

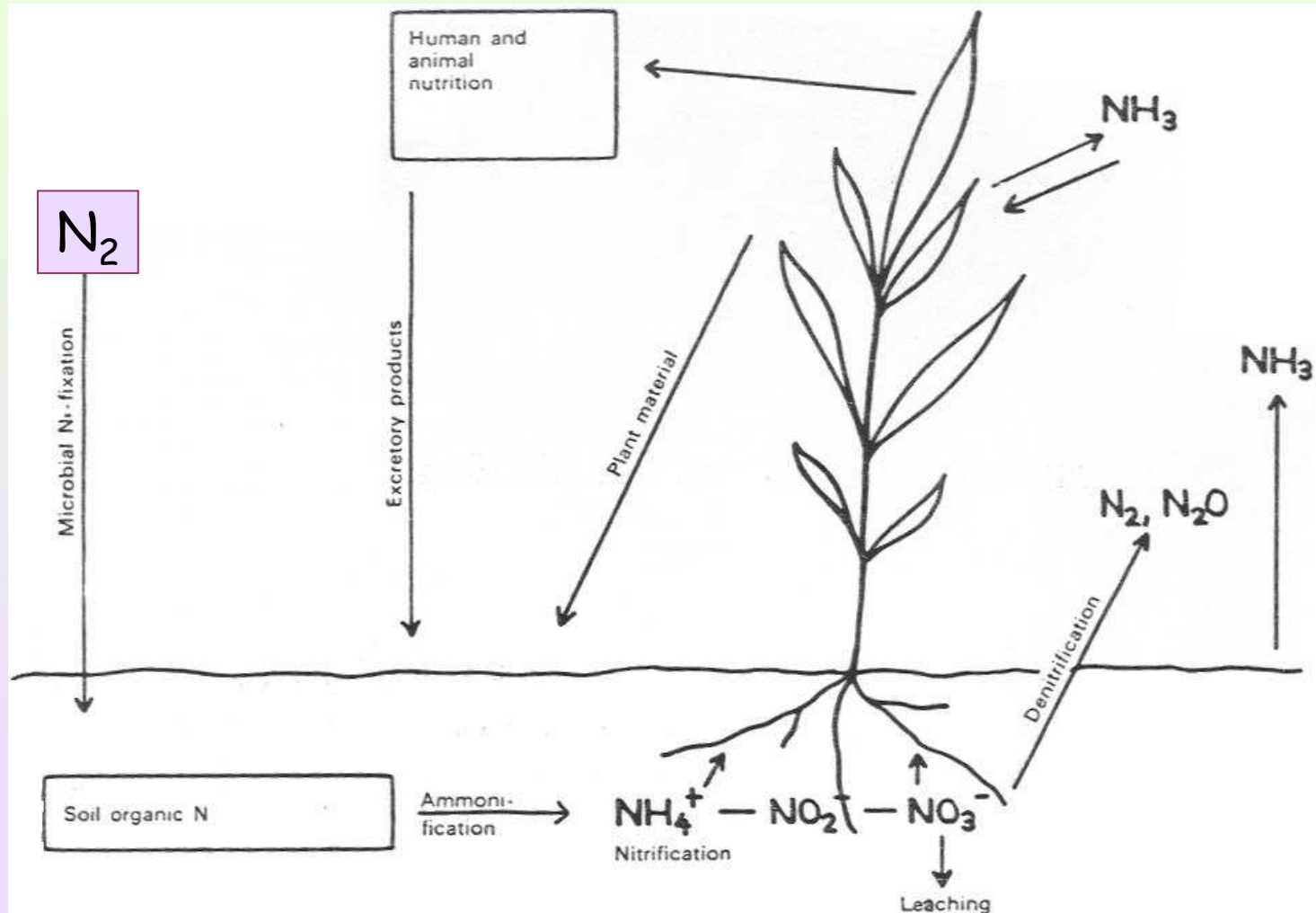
# Ciclo dell' Azoto:

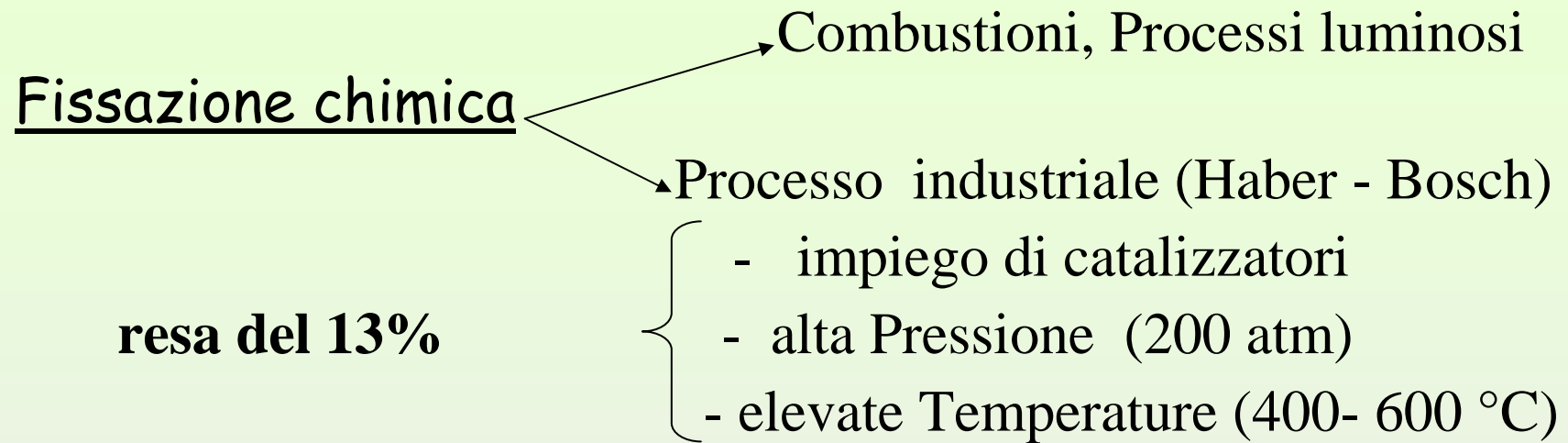
insieme dei processi di trasformazione delle varie forme di azoto presenti nell'ambiente

Fissazione dell'azoto atmosferico

Conversione

di N<sub>2</sub> in Ammoniaca:





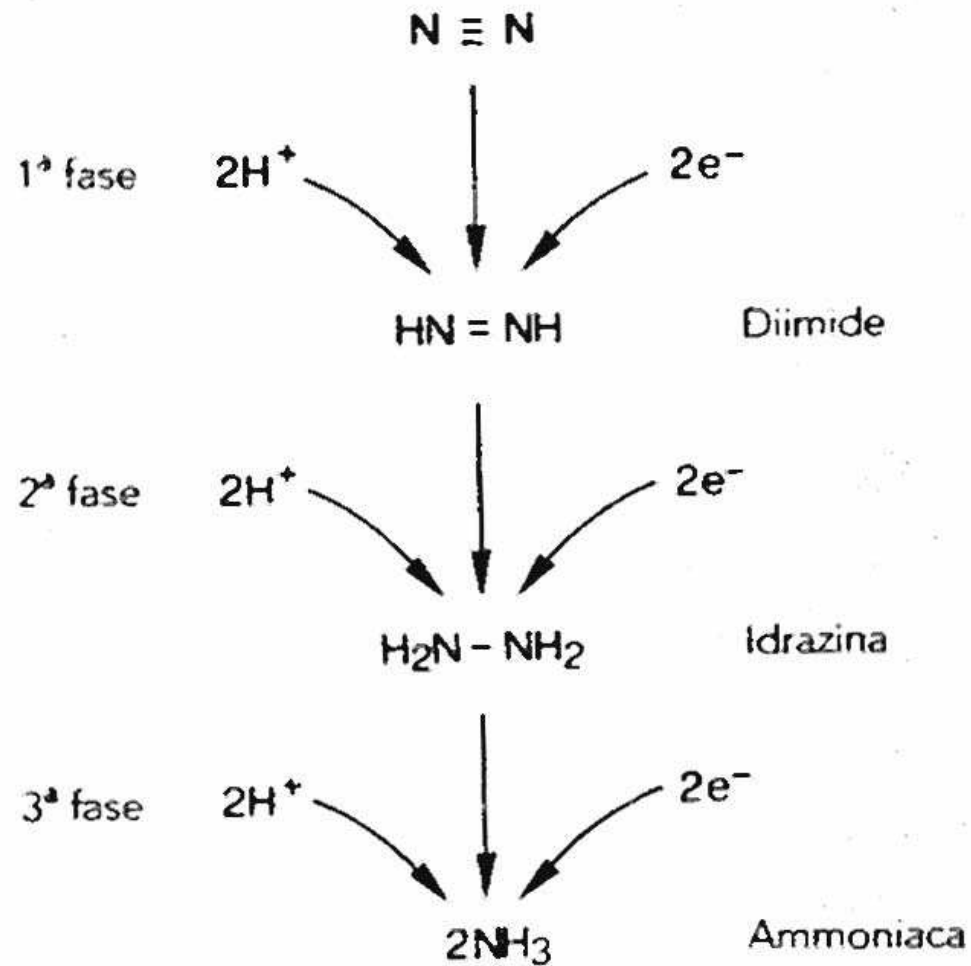
Fissazione biologica ad opera della Nitrogenasi

- Richiede dispendio di energia cellulare (ATP)
- Procede a  $p$  e  $T$  ambiente.

La fissazione chimica ha una capacità di fissazione pari a  
**1/4** della fissazione biologica

La quantità di  $N_2$  fissato **biologicamente** =  $139-170 \times 10^6 t$  N per anno  
è il doppio di quello ridotto con processi **non biologici**

Il processo di N- fissazione è la risultante di **3 stadi di riduzione** :



$$\Delta G_1^\circ = + 107 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta G_2^\circ = - 27 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta G_3^\circ = - 96 \text{ KJ/ mole}$$

$$\Delta G_{\text{tot}} = - 16 \text{ KJ/mole}$$

E' un **processo esoergonico**

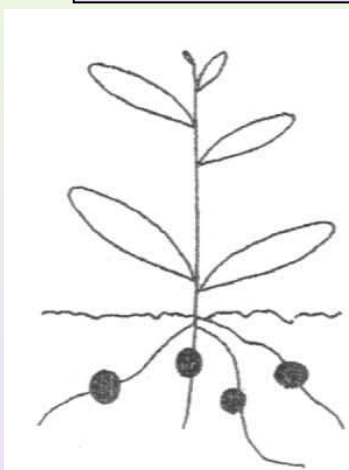
richiede una notevole **energia di attivazione** perché l' $\text{N}_2$  è inerte

## N fissazione biologica

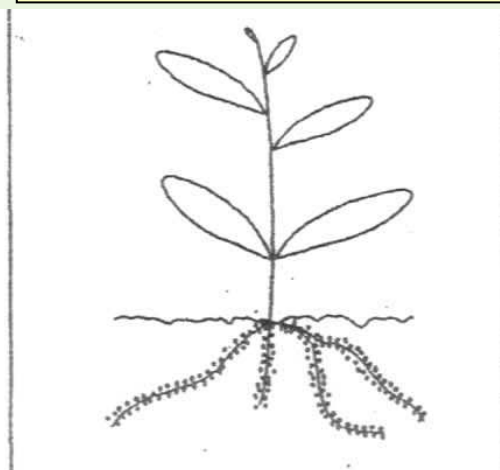
3 strategie differenti  
per

- 1) fonte energetica utilizzata
- 2) diversa capacità di fissazione

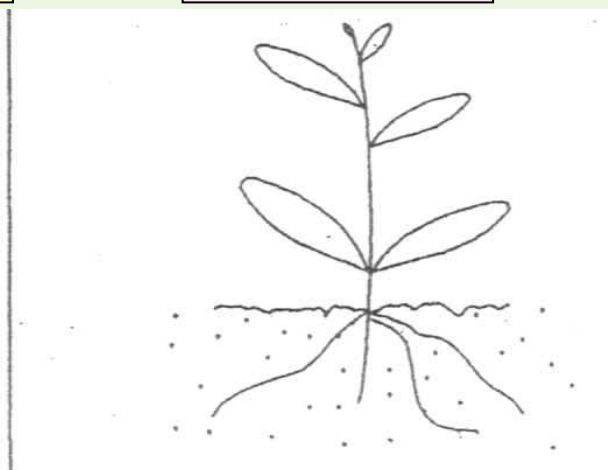
Simbiosi



In associazione



Libera



Fonte  
di energia

Carboidrati,  
Ac. organici

Essudati radicali  
dall'ospite

Residui organici  
Fotosintesi

Kg N fissato/  
ettaro/anno

50- 400

10 - 200

1- 50

## Fissazione di tipo **associativo**

I batteri diazotrofi  
in associazione  
sono **eterotrofi**

- Azospirillum e Azotobacter  
(zone tropicali)
- Enterobacter, Klebsiella  
(zone temperate)

Il **limite principale** consiste proprio nella scarsa disponibilità di **C org** in termini di **quantità** e **qualità**:

- Importanza della **composizione del substrato di C organico** fornito dall'ospite:  
preferenza per acidi carbossilici C4 e malato in particolare

La fissazione di tipo **associativo** è caratterizzata da

- Poca specificità pianta-ospite → il partner è più casuale
- Trasferimento indiretto dell'N ridotto → alla morte del batterio
- I batteri sono molto sensibili alla concentrazione di O<sub>2</sub> e di N nel suolo

Aumento dell'apporto di N nel suolo e **diminuzione attività nitrogenasica** in

Piantine di grano inoculate con *Azospirillum*

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> supply (g l <sup>-1</sup> )	Nitrogenase activity (nmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> per plant h <sup>-1</sup> )	Shoot dry weight (g per plant)
0	200	0.49
0.04	156	0.97
0.08	10	1.84
0.16	0	2.93

From Cohen *et al.* (1980).

La quantità di N fissato per via associativa è molto variabile::

Plant species	Proportion of total plant nitrogen
Rice ( <i>Oryza sativa</i> L.)	0–35
Wheat ( <i>Triticum aestivum</i> L.)	0–47
→ Sugar cane ( <i>Saccharum</i> sp.)	2–56 (60–80) <sup>b</sup>
Forage grasses	
<i>Brachiaria humidicola</i>	30–40
<i>Leptochloa fusca</i>	2–41

Compiled data from Chalk (1991).  
Boddey *et al.* (1991).

La **canna da zucchero** ha la maggiore capacità di fissazione:

- alta qualità negli essudati radicali
- alte temperature del suolo
- associazioni a più alta specificità pianta-ospite
- maggiore resistenza alla presenza di N nel terreno

I batteri **diazotrofi associati** possono favorire la crescita della pianta ospite in 2 modi :

- 1) Apporto di N alla pianta mediante **N-fissazione**
- 2) Produzione di **Fitormoni**

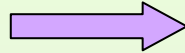
Produzione di  
**Fitormoni**  
*auxine, citochinine,  
giberelline*

• Modificazioni nella **morfologia radicale** e migliore acquisizione di nutrienti ( fosforo )

• Influenza sull'attacco di altri organismi della rizosfera  
( patogeni , utili alla crescita)



**Prevalenza di  
N- Fissazione**



**Canna da zucchero, erbe foraggio C4**  
in condizioni favorevoli al processo:

- alta temperatura
- elevata irradiazione
- produzione di essudati radicali

**Dominanza dell'  
Effetto Ormonale**



- **Piante C3**
- Piante in climi temperati
- Associazioni pianta-ospite poco specifiche

## Batteri diazotrofi liberi

• **autotrofi** (cianofite) → riduzione fotosintetica di  $N_2$

• **eterotrofi** (azospirillum) → processo non fotosintetico

inadeguata disponibilità di residui organici nel suolo

**limitata attività di azoto- fissazione**

Diverso **contributo** dei batteri diazotrofi nel processo di



## Fissazione simbiotica dell'azoto

Le specie **Rhizobium** in simbiosi con le leguminose sono i più importanti azotofissatori

**simbiosi altamente specifica:**

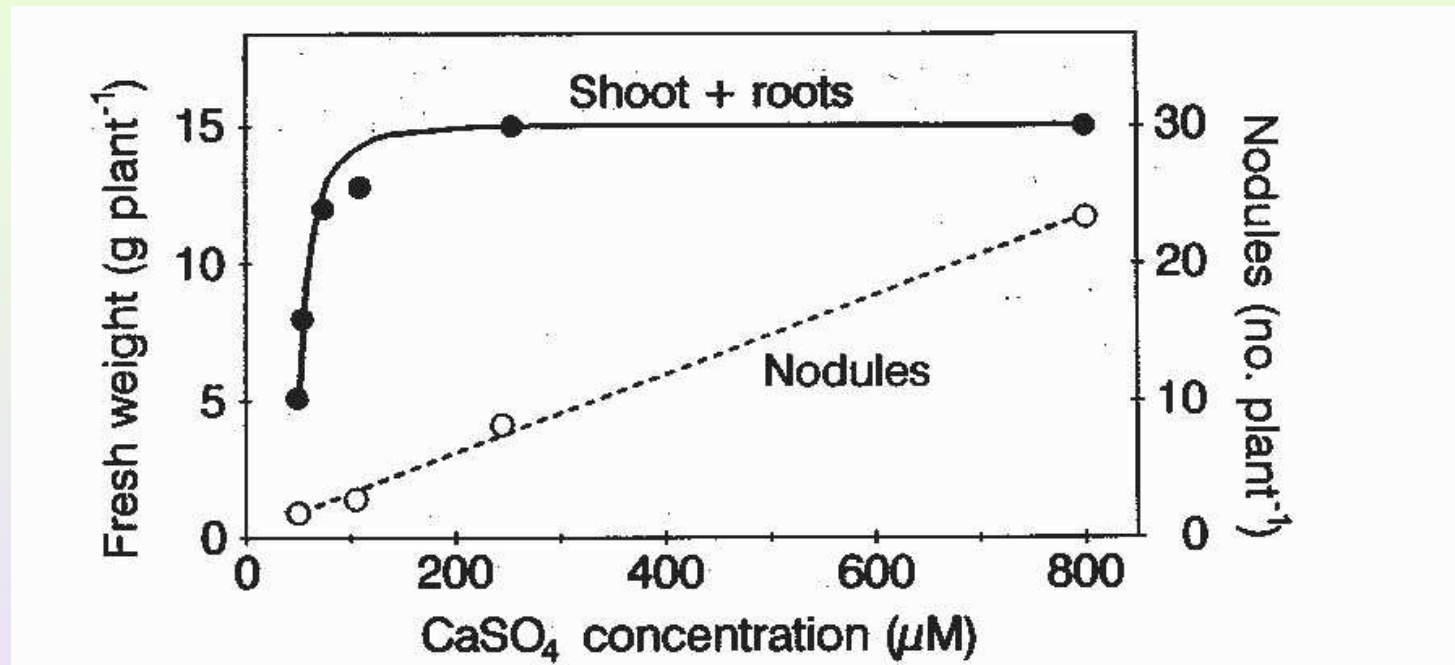
solo certi **ceppi** sono **compatibili** con una data leguminosa per formare **noduli funzionanti**

- Esempi di rapporto preferenziale tra specie di *Rhizobium* e piante ospiti.

<i>Specie di Rhizobium</i>	<i>Piante ospiti</i>
<i>R. leguminosarum</i>	Pisello, Fava, Lenticchia, Cece
<i>R. trifolii</i>	Trifoglio
<i>R. phaseoli</i>	Fagiolo
<i>R. meliloti</i>	Erba Medica, Fieno greco, Meliloto
<i>R. japonicum</i>	Soia
<i>R. lupini</i>	Lupino, Ginestrino

Il processo di **nodulazione** ( taglia e numero dei noduli)  
è favorito da:

1) Elevate concentrazioni di ioni  $\text{Ca}^{2+}$



(Lowther and Loreragan, 1968)

- favoriscono la produzione di peli radicali, siti di attacco
- stimolano la produzione di essudati radicali

2) **valori di pH vicini alla neutralità**

3) **Adeguate Rifornimento di P:**

infezione con micorizze → aumento nodulazione

La formazione dei noduli è regolata da :

- **Processo di autoregolazione o inibizione da feed-back**

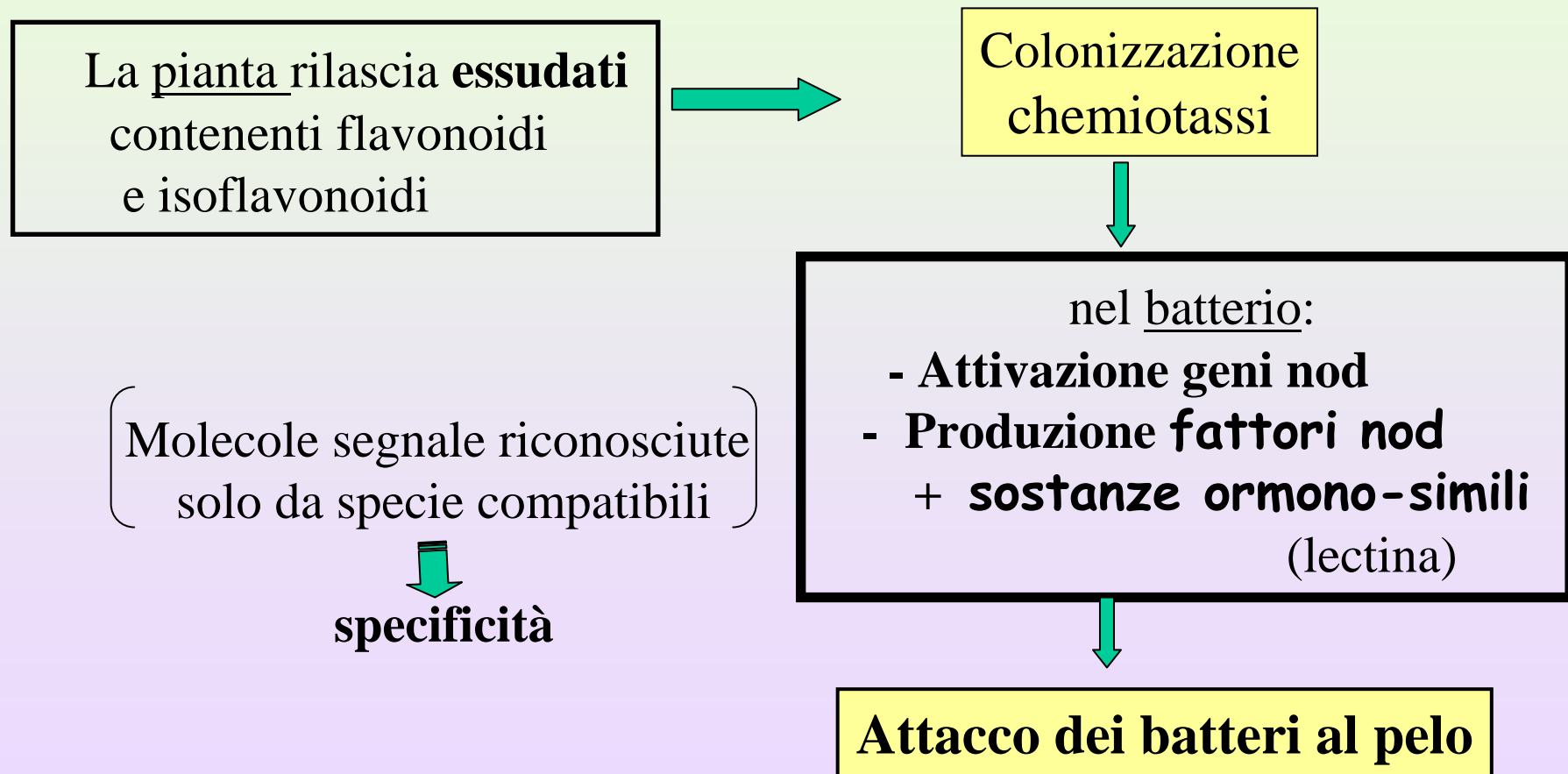
- **Qualità e quantità della fonte di N fornita:**

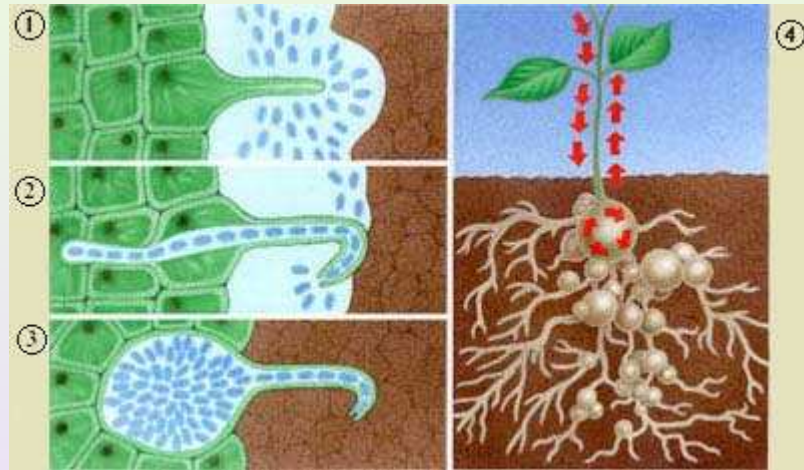
- il nitrato amplifica il segnale regolativo alle basse concentrazioni
- l'ammonio interferisce negativamente.

## Fasi dell' Infezione da Rhizobium

**I<sup>a</sup> Tappa** dell' infezione:

**Interazione rizobio- pianta ospite**





## II<sup>a</sup> Tappa : incurvamento del pelo radicale (IAA)

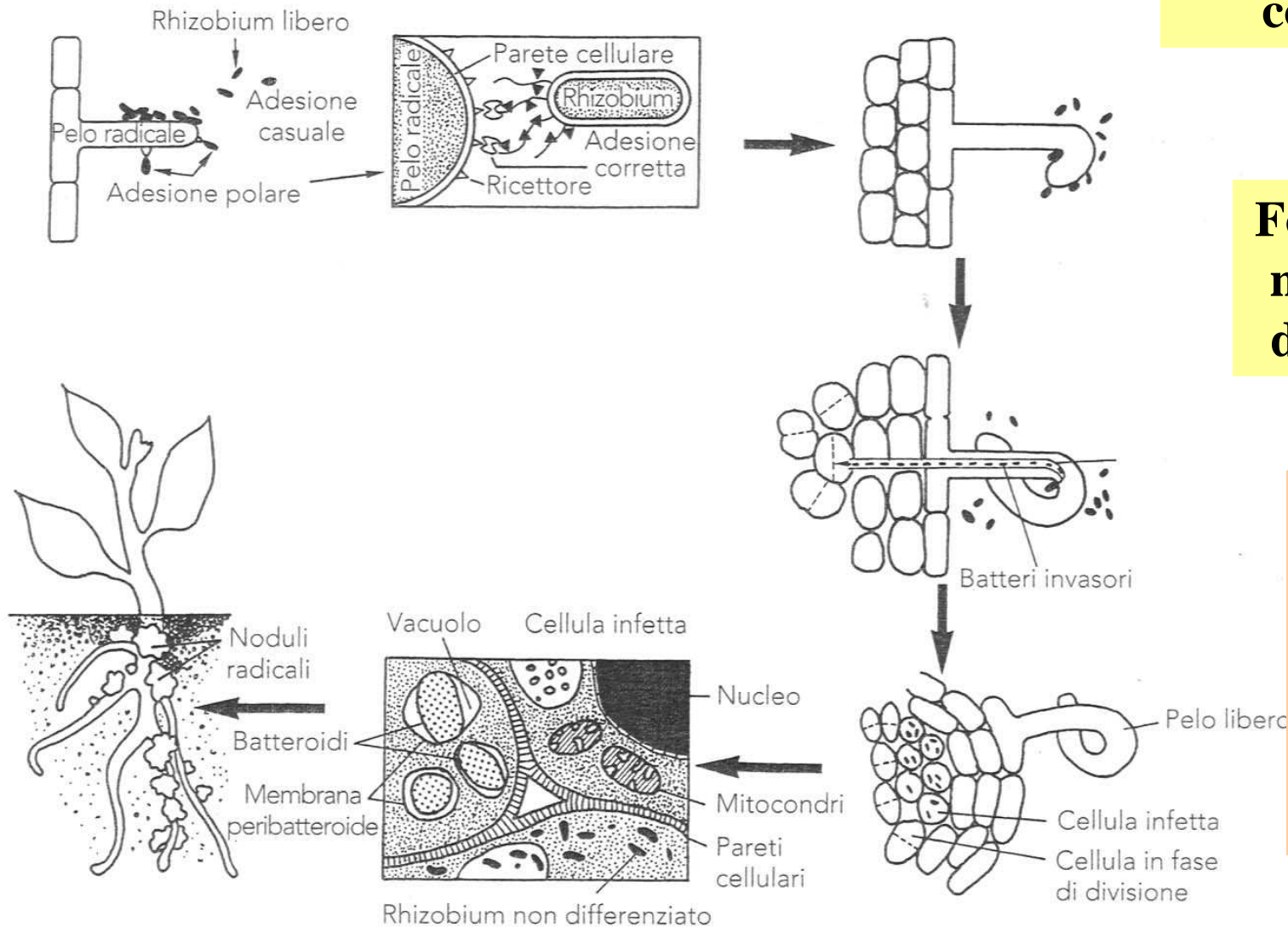


## III<sup>a</sup> Tappa penetrazione filo di infezione

Divisione cellule corticali

Formazione meristema del nodulo

Batteri →  
Batteroidi  
• Sintesi di  
Leg-Hb  
Nitrogenasi





Il processo di N-fissazione è attivo dopo 10-21 giorni dall'inizio dell'infezione → **fase di lag**

**3 condizioni essenziali per un processo efficiente:**

1) **Rifornimento adeguato di fotosintati ai batteroidi dei noduli**

quantità di C impiegato è variabile

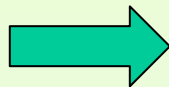
**C = 6-12g per g di N fissato**

{	36-39%	per la nodulazione
	50%	per l'attività di nitrogenasi
	16-22%	per l'assimilazione dell'N ridotto

2) **Mantenimento di basse concentrazioni di O<sub>2</sub> nei noduli**

3) **Rapida esportazione dell'N fissato : traslocazione nodulo-pianta**

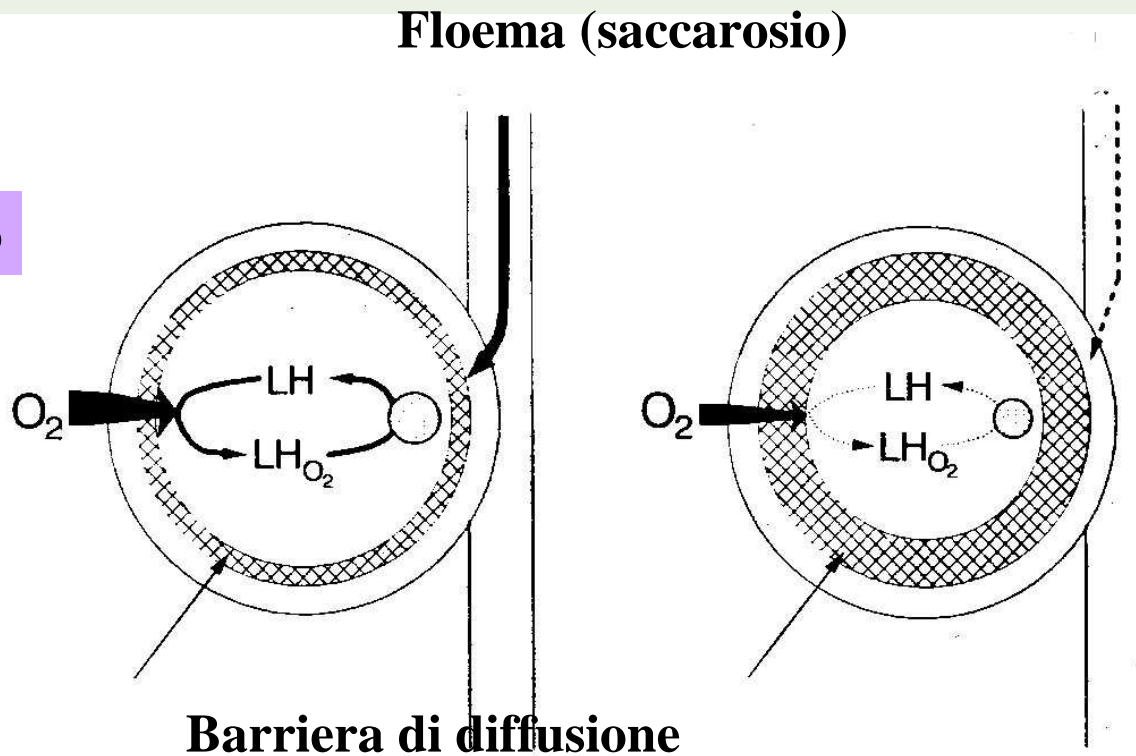
- Elevata domanda di energia (ATP)
- Protezione della nitrogenasi



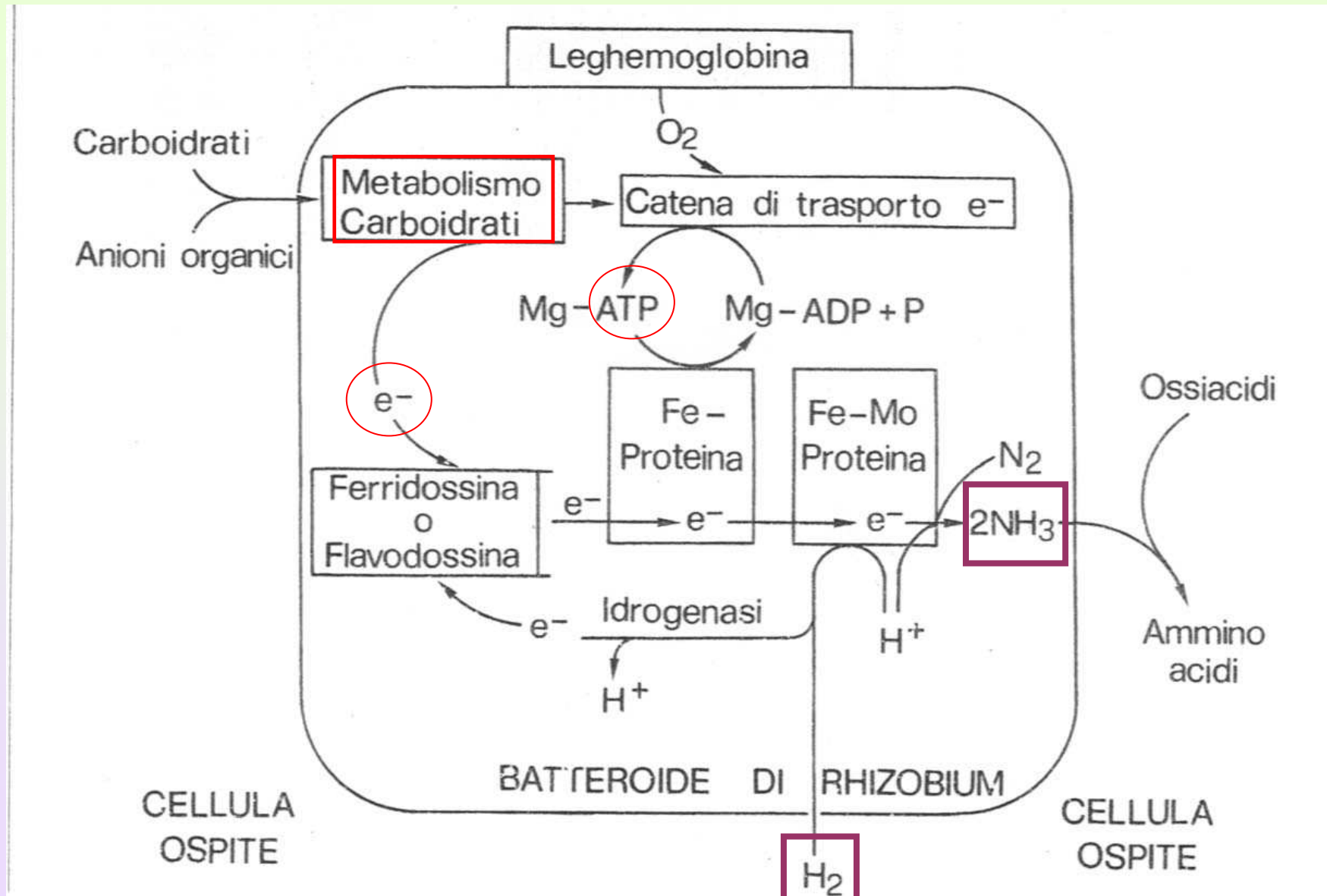
**Sistema di regolazione della  $pO_2$  a livello cellulare**

- 1) Esistenza di una barriera fisica
- 2) Leg- emoglobina

**Nodulo attivo**



**Nodulo non attivo**

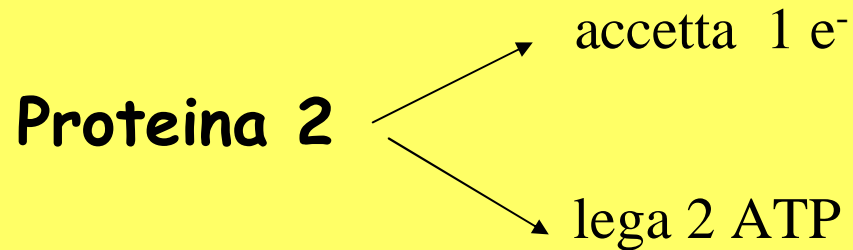


La **Nitrogenasi** è l'enzima responsabile del processo di N-fissazione

La **Mo- nitrogenasi** è la più studiata.

Costituita da **2 tipi di strutture proteiche**:

**Fe proteina** con un centro funzionale 4 Fe - 4 S

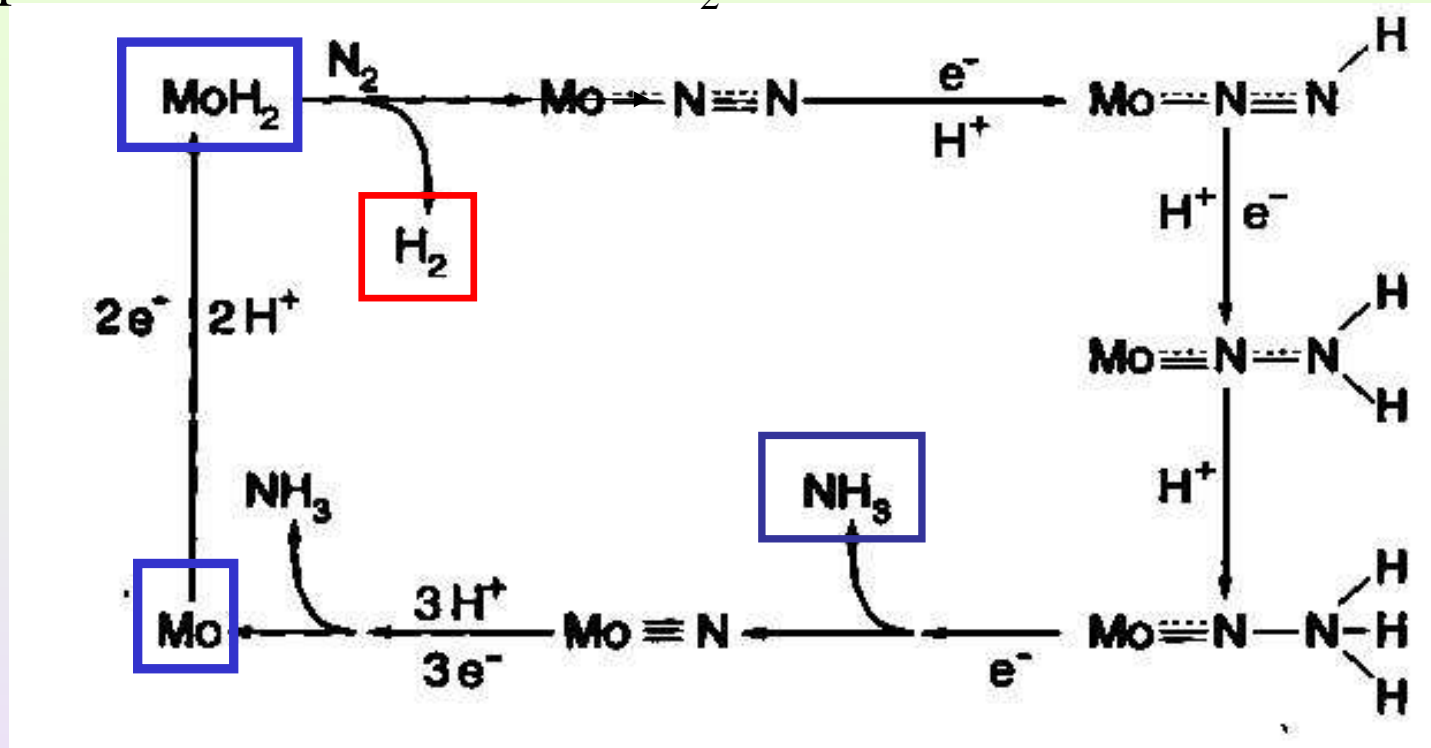


**Proteina 1** 2 unità  $\alpha$  2 unità  $\beta$

2 centri di reazione ( centro P )

1 Centro Fe - Mo- Co  $\longrightarrow$  sito di riduzione di N<sub>2</sub>

La protonazione del Mo è una tappa richiesta affinché l' $N_2$  si leghi alla proteina  $\longrightarrow$  rilascio di  $H_2$



### Stechiometria della reazione



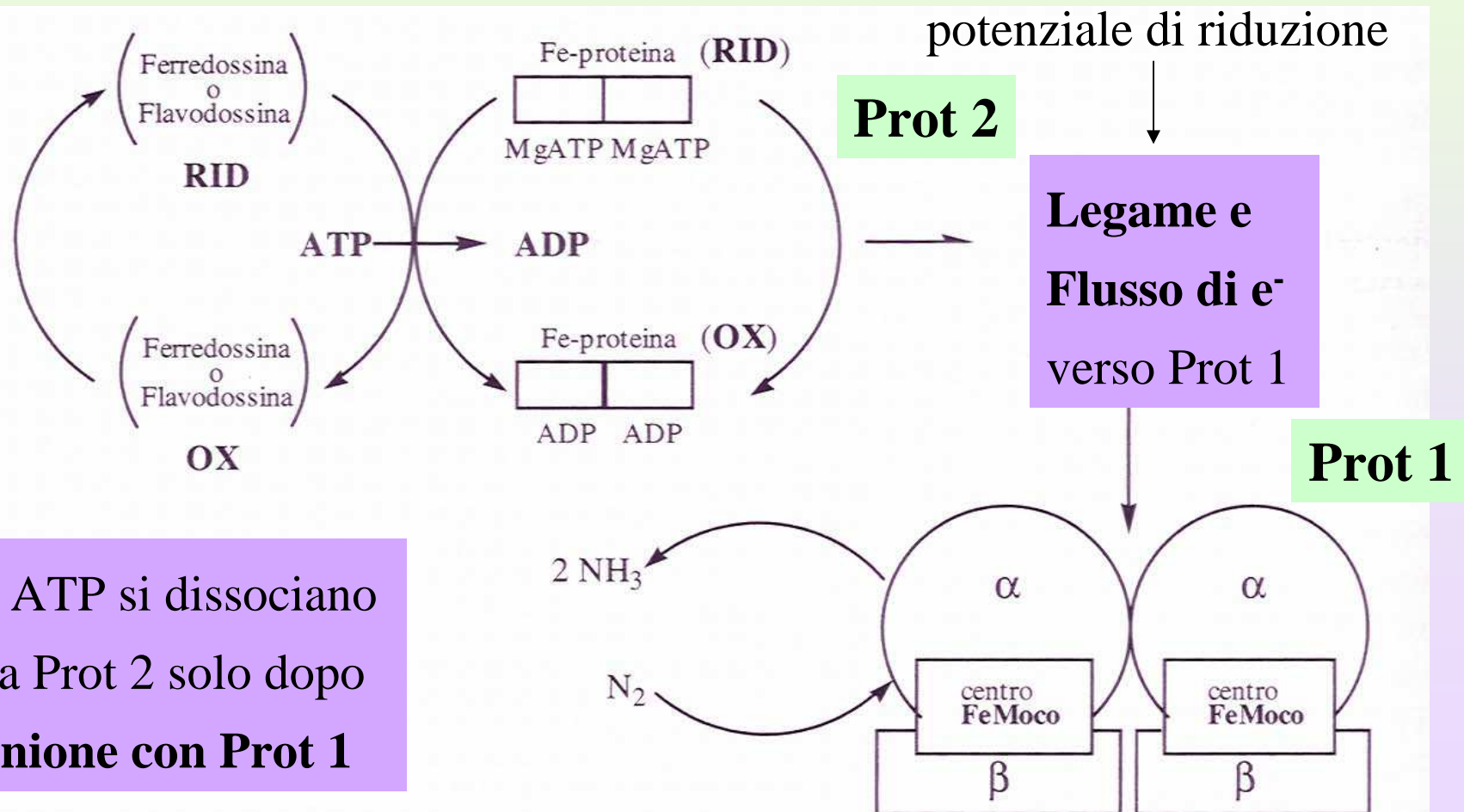
12 ATP per il sistema nitrogenasi + 4 ATP per formazione di  $H_2$

Gli e<sup>-</sup> fluiscono da **Prot 2** → **centro P** → **centro Fe- Mo- co**

Nella Prot 2 occorrono 2 ATP per il passaggio di 1 e<sup>-</sup>

Il processo è *esoergonico* ma il legame

ATP- Prot 2 → Mutamento conformazionale → abbassamento



- L' N fissato è rilasciato come  $\text{NH}_3$  dal batteroide al citosol per semplice **diffusione** attraverso la membrana peribatteroide
- passaggio rapido:  
elevata  $\text{NH}_3$  nel batteroide  $\longrightarrow$  inibizione della nitrogenasi
- nel citosol:  
assimilazione dell'  $\text{NH}_3$  via GS / GOGAT

