

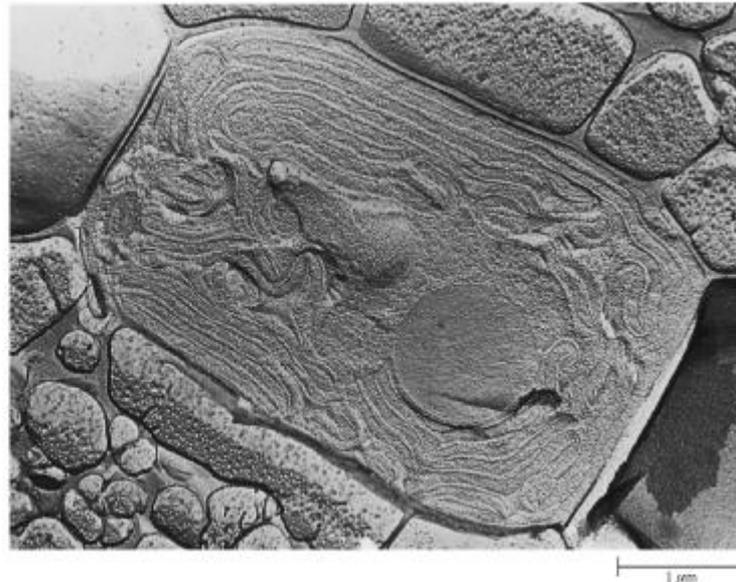
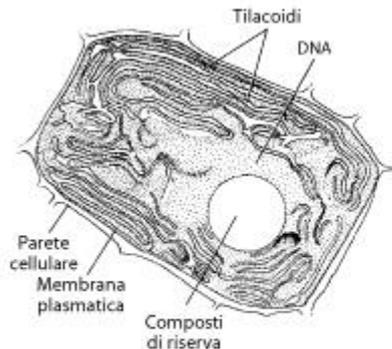
I Batteri azotofissatori

I CIANOBATTERI

I cianobatteri appartengono ai *Bacteria*.

Sono fotosintetici, posseggono clorofilla a, carotenoidi e pigmenti accessori quali le ficobiline (la ficocianina un pigmento blu e la ficoeritrina un pigmento rosso).

Nelle cellule dei cianobatteri sono presenti tanti strati di membrane, parallele tra di loro e parallele alla membrana plasmatica, dette tilacoidi (per analogia con i tilacoidi dei cloroplasti di altri vegetali) dove avviene la fotosintesi.



Il principale composto di riserva è il glicogeno, polimero del glucosio, simile all'amido.

Sono unicellulari, alcuni vivono come cellule singole, altri formano filamenti lineari o ramificati che possono crescere fino a raggiungere notevoli dimensioni, pochi vivono in colonie.

Nei filamenti e nelle colonie, tuttavia, ogni singola cellula conduce vita autonoma.

Molti cianobatteri producono un involucro mucillaginoso che tiene uniti gruppi di cellule o filamenti.

Possono vivere in ambienti marini, di acque dolci o terrestri.

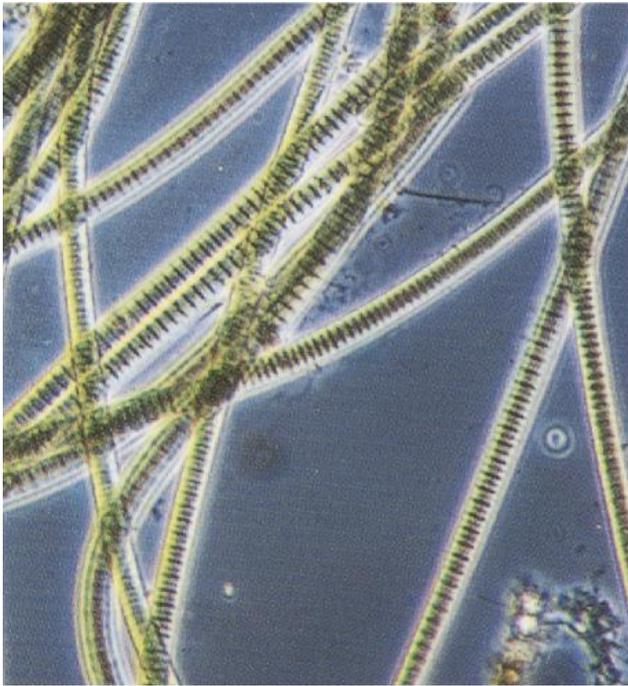
Le stromatoliti sono strutture sedimentarie calcaree modificate dalla presenza di cianobatteri. Sono le evidenze dei più semplici organismi viventi sulla terra.



Stromatoliti fossili

cianobatteri →





(a) 100 μm

Oscillatoria



(b) 200 μm

Calothrix

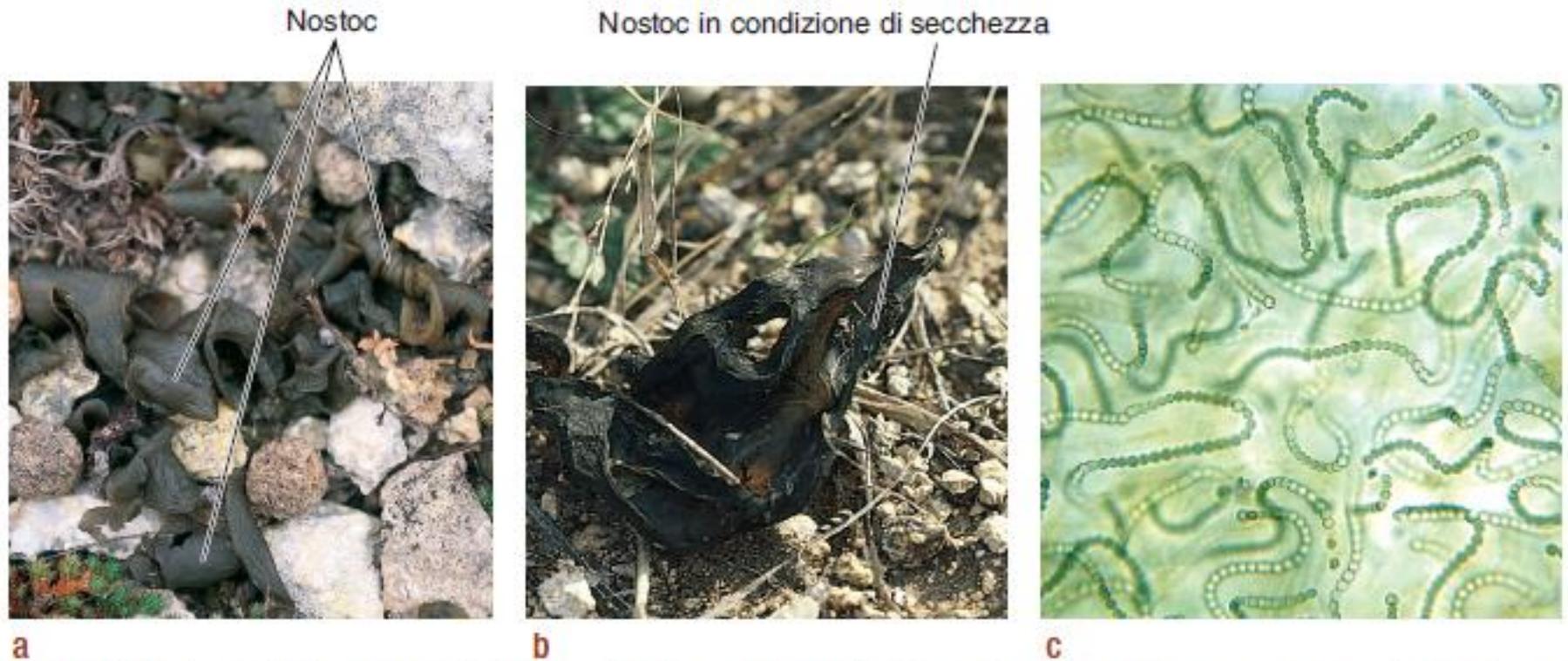
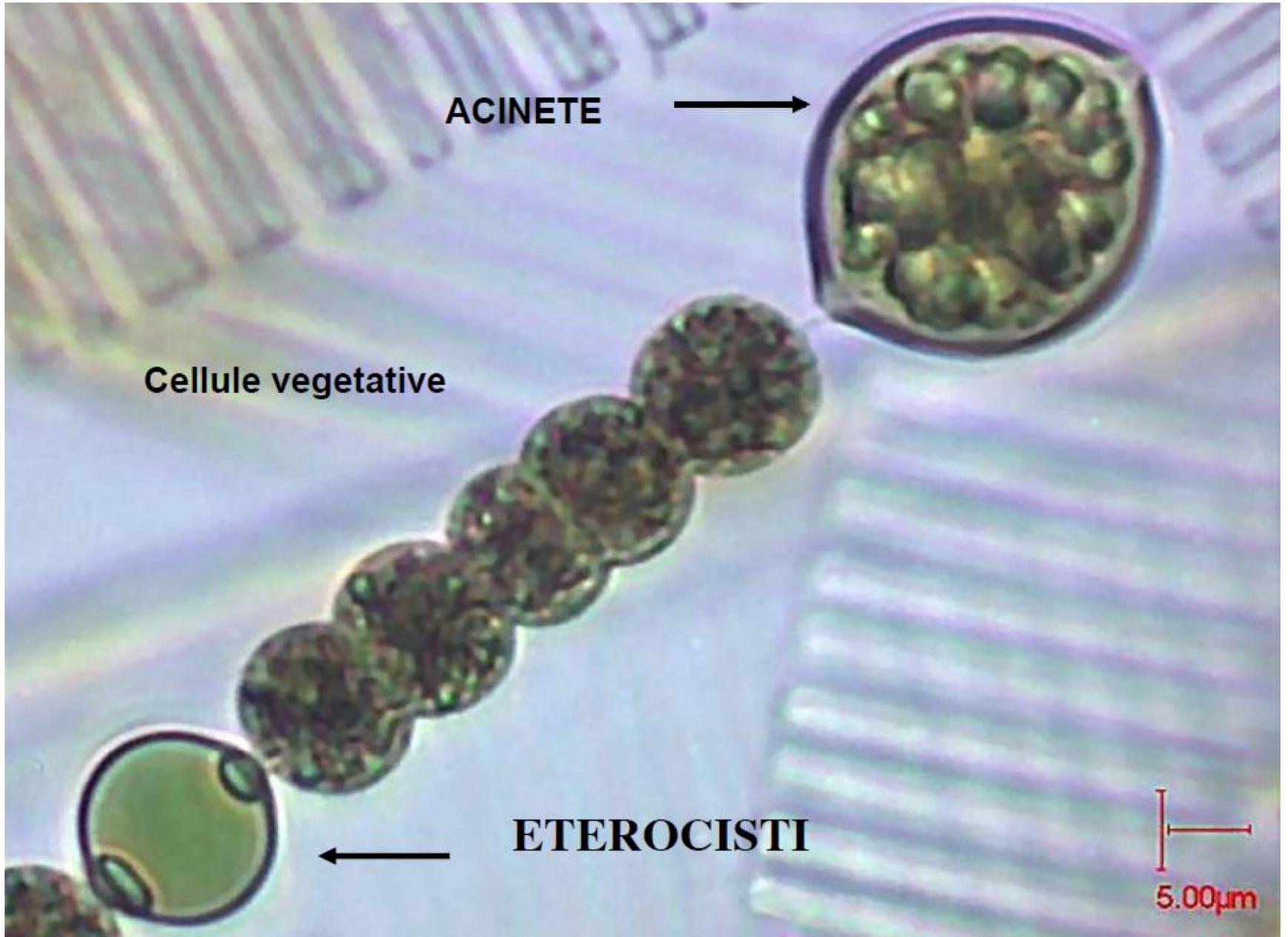
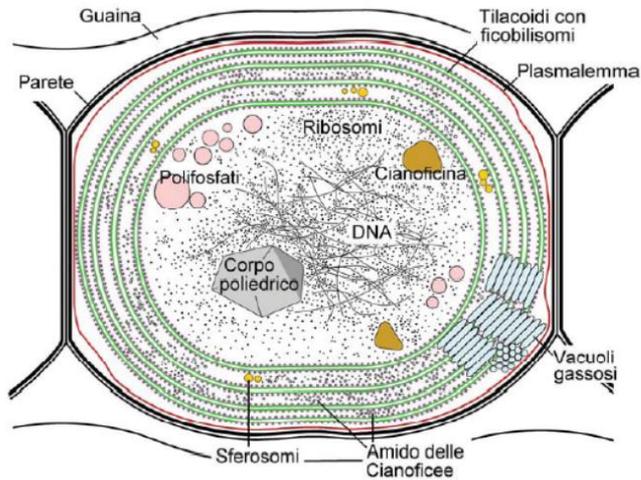


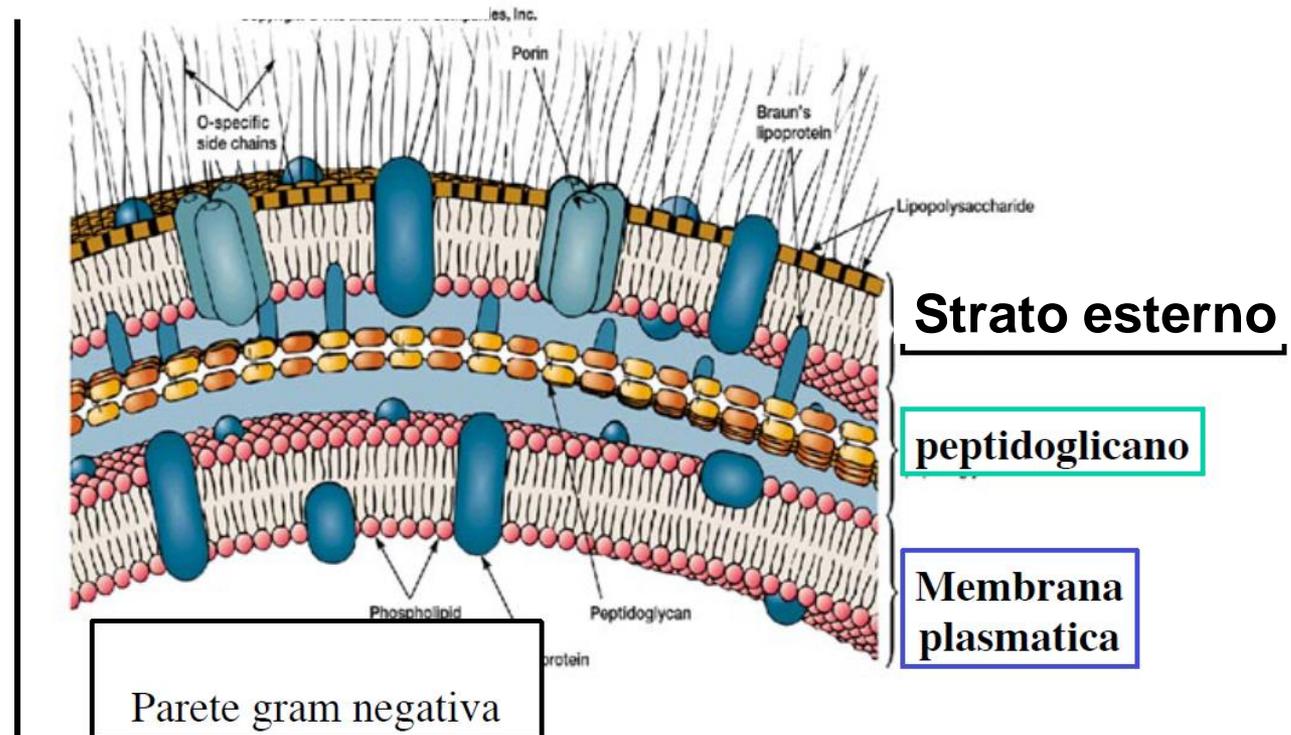
Figura 13.14 I cianobatteri sono organismi comuni nella maggior parte dei suoli, sebbene non sempre numerosi. Questa specie di *Nostoc* forma grandi ammassi (a) facilmente visibili e copre grandi porzioni di suolo. Quando l'umidità è sufficiente *Nostoc* fissa l'azoto (a), e quando il suolo è secco diventa dormiente (b), sebbene si mantenga vivo anche con valori di potenziale estremamente negativi. Le cellule sopravvivono e recuperano la vitalità in pochi secondi quando ricevono nuovamente l'acqua. c) Le cellule più grandi di queste colonie di *Nostoc* sono eterocisti, nelle quali avviene la fissazione dell'azoto.





La parete cellulare dei cianobatteri

Figura 17.3
Rappresentazione schematica di una cellula cianobatterica (disegno di G.P. Felicini).

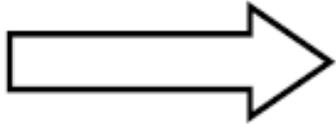


Molti generi di cianobatteri sono in grado di fissare l'azoto.

Trasformano l' N_2 atmosferico in ione ammonio (NH_4^+).

I cianobatteri sono responsabili della maggior parte della fissazione di N_2 atmosferico

• Batteri azotofissatori



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

ORGANISMI AZOTO FISSATORI

PROCARIOTI LIBERI

- **Batteri eterotrofi** aerobi (es. Azotobacter), anaerobi facoltativi (es Klebsiella) o obbligati (Clostridium) **pochi Kg di N fissato/ettaro**
- **Batteri fotoautotrofi** (es Rhodospirillum, Rhodopseudomonas)
Cianobatteri unicellulari o coloniali senza eterocistici (Spirulina, Oscillatoria)
con eterocisti (Nostoc, Calotrix) **1-10 Kg di N fissato /ettaro**

PROCARIOTI SIMBIONTI

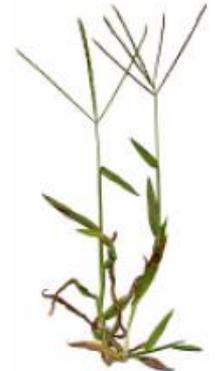
- cianobatteri con molti tipi di piante inferiori e superiori (*Anabaena* e *felce*)
- batteri *Rhizobium* con leguminose.

Azotofissatori simbiotici

Eterotrofi (organotrofi) 5-140 Kg N fissato/Ha
fotosintati della pianta come fonte di energia

Azotobacter / *Paspalum* (**Graminaceae**)

Azospirillum / *Digitaria* (**Graminaceae**)



Rhizobium / **Leguminose**

alcuni beta-proteobatteri / **Leguminose**

Bradyrhizobium / **Leguminose**



Bradyrhizobium / *Parasponia*, *Trema* (**Ulmaceae**)



Frankia (**Attinomiceti**) / 137 specie di angiosperme arboree
(**Alnaceae, Betulaceae, Rosaceae, Coriariaceae, Rhamnaceae, Eleagnaceae, Myricaceae etc.**)



Azotofissatori simbiotici

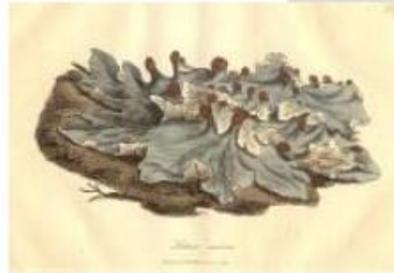
Autotrofi (Fototrofi) 5-30 Kg N fissato/Ha

luce come prevalente fonte di energia

Nostoc / Cycas (Gimnosperme)



Nostoc / Peltigera (Licheni)



Halosiphon / Sphagnum (Muschi)

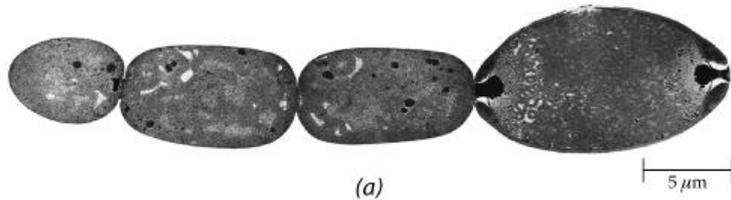


Anabaena / Azolla (Felci)



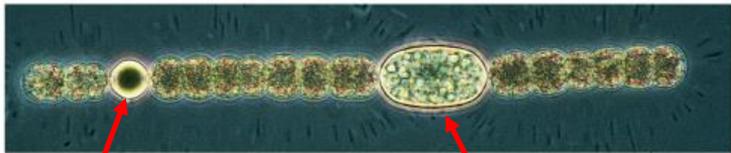


Anabaena azollae



(a)

5 μm



(b)

20 μm

eterocisti

acinet

Anabaena, vive in simbiosi con la felce azolla nelle risaie.

L'acinet è una cellula modificata per superare condizione ambientali avverse, 'cellule di resistenza'.

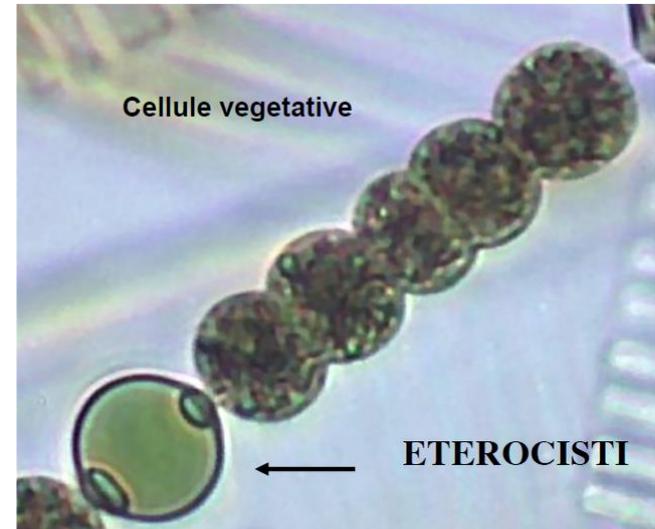
La fissazione dell'azoto avviene in cellule specializzate dette **eterocisti**.

Nostoc, coloniale ed azotofissatore

Le cellule più grandi, più chiare, dette eterocisti, sono specializzate per **fissare l'azoto** molecolare (N_2).



Eterocisti



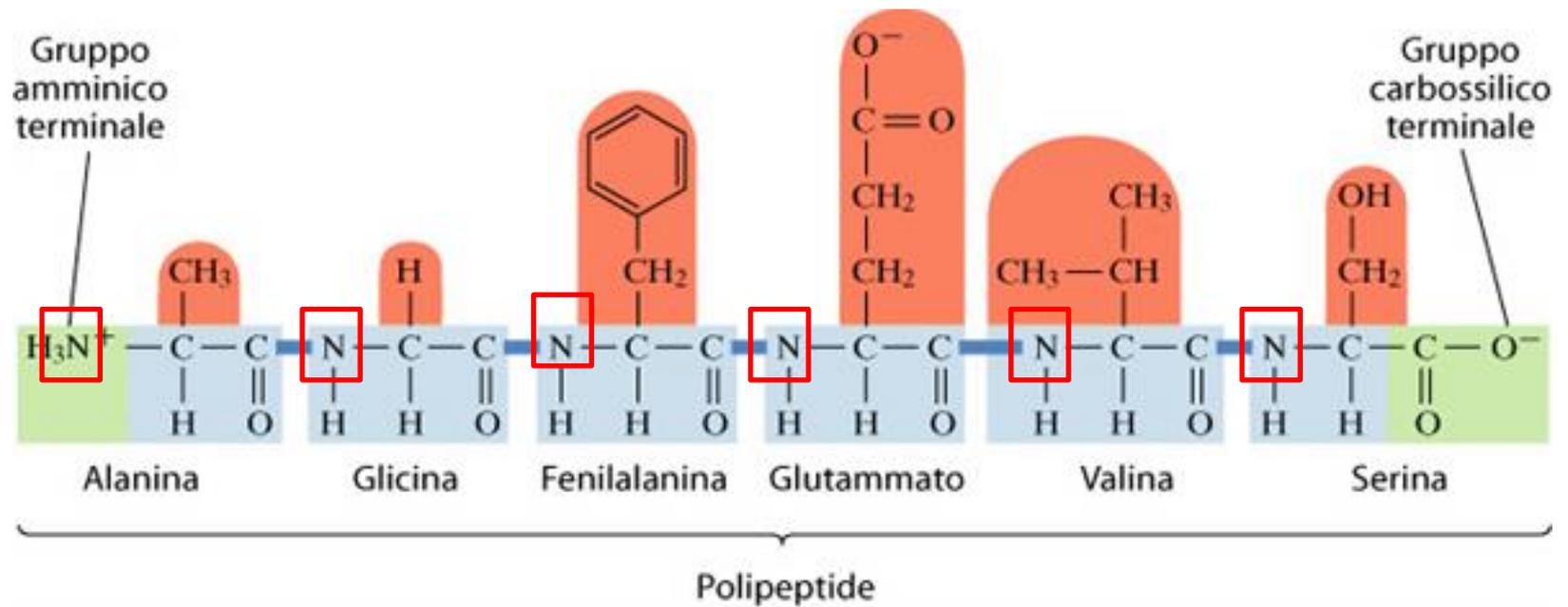
Azoto: N

- Scoperto da D. Rutheford nel 1772
- Numero Atomico: 7
- Diversi numeri di ossidazione
- Elettronegatività: 3.04
- T fusione: - 209,86°C
- T ebollizione: - 195,8°C
- Forma circa il 78% dell'atmosfera terrestre ed è presente come N₂

L'Azoto è

- Utilizzato nell'industria chimica per la preparazione di ammoniaca e altri fertilizzanti. Viene utilizzato nelle atmosfere inerti delle preparazioni alimentari. E' usato nell'industria degli esplosivi.
- Negli organismi viventi è presente negli **aminoacidi** che compongono le proteine, negli **acidi nucleici**, nei vegetali è anche presente nel tetrapirrolo della clorofilla.

La presenza in queste molecole essenziali per la vita lo rende indispensabile per la vita stessa.



Nonostante l'abbondanza di azoto nell'atmosfera, la carenza nel suolo è spesso un fattore limitante per la crescita delle piante.



Carenza di azoto

Sintomi di carenza di azoto (barbabietola)



Uso di fertilizzanti azotati

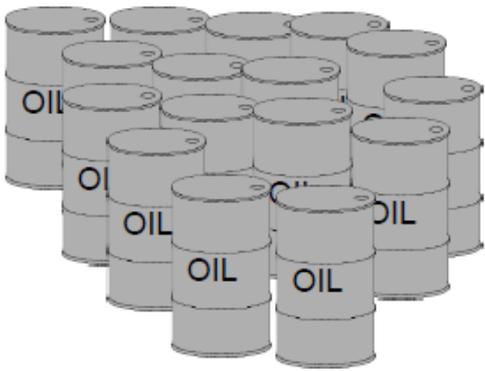
Stato di ossidazione di alcuni composti dell'azoto

Nitrato	NO_3^-	$\text{N} = +5$
Nitrito	NO_2^-	$\text{N} = +3$
Ammoniaca	NH_3	$\text{N} = -3$
Ammonio	NH_4^+	$\text{N} = -3$
Gruppo amminico degli aa	$-\text{NH}_2$	$\text{N} = -3$
Azoto Molecolare	$\text{N} \equiv \text{N}$	$\text{N} = 0$

Metabolismo dell'Azoto

- La maggior parte dell'azoto (N_2) è presente nell'atmosfera ma è inerte (i due atomi sono uniti da un triplo legame).
- Può essere utilizzato dagli organismi non azotofissatori solo dopo un processo di riduzione.

Dal grande serbatoio atmosferico l'azoto entra molto lentamente nella biosfera: le piante lo possono utilizzare solo dopo che i processi di fissazione naturale lo hanno reso disponibile sotto forma di ioni ammonio o, soprattutto, nitrato.

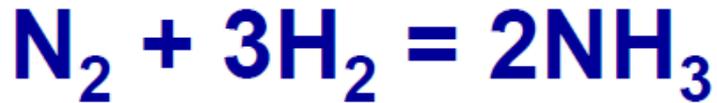


Fissazione Industriale dell'AZOTO



17 quintali \longrightarrow 1 quintale

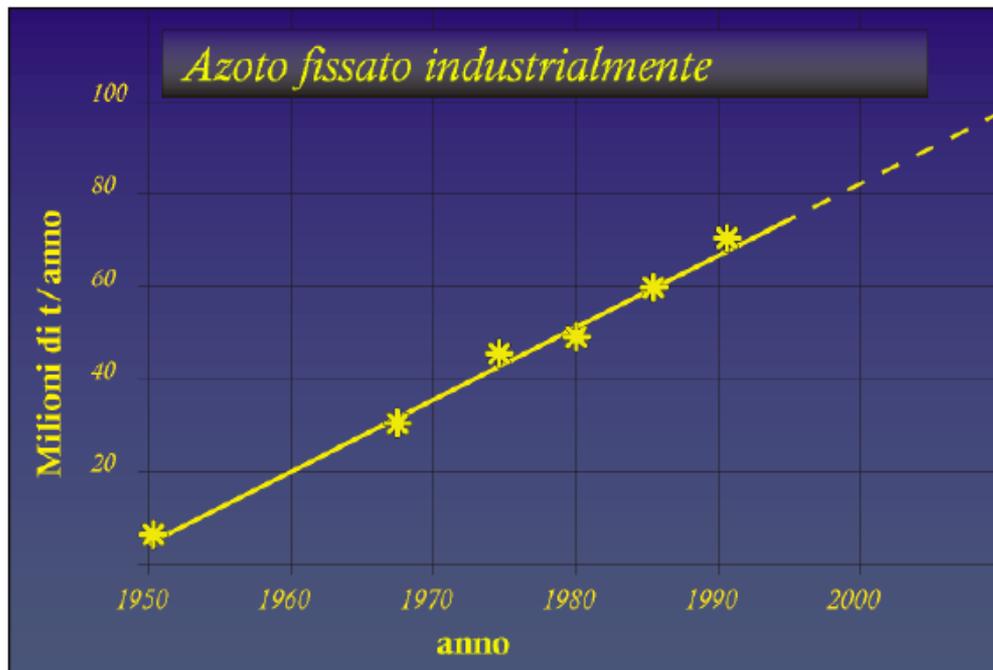
NH_3 = **ammoniaca**



Processo Haber-Bosch

Per ottenere 100 Kg NH_3 occorrono

- 1700 Kg di petrolio-equivalenti (nafta, olio combustibile, metano)
- Produzione **idrogeno gassoso**
- Pressioni elevate (**350-1000 ATM**)
- Temperature elevate (**300-500 °C**)
- Catalizzatori** chimici



Mentre i **microrganismi azotofissatori** producono da pochi Kg fino a **700-1000 Kg di N fissato/anno/ettaro**

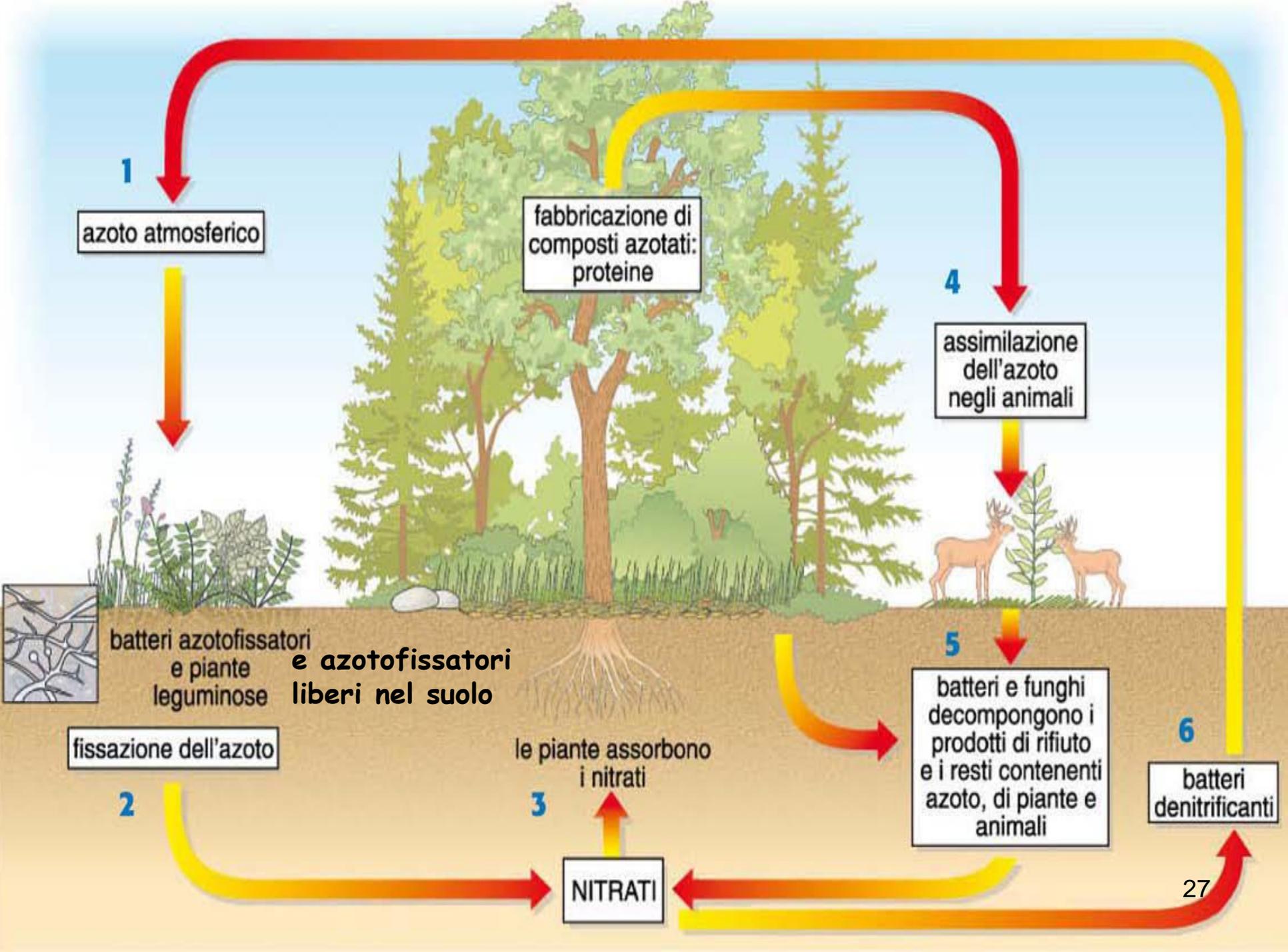
Questo processo industriale è detto di Haber-Bosch

- a temperatura ambiente
- a pressione atmosferica

Ogni anno vengono prodotti, industrialmente, circa **25 milioni** di tonnellate di fertilizzanti azotati, con un dispendio di energia ed economico notevole.

Ogni anno vengono fissati naturalmente circa **150 milioni** di tonnellate di azoto.

Batteri e cianobatteri ogni anno convertono circa **130 milioni** di tonnellate di N da azoto inorganico in una forma utilizzabile dalle piante.



Principali reazioni del ciclo dell'azoto

- Fissazione (batteri)
- Nitrificazione (batteri)
- Assimilazione e biosintesi (piante e successivamente animali)
- Decomposizione (batteri e funghi)
- Ammonificazione (batteri)
- Denitrificazione (batteri)

Dall'atmosfera al terreno: **Fissazione**

Questa trasformazione può avvenire naturalmente ad opera di azotofissatori.

Nel terreno:

Mineralizzazione e/o Ammonificazione

Nitrificazione

Assimilazione

Denitrificazione → atmosfera

Fissazione dell'Azoto

- Si intende la conversione di N_2 in Ammonio prima, e successivamente in nitrito e nitrato.

Dal punto di vista chimico si tratta di una reazione di **riduzione**

Reazione di riduzione: reazione chimica in cui un atomo **acquista elettroni (e^-)**

Una reazione di riduzione avviene contemporaneamente ad una reazione di ossidazione.

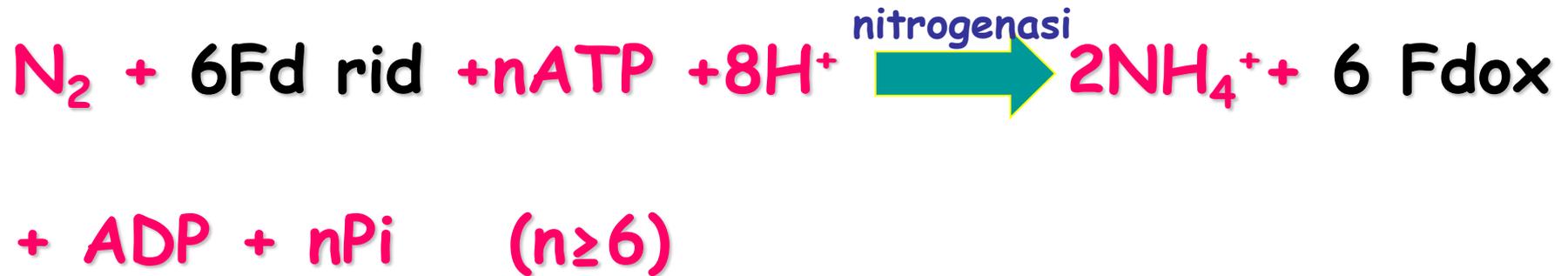
Durante una reazione di ossidazione un atomo, l'atomo ossidato, **perde un elettrone** che viene accettato da un altro atomo il quale a sua volta si riduce.

La fissazione dell'N, definita anche riduzione assimilativa dell'azoto gassoso, **è una reazione essenziale per la biosfera**, al pari della fotosintesi e della riduzione dello zolfo.

La riduzione dell'N₂ e dello zolfo si svolgono solitamente in condizioni anaerobiche, come terreni e fanghi privi di ossigeno, e sono attività limitate a pochi microrganismi, **i microrganismi fissatori dell'azoto e dello zolfo**.

Solo la fissazione del carbonio richiede la presenza di organismi vegetali/batteri, di luce solare e di ossigeno.

I batteri azoto-fissatori utilizzano l'enzima Nitrogenasi e spendono molta energia:



■ alcuni batteri usano la flavodossina al posto della ferridossina

La ferredossina (fd) è una proteina contenente un gruppo ferro-zolfo in grado di mediare il trasferimento di elettroni in numerose reazioni metaboliche.

La reazione di azotofissazione biologica, catalizzata dal complesso enzimatico nitrogenasi è, sinteticamente:



Il processo avviene attraverso diversi stadi di riduzione dell'azoto. Si passa da uno stadio di ossidazione 0 dell'azoto molecolare a -3 dell'azoto dello ione ammonio

La **nitrogenasi**:

- non esiste negli organismi eucarioti
- **è irreversibilmente inibita dall'ossigeno**

quindi può funzionare solo in:

- organismi anaerobi
- ambienti isolati (es. eterocisti)
- diminuita presenza di ossigeno (es. respirazione intensa o cattura da parte della Leg-emoglobina nella simbiosi Rhizobium/leguminose)

L'attività della nitrogenasi è regolata anche con un controllo a feed-back negativo dall'ammoniaca, la cui presenza ne inibisce l'attività.

Nello specifico la reazione di riduzione catalizzata dalla nitrogenasi porta alla sintesi di ammoniaca NH_3 .

L'ammoniaca reagisce accettando un protone e trasformandosi in ione ammonio NH_4^+

Quindi:

Il processo di fissazione dell'azoto quindi è:

- altamente riduttivo;
- inibito dall'ossigeno;
- molto costoso in termini di energia di attivazione in quanto l'azoto molecolare è un composto inerte data la presenza di un triplo legame molto stabile.

Nel suolo lo ione ammonio si scioglie facilmente. In alcuni suoli rimane più a lungo e alcune piante che vivono in questi suoli sono in grado di utilizzare NH_4^+ per la sintesi degli aa, ma la maggior parte delle piante non è in grado di utilizzare direttamente lo ione ammonio.

E' necessario trasformare l'azoto dello ione ammonio in forme più idonee per essere utilizzate da tutte le piante.

Quindi intervengono altri microrganismi.

Alcuni batteri del suolo sono in grado di ossidare l'ammoniaca o gli ioni ammonio in un processo detto **nitrificazione**.

Il prodotto di questa reazione è il **nitrito** (NO_2^-) con +3 come stato di ossidazione dell'azoto.

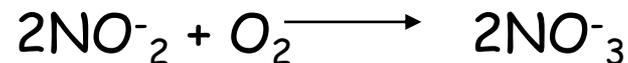
La reazione è una reazione **esoergonica**.

L'energia liberata durante le reazioni di nitrificazione viene utilizzata da altri batteri, **autotrofi chemiosintetici**, per ridurre la CO_2 come fanno gli organismi fotosintetici.

Il principale genere di batteri che ossida l'ammoniaca a nitrito, detti batteri nitrificanti, è **Nitrosomonas**.

Il nitrito è tossico per le piante

Un'altra classe di batteri, **Nitrobacter**, ossida il nitrito (NO_2^- ; [+3]) a **nitrato** (NO_3^- ; [+5]).

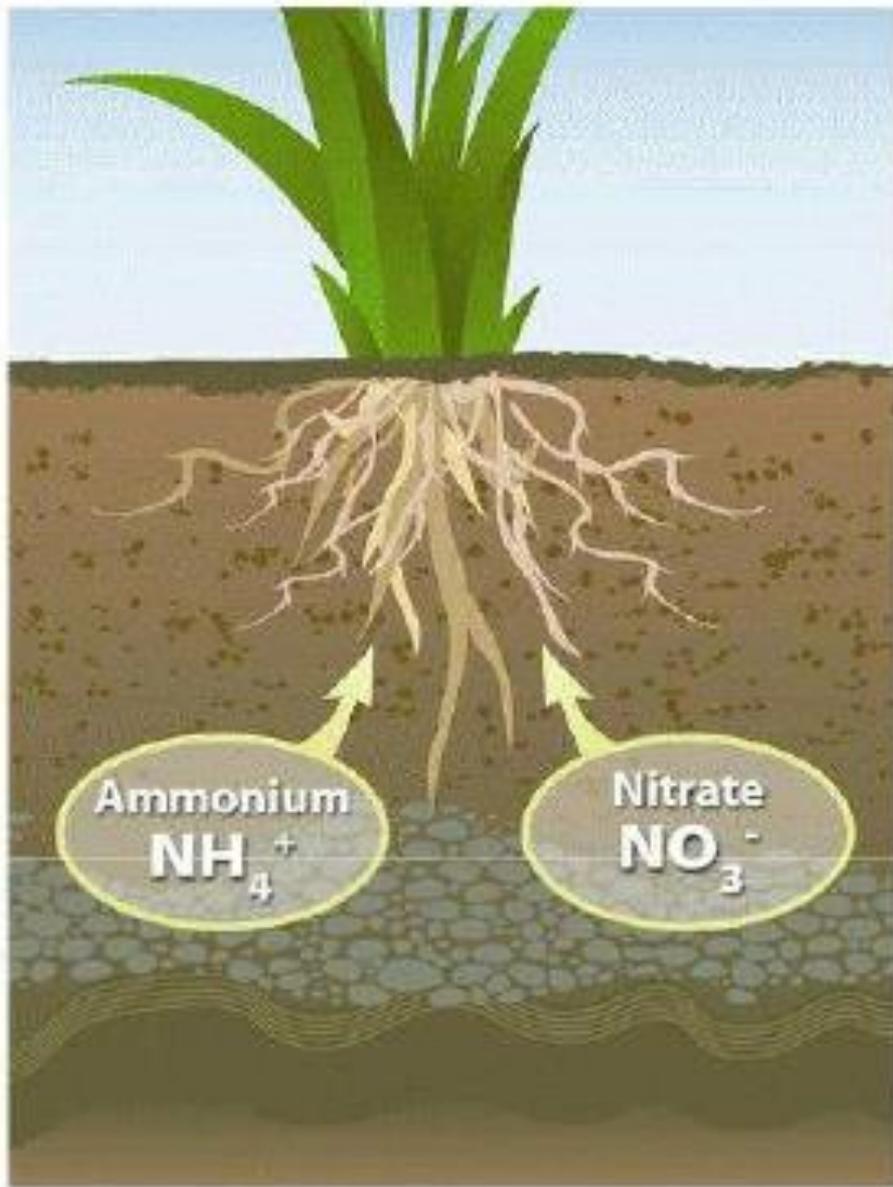


Anche questa reazione è esoergonica.

Il nitrato è la forma nella quale quasi tutto l'azoto viene assorbito dalle radici delle piante.

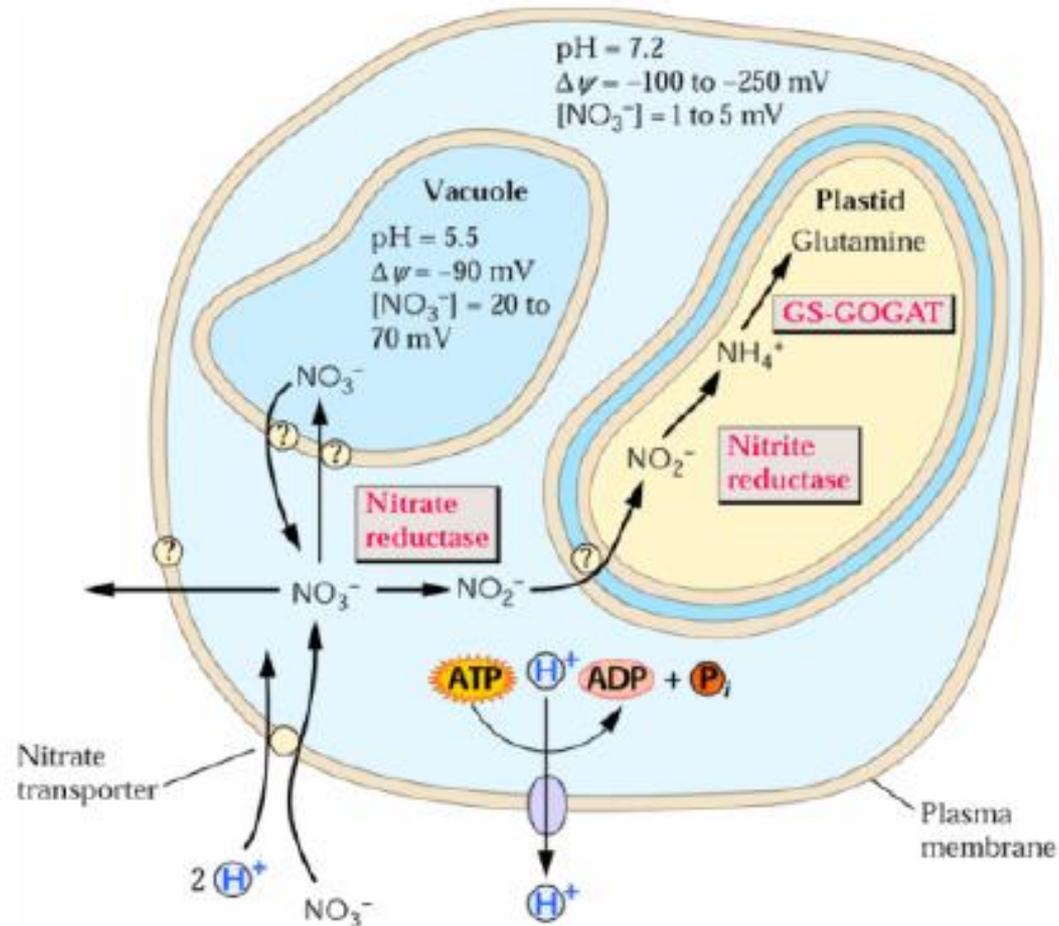
La maggior parte dei fertilizzanti azotati contengono ioni ammonio o urea, quest'ultima nel terreno si trasforma in ioni NH_4^+ .

Lo ione ammonio per nitrificazione viene convertito a NO_3^-



L'azoto dello ione ammonio, ma soprattutto quello del nitrato, viene assorbito dalle radici delle piante e assimilato negli aa e in altre molecole. 43

Il nitrato viene trasportato attivamente nella cellula (radici)



Nelle cellule radicali l'N del nitrato o dello ione ammonio viene **assimilito**, ossia incorporato nelle molecole organiche.

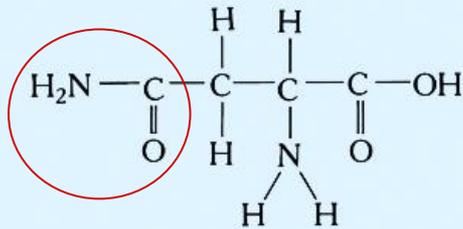
SONO NECESSARI DUE ENZIMI

GLUTAMMINA SINTETASI (GS)

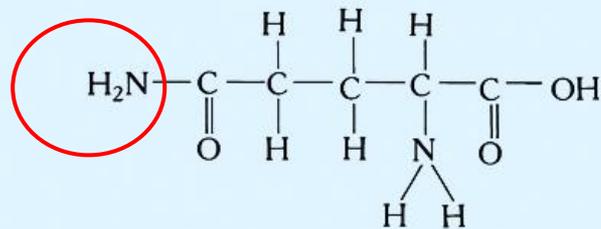
GLUTAMMATO SINTASI (GOGAT)

(GOGAT = glutammato oxoglutarato aminotransferasi)

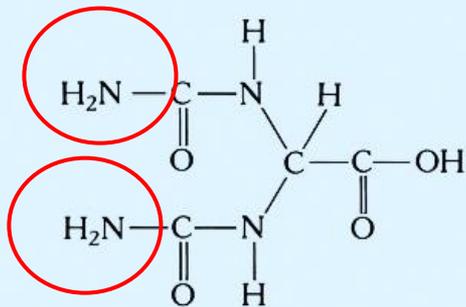
Ammidi importanti



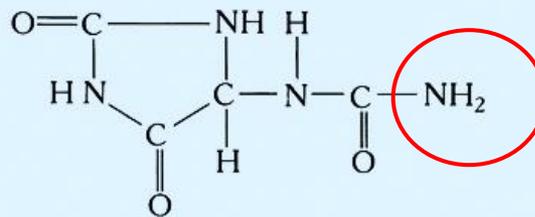
Asparagina



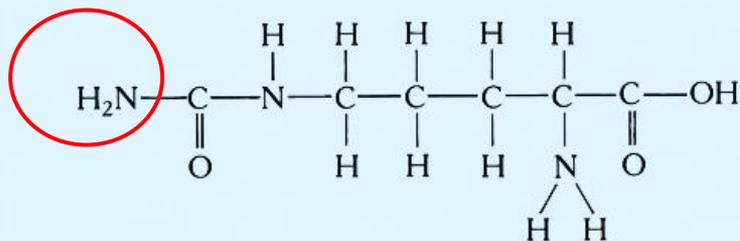
Glutammina



Acido allantoico



Allantoina



Citrullina

Ammonificazione: processo di formazione dello ione ammonio a partire dalla decomposizione di composti organici ad opera di batteri e funghi, es. proteine di materia in decomposizione come tessuti ed organi animali e vegetali .

L'azoto viene ritrasformato in N_2 per un processo detto **denitrificazione**.

Il nitrato viene trasformato in forme gassose come N_2 e N_2O che vengono rilasciate nell'atmosfera

Questa reazione avviene ad opera di altri batteri detti denitrificanti.

L'azoto viene anche perso per la raccolta delle piante, erosione del terreno, incendi, lisciviazione.

L'attività dei batteri denitrificanti e dei processi naturali è essenziale per ripristinare il serbatoio di N_2 atmosferico

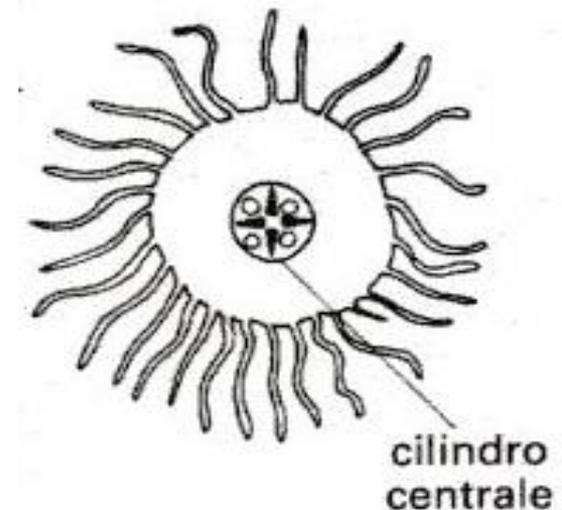
Se l'azoto non fosse continuamente rimpiazzato la vita sulla terra lentamente scomparirebbe.

I batteri più efficienti nella fissazione dell'azoto formano associazioni simbiotiche con alcune piante.

Es: Rhizobium e leguminose

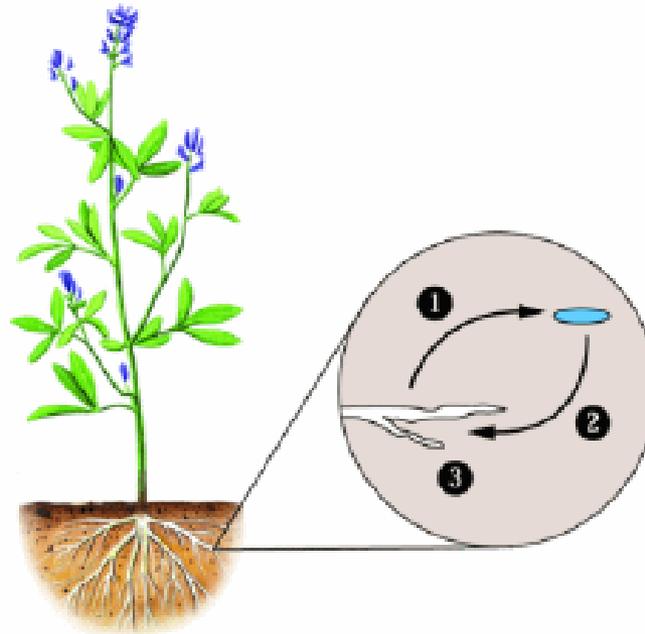
Nella simbiosi tra batteri e leguminose, i batteri forniscono alla pianta l'azoto e la pianta fornisce energia e le molecole organiche contenenti carbonio organico.

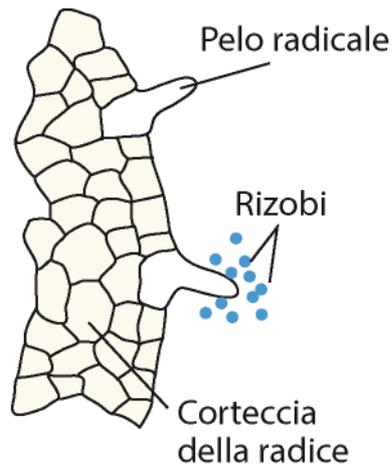
I batteri, detti rizobi, invadono le cellule radicali delle leguminose attraverso i peli radicali. Questi si incurvano ed intrappolano i rizobi. I batteri entrano nella radice mediante un filamento d'infezione.



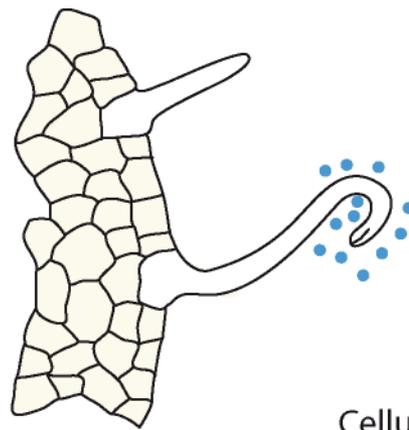
Simbiosi rhizobia/leguminose

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

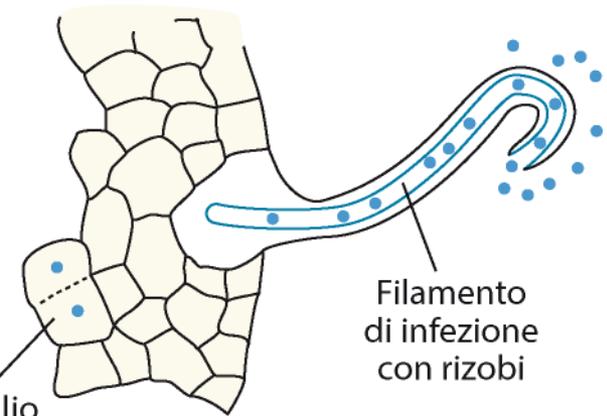




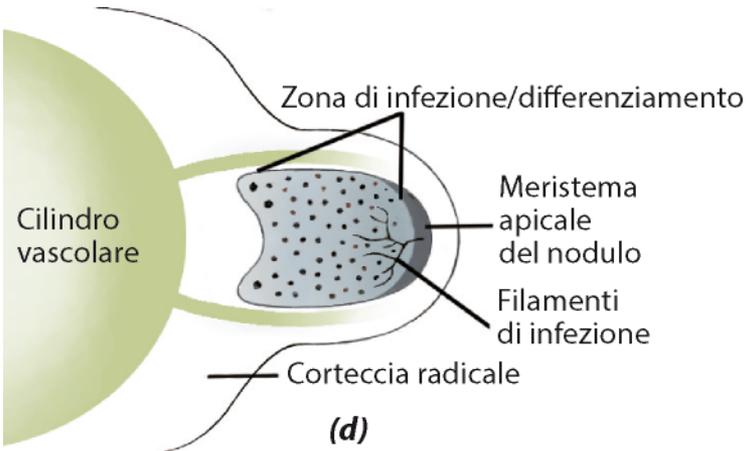
(a)



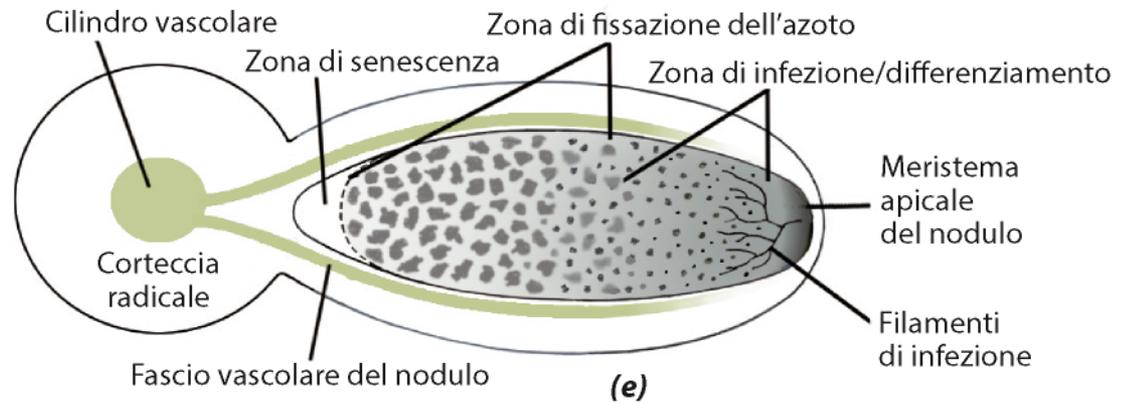
(b)



(c)



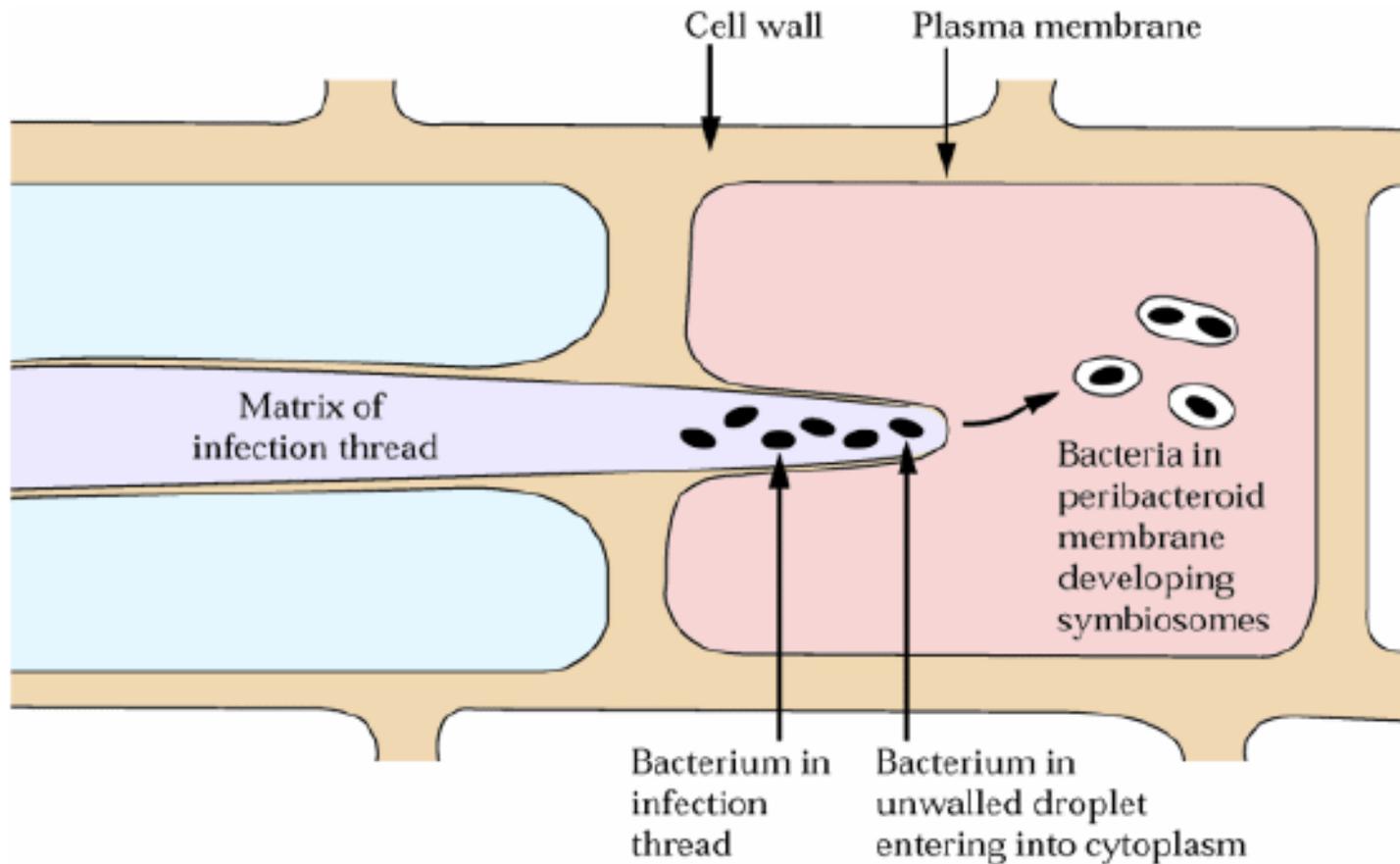
(d)



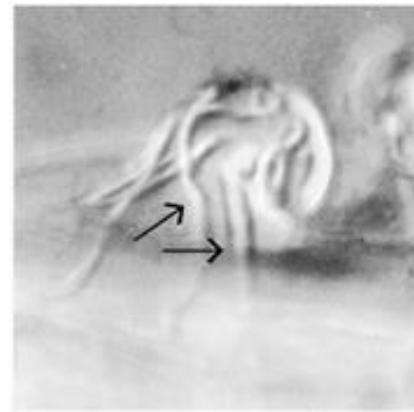
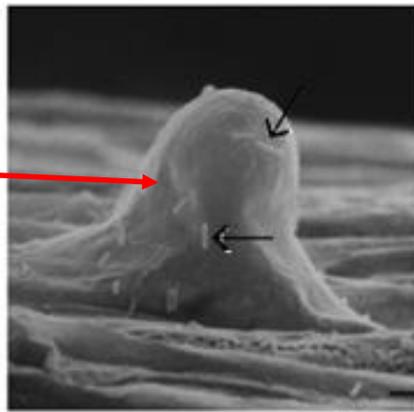
(e)

Il filamento di infezione

Rilascio dei batteri dal filamento di infezione

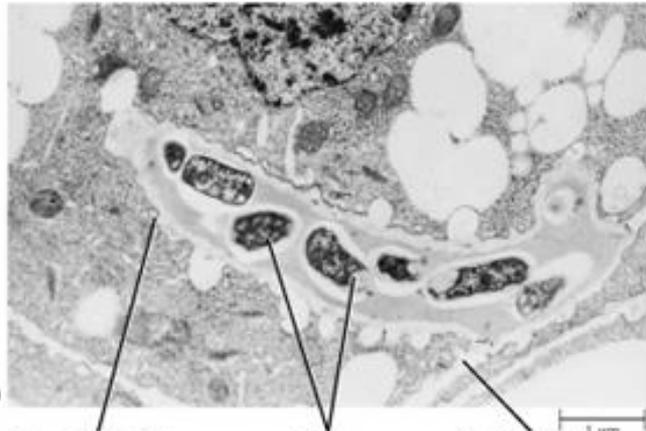


Pelo radicale e rizobi

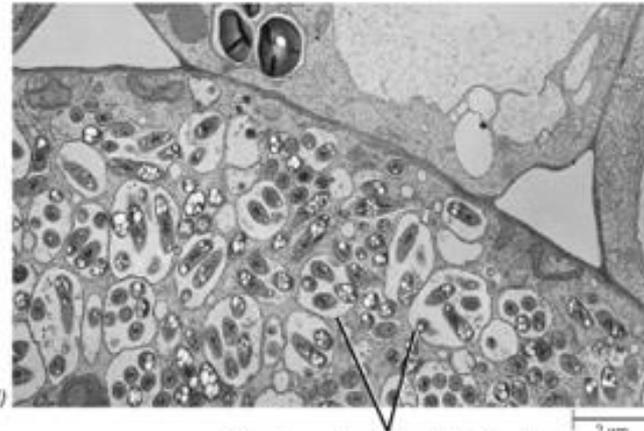


(a) 5 μm

(b) 20 μm



(c) Filamento d'infezione Rizobi Parete cellulare 1 μm

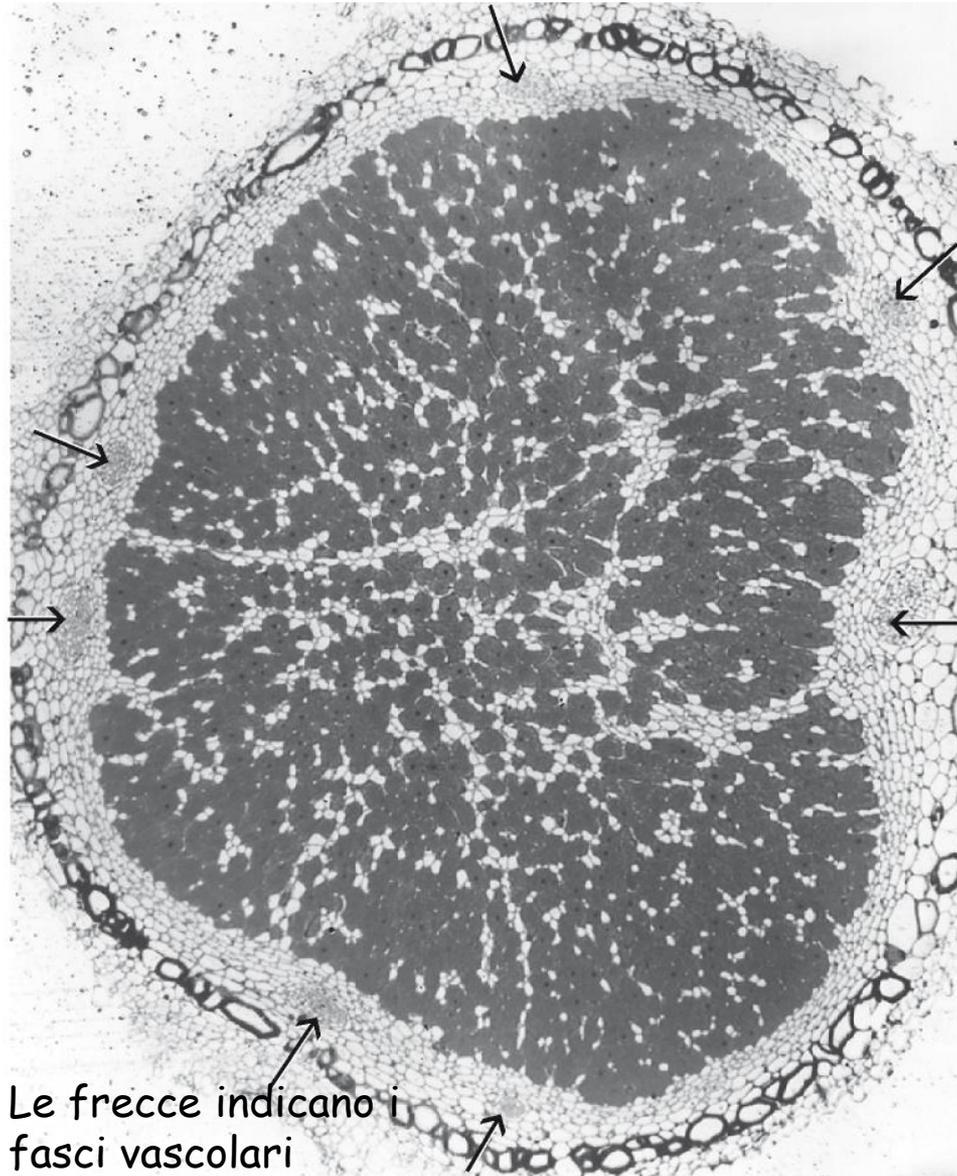


(d) Membrana che circonda i batteroidi 2 μm

I rizobi si ingrandiscono e si trasformano in **batteroidi in grado di fissare l'azoto.**



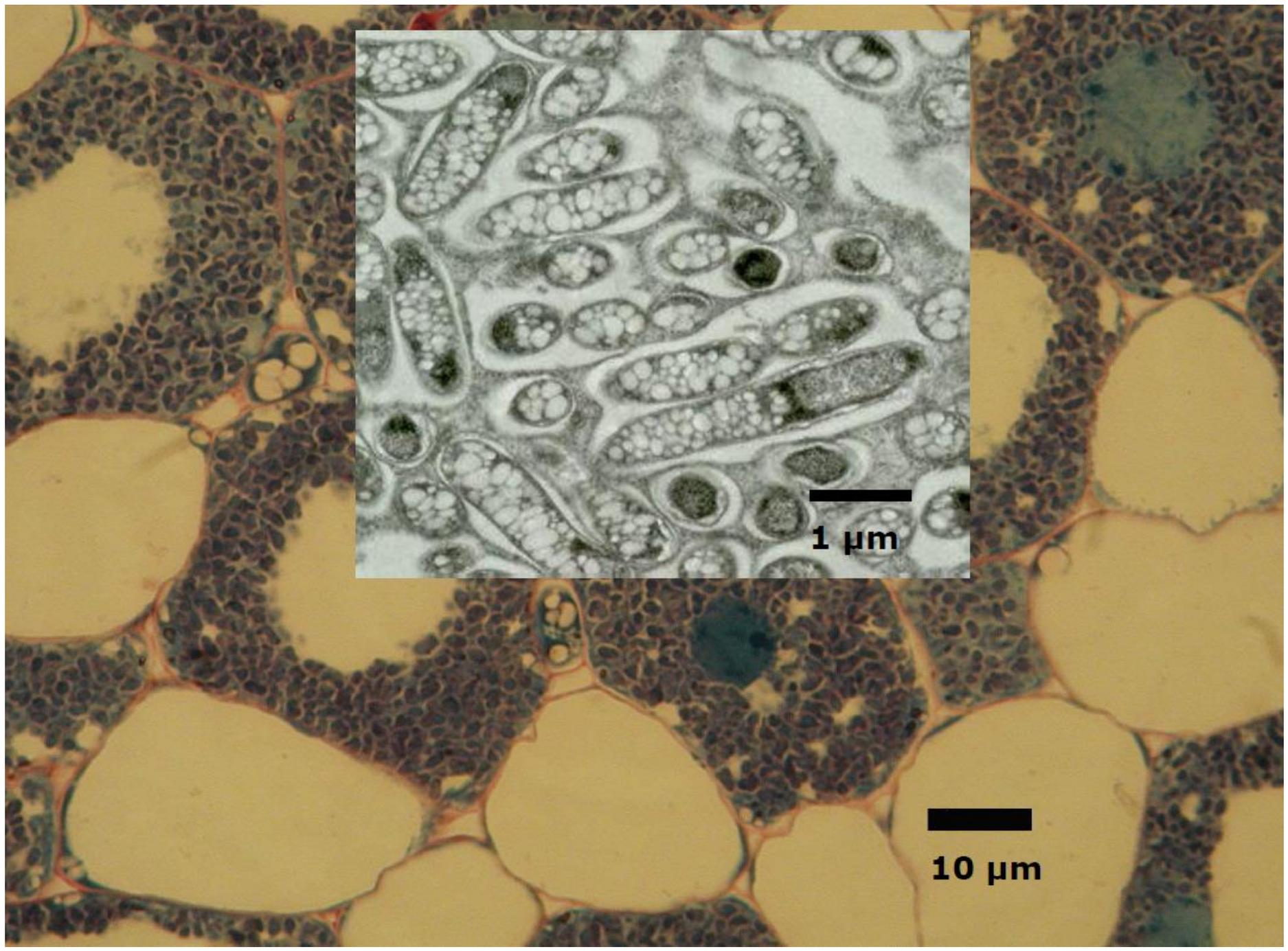
(a)



Le frecce indicano i fasci vascolari

(b)

0,5 μm
55

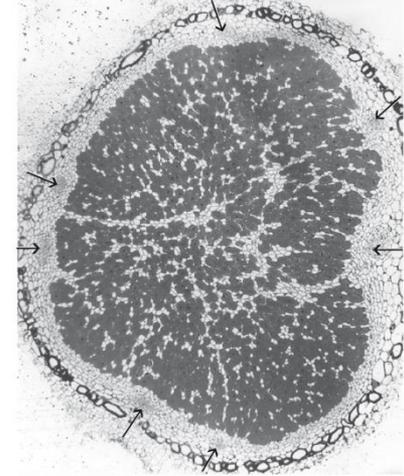


1 µm

10 µm

All'interno delle cellule della pianta i batteroidi proliferano e formano una struttura tumorale detta nodulo o tubercolo.

I noduli radicali sono formati da una corteccia sottile che circonda una regione centrale contenente sia cellule con batteroidi che cellule non infettate.



Fattore limitante nel nodulo è la presenza di Ossigeno.

La presenza dell'O₂ è regolata da una particolare proteina la

LEG-EMOGLOBINA

La leg-emoglobina, presente ad elevate concentrazioni nel citosol delle cellule infettate, contiene un gruppo eme che lega l'ossigeno.

Leg-emoglobina è una ferro-proteina: l'eme è sintetizzato dal *Rhizobium* e la proteina, globina, dalla leguminosa (soia, arachidi, fagiolo, pisello, lenticchia, lupino, erba medica, trifoglio, fave, etc..).

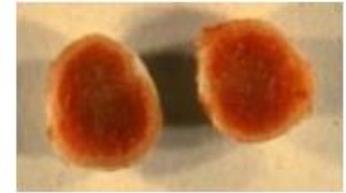
E' il prodotto della simbiosi

L'associazione tra batteri e leguminose è altamente specifico.

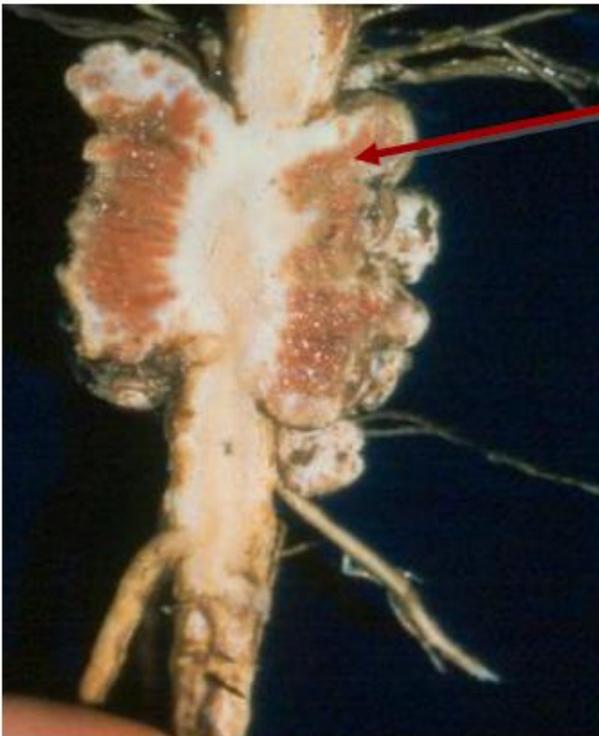


La **NITROGENASI**

è sensibile all'ossigeno molecolare

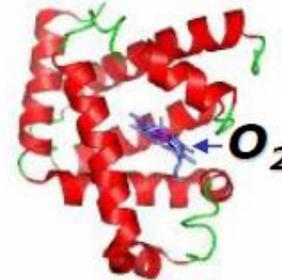


Rizobi → aerobi, simbiotici (**Leguminosae**)
compartimentalizzazione → **noduli (tubercoli) radicali**

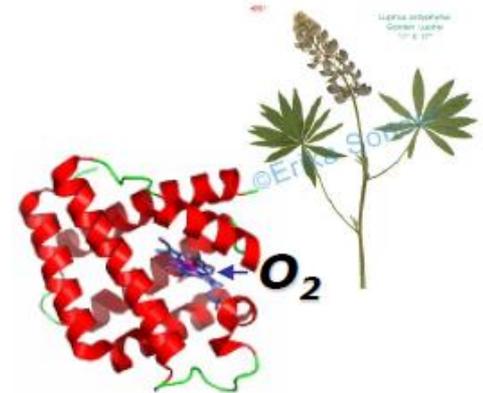


Leg-emoglobina

Proteina con eme e ferro con funzione di legare ossigeno, in analogia con emoglobine e mioglobine animali



Mioglobina di capodoglio

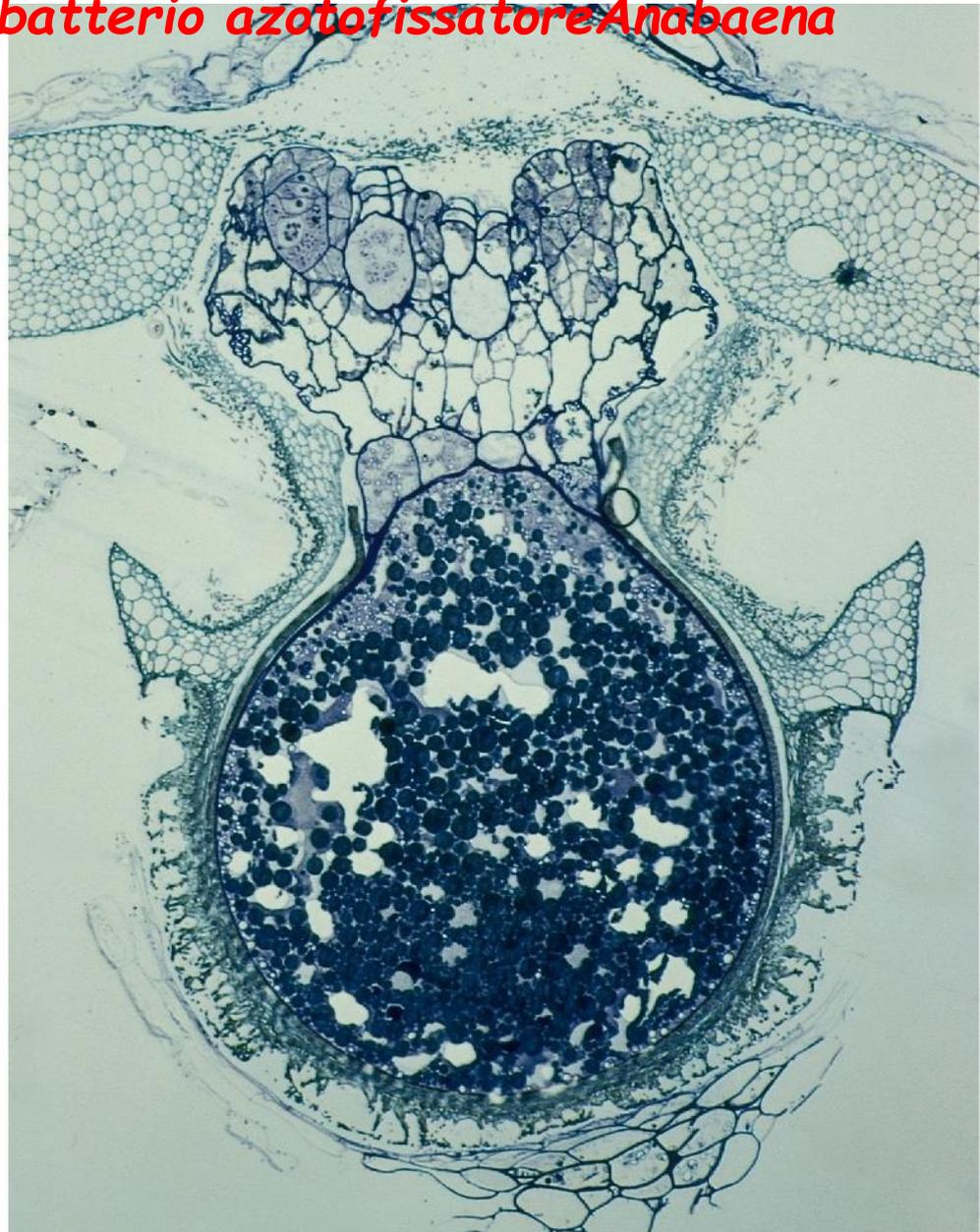


Leg-emoglobina di lupino

Simbiosi tra la felce *Azolla* e il batterio azotofissatore *Anabaena*



(a)



(b)

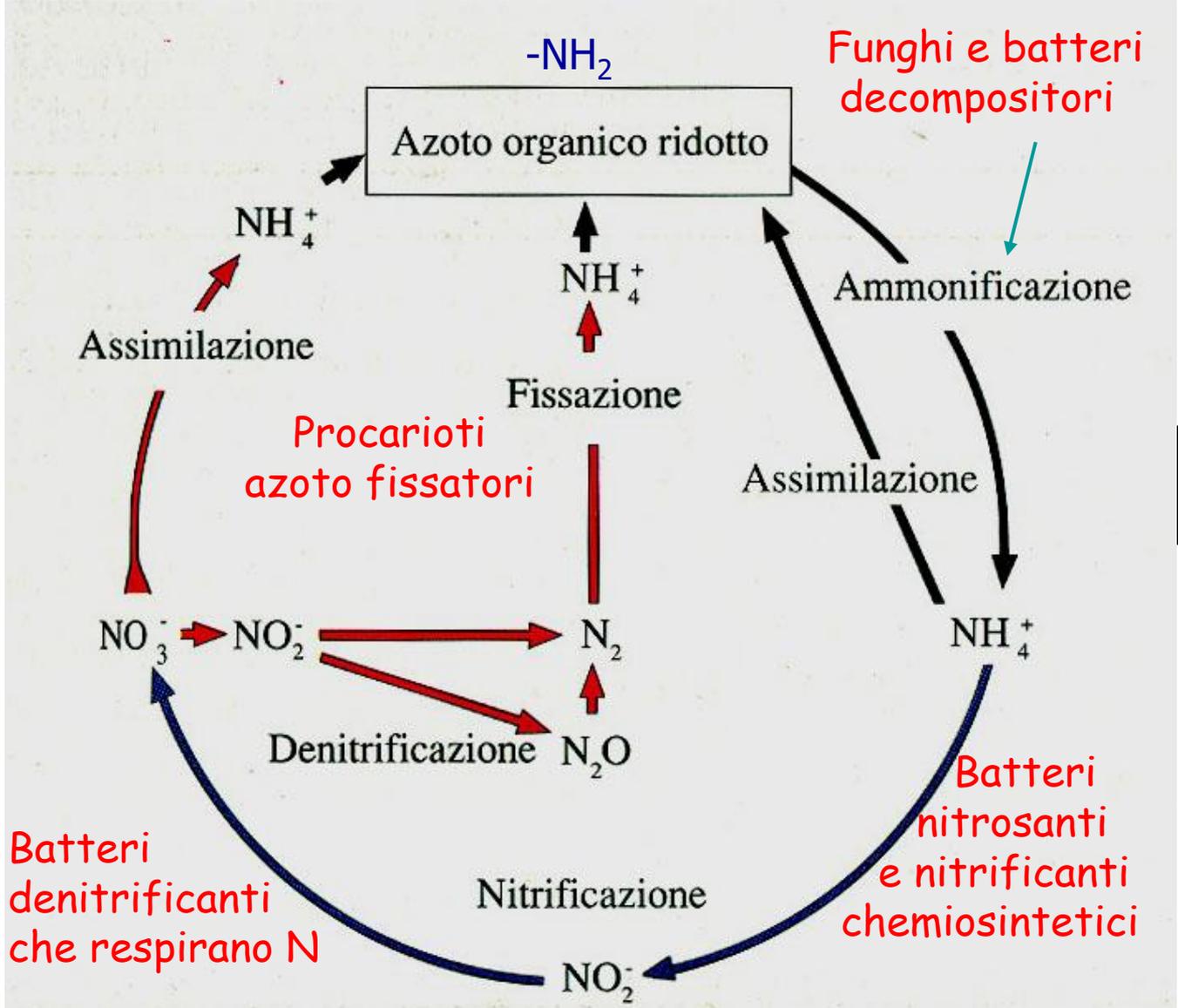
La capacità di *Azolla* sp. di fissare l'azoto mediante la simbiosi con il cianobatterio rende la felce una buona candidata per il suo utilizzo come fertilizzante naturale. Viene infatti spesso inoculata nelle risaie durante la coltivazione del riso.



Coltivazione di riso in risaia in cui è stata inoculata *Azolla* sp.
www.ecoport.org

Riassumendo:

Ciclo dell'Azoto



Freccia nera: ox
Freccia rossa: red

Poche piante sono in grado di utilizzare direttamente proteine di origine animale come fonte di azoto, sono le piante carnivore.

Mediante speciali adattamenti, catturano piccoli insetti, li digeriscono ed assorbono i composti azotati e i sali minerali in essi contenuti.



Utricularia vulgaris



Drosera rotundifolia

Da PH Raven "Biologia delle piante"

L'assimilazione dell'azoto inorganico in composti organici è uno dei più importanti processi della biosfera, al pari della fotosintesi e della respirazione.



Cianobatteri e biotecnologie

Biofertilizzazione con cianobatteri molto diffusa in Asia nei suoli idromorfi delle risaie

Global Rice Paddy Production

700 Mil ton (2014)



Composizione chimica tipica di <i>A. azollae</i> (% ss)	
C	47
N	10
Carboidrati	24
Proteina grezza	63
Lipidi	11
Ceneri	4

“ALGALIZZAZIONE”



COLTURA MASSIVA DEI CIANOBATTERI

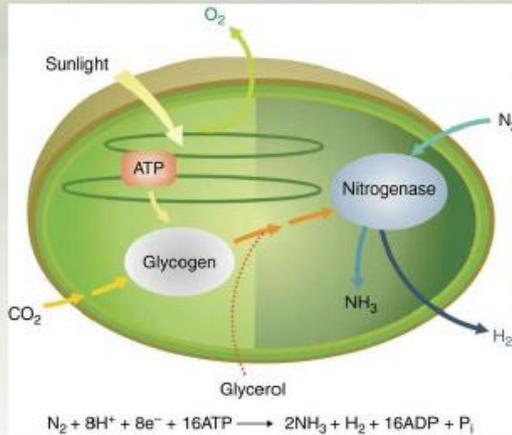
- A livello locale in vasche aperte, sacchi di plastica
- Inoculo e sviluppo in risaia
- In FBR per produzione di colture concentrate

Inoculare direttamente colture monoalgali o miste di cianobatteri N-fix vivi capaci di crescere, colonizzare ed insediarsi nel terreno svolgendo le proprie attività fisiologiche

Rilascio di N fissato per essudazione o degradazione microbica delle cellule morte

Ruolo dei cianobatteri N fix nel terreno

- Miglioramento chimica del suolo per incremento del contenuto in N e apporto di SO
- Stimolazione dei principali gruppi microbici del suolo (effetto “priming”)
- Colonizzazione primaria di substrati rocciosi ed aree degradate ed erose
- Genesi e mantenimento della struttura del suolo attraverso la produzione di polisaccaridi (azione ammendante)



Applicazioni in agricoltura

- Inoculanti e/o biofertilizzanti del terreno e delle risaie
- Condizionatori biologici del terreno
- Lotta biologica di patogeni vegetali o animali
- Recupero di aree degradate e suoli inquinati (bioremediation)
- Fonte di biopolimeri e sostanze utili per l'industria agroalimentare e mangimistica