato). C'è da dire che a pH 2 a carico dell'acido nitroso avviene una rapida reazione chimica di dismutazione che lo trasforma in nitrato ed ossido d'azoto; pertanto il mancato accumulo di nitrito potrebbe essere dovuto a tale reazione di dismutazione oltre che, naturalmente ad una riduzione ad ammoniaca ad opera della nitrito riduttasi delle cellule.

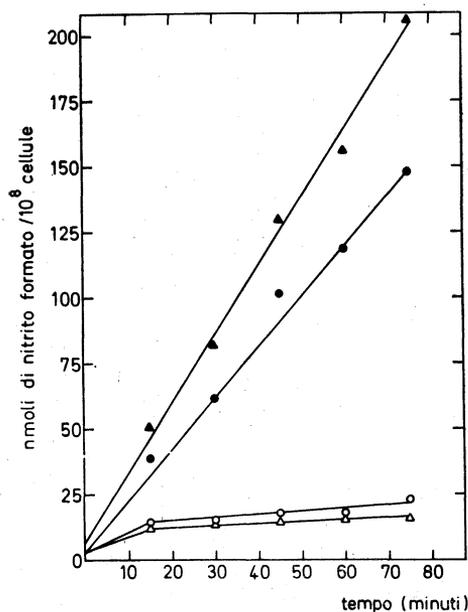


Fig. 1. - Formazione di nitrito nel tempo in sospensioni di cellule di *C. caldarium* a pH 7,5. Le cellule, raccolte da culture su nitrato in fase esponenziale, erano risospese in mezzi (non acidificati) contenenti KNO_3 10 mM (simboli pieni) oppure KNO_3 10 mM più $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 mM (simboli aperti) e tampone fosfato, pH 7,5, 30 mM. Le sospensioni erano mantenute al buio o alla luce a 42 °C, ed erano insufflate con aria. Simboli: formazione di nitrito al buio (\blacktriangle — \blacktriangle) ed alla luce (\bullet — \bullet) nelle sospensioni con solo nitrato; formazione di nitrito al buio (\triangle — \triangle) ed alla luce (\circ — \circ) nelle sospensioni con nitrato più ammonio.

Nelle sospensioni di cellule a pH 7,5, contrariamente a quanto avviene a pH 2, la formazione di nitrito aumenta nel tempo in maniera lineare (fig. 1). Tale linearità si mantiene per lungo tempo (anche per oltre quattro ore). La produzione di nitrito aumenta in maniera lineare anche in funzione del numero di cellule presenti nella sospensione (fig. 2).

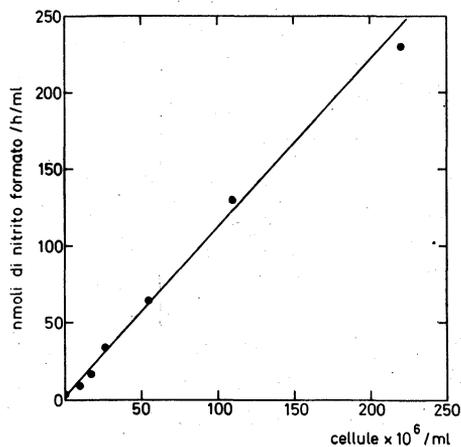


Fig. 2. - Formazione di nitriti al buio ed a pH 7,5 in funzione del numero di cellule presenti nelle sospensioni di *C. caldarium*. Per la procedura vedere legenda della fig. 1.

Come si può vedere sempre nella fig. 1, la riduzione del nitrato a nitrito è indipendente dalla luce. Poiché è stato ampiamente dimostrato che i donatori fisiologici di elettroni della nitrato riduttasi sono i piridin nucleotidi [1,5], la riduzione del nitrato a nitrito in *C. caldarium* avviene dunque a spese dei piridin nucleotidi ridotti generati durante il catabolismo delle sostanze organiche piuttosto che a spese di quelli generati durante la fase luminosa della fotosintesi. Addirittura, come è visibile nella fig. 1, e come è stato confermato da numerosi esperimenti, la produzione di nitrito dal nitrato è del 25% maggiore al buio rispetto alla luce. Al momento non siamo in grado di dare una spiegazione plausibile del perché.

L'aumento lineare nel tempo del nitrito a pH 7,5 è dovuto al fatto che a tale pH apparentemente non c'è ulteriore riduzione del nitrito da parte delle cellule. Infatti, se ad una sospensione di cellule a pH 7,5 viene aggiunto nitrito 0,1 mM (che corrisponde alla concentrazione di nitrito mediamente raggiunta negli esperimenti di riduzione del nitrato), non si nota nel tempo alcun decremento apprezzabile della concentrazione di tale nitrito. Questo significa che a pH 7,5, ed almeno alla concentrazione di nitrito da noi impiegata, la nitrito riduttasi non funziona o funziona molto poco.

Ci troviamo così a disporre di un sistema eccellente, specifico di questa alga che vive a pH acidi e che a pH 7,5 riduce il nitrato a nitrito e basta, per studiare *in vivo* il meccanismo di riduzione del nitrato a nitrito senza che su di esso intervengano i fenomeni di controllo messi in atto dai prodotti dell'ulteriore riduzione del nitrito (ammonio) o dai prodotti della assimilazione dell'ammonio.

Una prima informazione che si può trarre dai nostri esperimenti è che la nitrato riduttasi non è assolutamente inibita da nitrito, almeno da quelle concentrazioni di nitrito che sono state raggiunte nei nostri esperimenti; se così non fosse infatti, l'incremento della produzione di nitrito non sarebbe lineare nel tempo ma tenderebbe ad abbassarsi, fino ad annullarsi del tutto, man mano che la concentrazione del nitrito aumenta.

Un altro fenomeno che abbiamo potuto facilmente studiare è l'effetto dell'ammonio sulla riduzione del nitrato. Come mostrato nella fig. 1, l'ammonio inibisce la riduzione del nitrato; ed infatti nelle sospensioni di cellule nelle quali insieme al nitrato è stato aggiunto anche ammonio (0,1 mM) non c'è formazione di nitrito. Questo significa che il processo di riduzione del nitrato a nitrito è controllato dal prodotto finale, essendo appunto l'ammonio il prodotto finale della riduzione del nitrato.

Dai nostri esperimenti non si può ancora dire con certezza se l'inibizione da ammonio si eserciti a livello di nitrato riduttasi oppure a livello di una permeasi che catalizza l'ingresso del nitrato nella cellula. Schloemer e Garrett [8] hanno infatti dimostrato in *Neurospora crassa* l'esistenza di una permeasi per il nitrato.

Che in *C. caldarium* tuttavia l'azione di inibizione da ammonio possa esercitarsi a livello di nitrato riduttasi si può desumere dal fatto che l'aggiunta di ammonio a sospensioni di cellule trasforma reversibilmente la

nitrato riduttasi da una forma pienamente attiva in una forma latente inattiva [9]. Noi avevamo già avanzato l'ipotesi che questa inattivazione *in vivo* della nitrato riduttasi indotta da ammonio potesse avere una funzione di controllo della riduzione del nitrato [9]; questa nostra precedente ipotesi sembra trovare conferma negli esperimenti riportati nel presente lavoro.

A tal proposito, in altre alghe unicellulari, *Chlorella*, *Chlamydomonas*, è stato dimostrato che la inattivazione *in vivo* della nitrato riduttasi da ammonio può avvenire soltanto alla luce, e perciò è stata avanzata l'ipotesi che il controllo della riduzione del nitrato da parte dell'ammonio fosse dipendente dalla fotosintesi [1]. Noi in *C. caldarium* abbiamo sempre trovato che l'inattivazione della nitrato riduttasi per azione dell'ammonio è assolutamente indipendente dalla luce [9]. Nella fig. 1 si può vedere che l'ammonio inibisce la produzione del nitrito sia alla luce che al buio: resta pertanto confermato quanto precedentemente sostenuto [9] e cioè che il controllo della riduzione del nitrato in *C. caldarium* esercitato dall'ammonio è assolutamente indipendente dalla fotosintesi.

Ringraziamenti. Gli Autori ringraziano sentitamente il Prof. T. D. Brock per aver gentilmente fornito il ceppo di *C. caldarium* utilizzato per questo lavoro.

BIBLIOGRAFIA

- [1] M. LOSADA (1976) - *Metalloenzymes of the nitrate reducing system*, « J. Mol. Catalysis », 1, 245-264.
- [2] A. G. MORTON (1956) - *A study of nitrate reduction in mould fungi*, « J. Exp. Botany », 7, 97-112.
- [3] S. E. STEVENS e C. VAN BAALLEN (1974) - *Control of nitrate reductase in a blue-green alga. The effects of inhibitors, blue light, and ammonia*, « Arch. Biochem. Biophys. », 161, 146-152.
- [4] C. RIGANO, G. ALIOTTA e V. DI MARTINO RIGANO (1975) - *Observations on enzymes of ammonia assimilation in two different strains of Cyanidium caldarium*, « Arch. Microbiol. », 104, 297-299.
- [5] C. RIGANO (1971) - *Studies on nitrate reductase from Cyanidium caldarium*, « Arch. Mikrobiol. », 76, 265-276.
- [6] I. FUKUDA (1958) - *Physiological studies on a thermophilic blue-green Cyanidium caldarium*, « Bot. Mag. Tokyo », 71, 79-86.
- [7] W. N. DOEMEL e T. D. BROCK (1971) - *The physiological ecology of Cyanidium caldarium*, « J. Gen. Microbiol. », 67, 17-32.
- [8] R. H. SCHLOEMER e R. H. GARRETT (1974) - *Nitrate transport system in Neurospora crassa*, « J. Bact. », 118, 259-269.
- [9] C. RIGANO, G. ALIOTTA e U. VIOLANTE (1974) - *Reversible inactivation by ammonia of assimilatory nitrate reductase in Cyanidium caldarium*, 99, 81-90.