

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ





Среди органогенных элементов **азот** играет одну из важных ролей в жизни растений (белки, аминокислоты, НК, хлорофилл, алкалоиды и др.). В сухой массе растительных тканей его содержится всего 1-3%. Однако невысокая урожайность многих с.-х. культур чаще всего определяется недостатком именно азота.



Для формирования урожайности зерновых культур 2-3 т/га необходимо 150-200 кг азота в доступной для растений минеральной форме. При недостатке азота тормозится рост растений, ослабляется образование боковых побегов и кущение у злаков. Листья становятся бледно-зелеными. Их рост приостанавливается. Новые листья практически не растут, а если образуются, то очень мелкие, с тонкими пластинками. При остром голодании листья быстро желтеют и опадают.



Название «азот», что означает «безжизненный», предложил в 1787 году Антуан Лавуазье



В то время уже было известно, что азот не поддерживает ни горения, ни дыхания. Хотя впоследствии выяснилось, что азот, наоборот, крайне необходим для всех живых существ, название сохранилось во французском и русском языках.

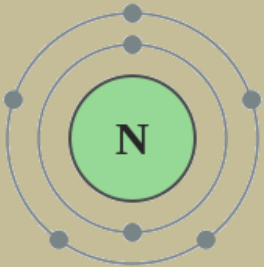
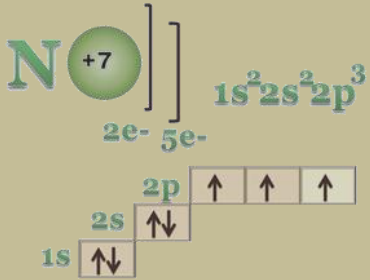




Азот **Nitrogenium** (N). Атомный номер – 7.

Двухатомный газ без цвета, вкуса и запаха (формула N₂).

Сам по себе атмосферный азот достаточно инертен, чтобы оказывать непосредственное влияние на организм человека и млекопитающих. Тем не менее, при повышенном давлении он вызывает наркоз, опьянение или удушье (при недостатке кислорода); при быстром снижении давления азот вызывает *кессонную болезнь*.



Состав воздуха





*Запасы азота огромны,
но они являются недоступными для растений.*

Доступный растениям азот может быть получен двумя способами: **химическим синтезом** и **биологическим путём**. Первый путь требует больших затрат энергии. Эти условия достигаются при разрядах молний, когда температура достигает 25000 °С и более.

Происходит образование различных оксидов азота. Они в виде азотной кислоты смешиваются с атмосферными осадками и попадают в почву. Фиксация при разрядах молний составляет 4-10 кг/га.



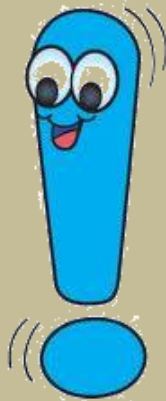
Основная часть молекулярного азота фиксируется биологическим путем.



Долгое время считалось, что связывать молекулярный азот могут только клубеньковые бактерии бобовых растений, цианобактерии и др. Сейчас известно, что этой способностью обладают многие другие организмы в воде и почве.



Только в 1838 году французский ученый Буссенго при выращивании на одной и той же почве клевера, гороха и пшеницы отметил, что бобовые растения лучше росли и больше накапливали азота за вегетационный период, чем пшеница. Содержание азота в бобовых растениях значительно превышало то количество, которое они могли получить из почвы и воды. Буссенго отметил их способность фиксировать азот из воздуха и использовать его для питания. Он считал, что этот процесс осуществляется зелеными листьями растения, и никакого предположения об участии в нем бактерий.



Биологическая азотфиксация – это поглощение микроорганизмами молекулярного азота из воздуха и включение его в состав своих органических соединений. Связываемый бактериями азот называется биологическим, а сами микроорганизмы – азотфиксирующими.

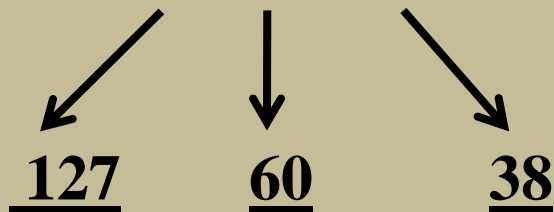


Фиксировать молекулярный азот могут только прокариоты. За счет их деятельности в почву ежегодно поступает 60-75% азота от общего его содержания в почве.

Механизм биологической азотфиксации

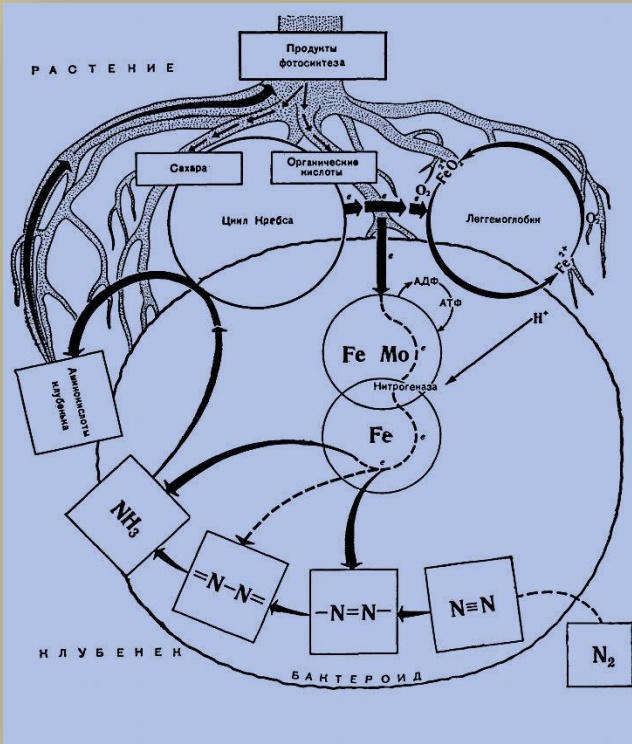
В н.в. общепризнанной является гипотеза С. Н. Виноградского.

Молекула азота характеризуется очень прочной тройной связью. Для её разрыва необходимо затратить 225 ккал



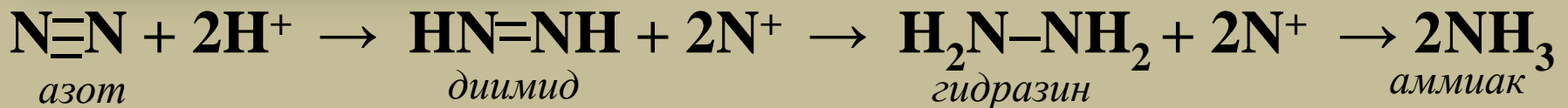


Фиксация азота атмосферы представляет собой восстановительный процесс, осуществляемый ферментным комплексом *нитрогеназой* (является переносчиком водорода). Активный центр нитрогеназы содержит два компонента:



- 1) состоит из белка, в состав которого входит Mo, P, Fe.
- 2) состоит из белка, в состав которого входит Fe, S.

Восстановление молекулярного азота осуществляется вначале до аммиака в три последовательные стадии. Сначала молекула азота восстанавливается в *диимид*, затем в *гидразин* и, наконец, в *аммиак*:





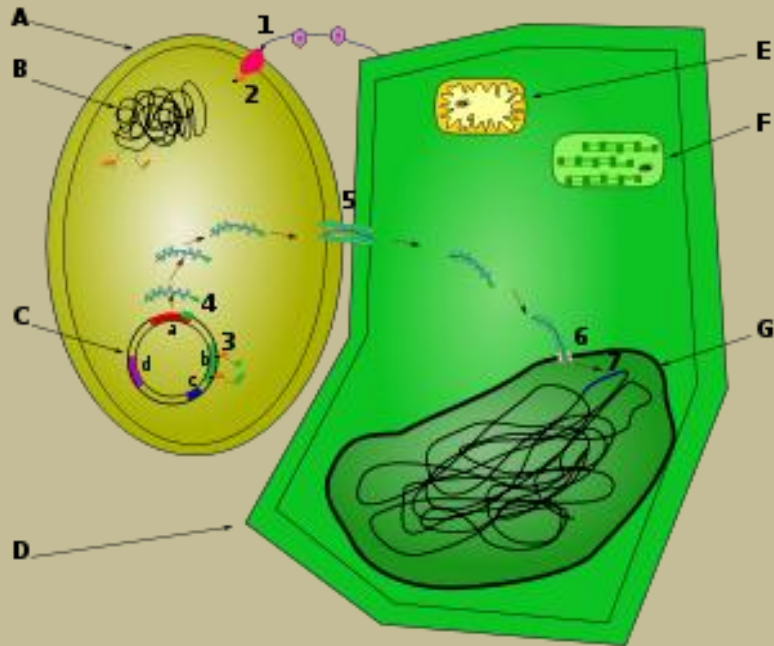
ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА



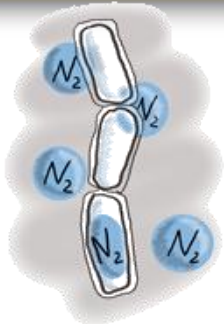
Аммиак, образовавшийся в процессе фиксации азота, связывается с кетокислотами, что приводит к синтезу *аминокислот*.

Синтез нитрогеназного комплекса у микроорганизмов кодируется 17 генами, которые входят в состав хромосомы=нуклеоид (клебсиелла) или существуют в форме огромной мегаплазмиды (С ризобиум). Бактериальные гены, вовлеченные в процесс азотфиксации, обозначаются индексами *nif* и *fix*.

Путем генной инженерии пытаются передать эти гены другим растениям



Азотфиксирующие микроорганизмы (дiazотрофы) делят на 3 группы:



1. Свободноживущие;
2. Симбиотические;
3. Ассоциативные.

Свободноживущие проживают в почве самостоятельно, используют азот для построения своего органического вещества. После отмирания и минерализации их тел, в почву выделяется аммиак.

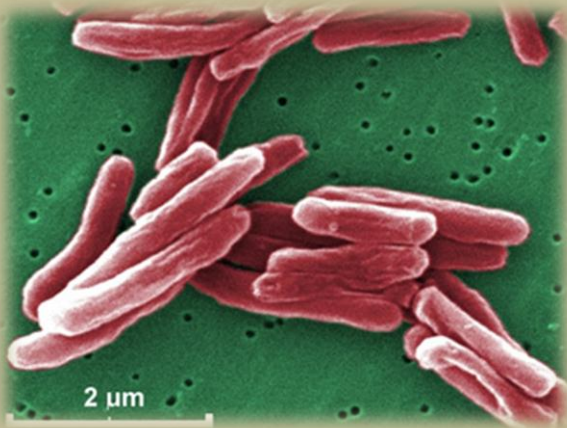
Анаэробные свободноживущие азотфиксаторы.

***Clostridium pasteurianum** открыт в 1893 году Виноградским, является маслянокислой бациллой, имеет максимальную азотфиксирующую способность из всех анаэробов (10-12 мг N/1 г. орг. в-ва).*



Обитает во всех типах почв, но предпочитает нейтральные. Способность к фиксации атмосферного азота отмечается и у других представителей рода *Clostridium* (более 90 видов).

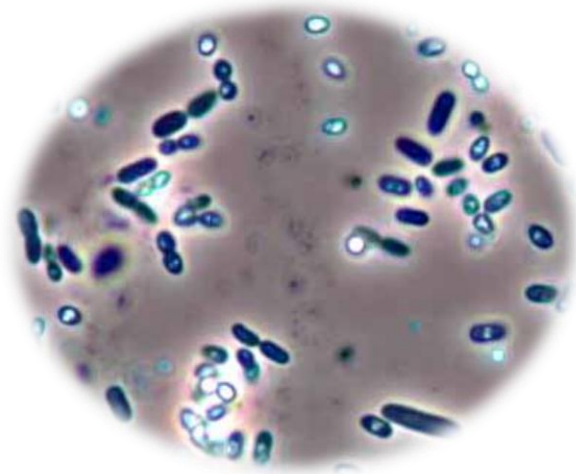
К анаэробам также относятся *микобактерии* и *коринеформные бактерии*. У них азотфиксация связана с хемосинтезом. А также *зеленые и пурпурные серные бактерии*, осуществляющие фотосинтез.





Аэробные свободноживущие азотфиксаторы.

Род *Azotobacter* является самым распространенным, включает более десяти видов. *Azotobacter chroococcum* (коричневые колонии) открыт в 1901 году Бейеринком.



Является индикатором почвенного плодородия. Требователен к наличию органических и минеральных веществ (P, Mo, B, Fe, Ca), нуждается в кислороде, предпочитает нейтральную pH 7,2-8, температуру 25-28°C, влажность 60-80%

ПВ. Азотфиксирующая способность 20-25 мг N/1 г. орг. в-ва.

Ауксоавтотроф. Из него готовят бактериальное удобрение.

Azotobacter agilis (бесцветные колонии).

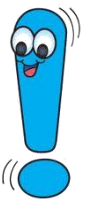
Azotobacter vinelandii (зеленые колонии).



Род *Beijerinckia* выделен из кислых почв тропической зоны (opt рН 4,5). Образует слизистые колонии красно-коричневого цвета. По внешнему виду похож на *Azotobacter*. Обладает кальциефобностью (тормозит его развитие), менее требователен к Р, Мо. *Азотфиксирующая способность 18-20 мг N/1 г. орг. в-ва.*

Род *Derxia* также встречается в южных почвах, внешне похож на *Azotobacter*. Образует колонии желто-коричневого цвета. *Азотфиксирующая способность 12-15 мг N/1 г. орг. в-ва.*

Род *Azomonas* встречается в тропических почвах. Колонии желто-зеленые, флюорисцирующие.



Свободноживущие аэробные азотфиксаторы способны фиксировать за вегетационный период 50-100 кг/га азота.

Цианобактерии могут фиксировать азот как свободноживущие и симбиотические микроорганизмы



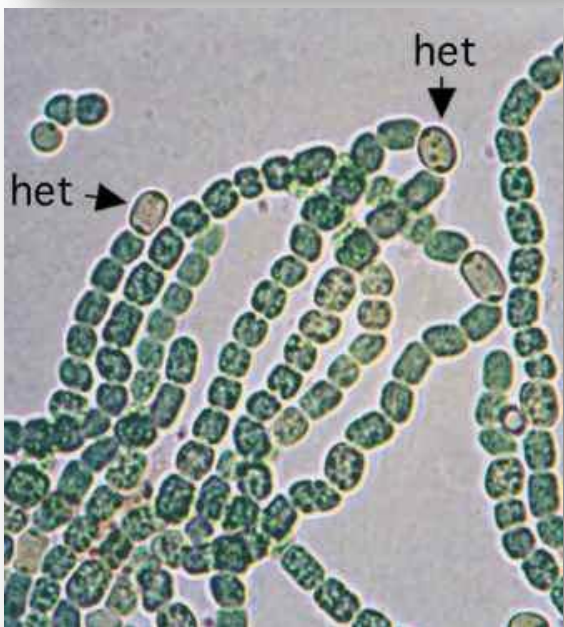
Как *свободноживущие* широко распространены в почве, вызывают «цветение» воды и почв.

Гр-, любят высокую влажность, мезофилы, фотолитоавтотрофы=фотосинтез, аэробы.



Фиксируют за вегетационный период 50-70 кг/га азота.

Имеют большое значение при возделывании риса. *Альголизация* – прием использования цианобактерий как бактериальных удобрений (обрабатывают семена риса). При этом нельзя вносить N_{уд}, но хорошо сочетается с P_{уд}.



Носток



Симбиотические азотфиксаторы фиксируют азот атмосферы, проживая в симбиозе

Цианобактерии (экзосимбиоз) могут вступать в симбиоз:

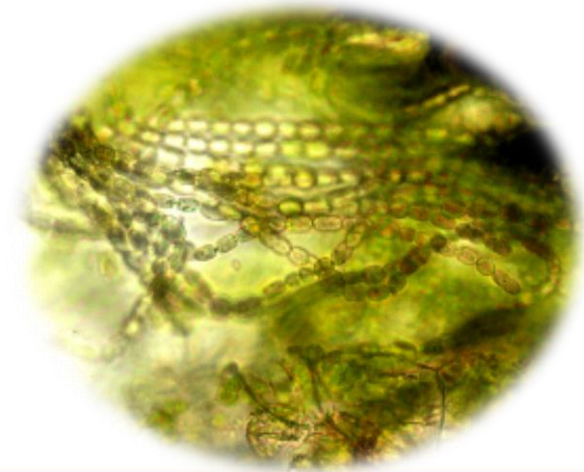
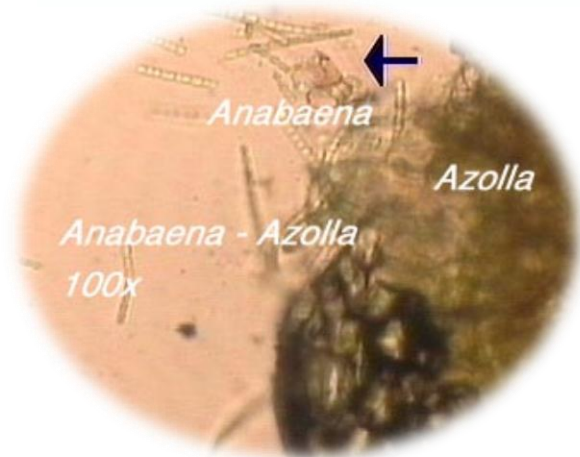
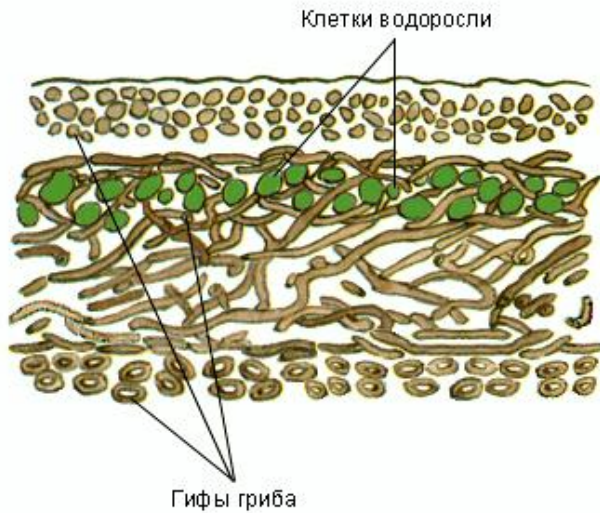
➤ с грибами, образуя лишайники.

Фиксируют около 50 кг/га азота.

➤ с водными папоротниками (азолла).

Характерна для Азии, Вьетнама.

Фиксируют около 100-120 кг/га азота.

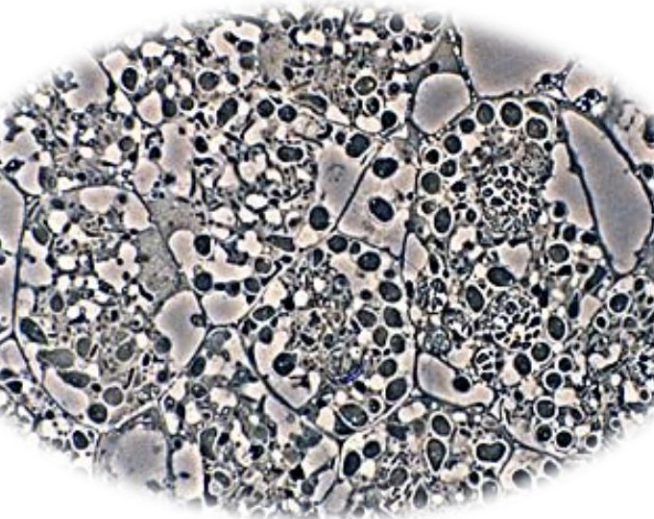




Актиномицеты *Frankia* франки (эндосимбиоз)
Фиксируют за вегетационный период 70-350 кг/га азота.
В Западной Европе используют для обработки семян и корней.



Образуют клубеньки на корнях небобовых, чаще древесных культур, – актиноризу (ольха, лох, облепиха, осоковые, ивовые).



Elaeagnus commutata
Лох серебристый

Клубеньковые бактерии *Rhizobium* (ризобии) вступают в эндосимбиоз с корневой системой бобовых растений.



М. С. Воронин



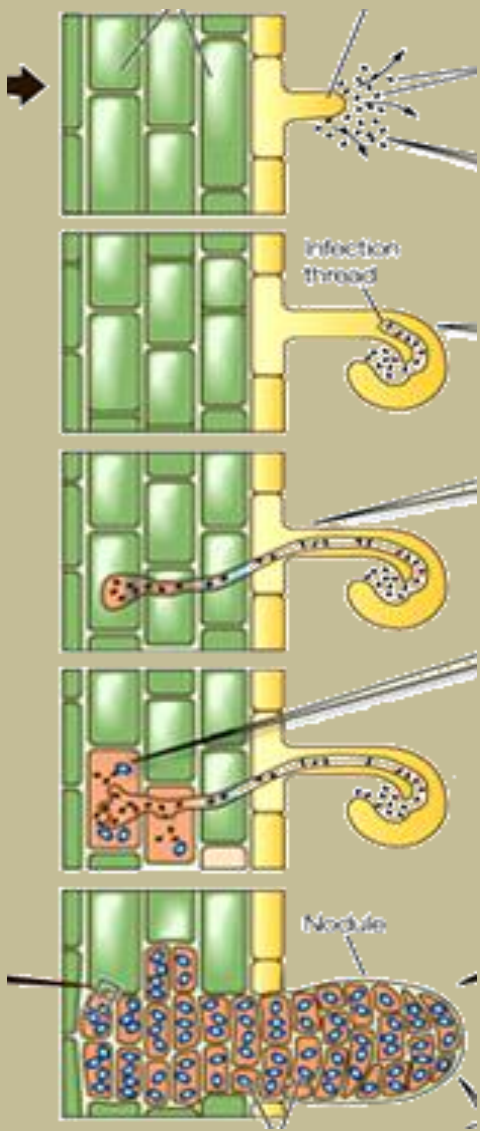
Мартин Бейеринк



Особенности азотного питания бобовых растений открыл в 1866 году русский ученый М. С. Воронин. Его внимание привлекли особые наросты на корнях – клубеньки. Рассмотрев их под микроскопом, он обнаружил большое количество бактерий, которые как выяснилось, и обеспечивают бобовые растения азотом за счет усвоения его из воздуха.

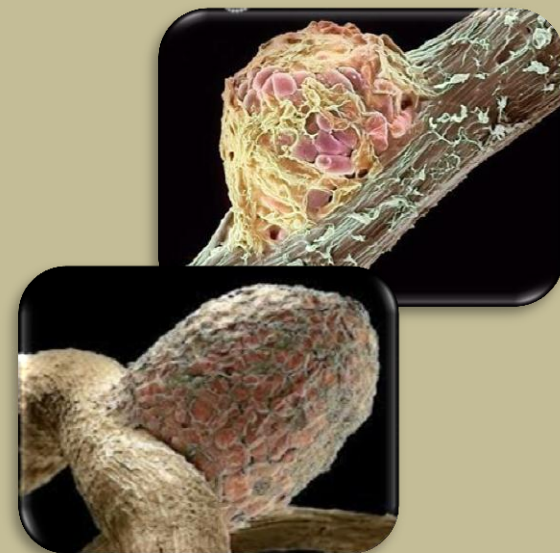
Впервые выделил в чистую культуру из гороха в 1888 году голландец Мартин Бейеринк.

***Rhizobium = корень+жизнь
(жизнь на корнях)***



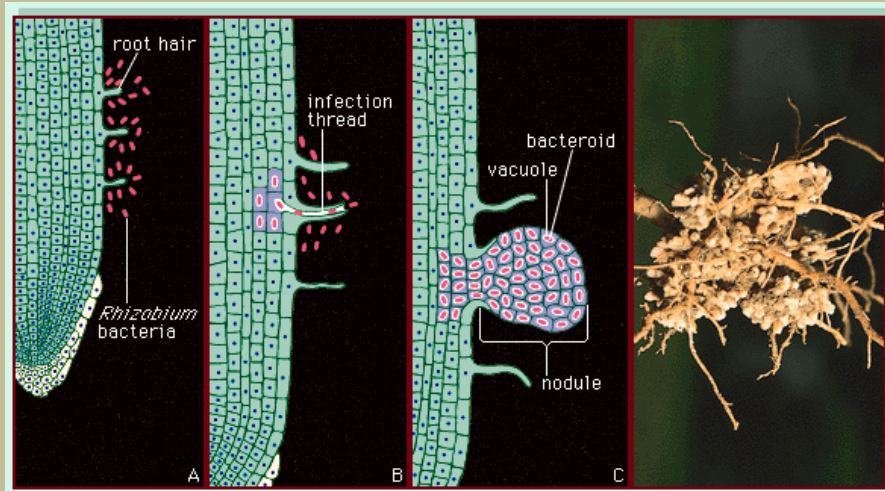
Клубеньковые бактерии проникают в корни растений из почвы через молодые корневые волоски. Их привлекают корневые выделения бобовых культур.

Растут в форме *инфекционной нити* в течение 1-2 суток. Инфекционная нить разветвляется, пронизывая клетки растений. В одном корневом волоске формируется одна нить. Инфекционная нить представляет собой массу бактерий, заключенную в слизь. Бактерии выходят из нити в цитоплазму растительных клеток, продолжают размножаться, а клетки растений начинают усиленно делиться. Так формируется клубенек.



Клубеньковые бактерии обладают следующими свойствами:

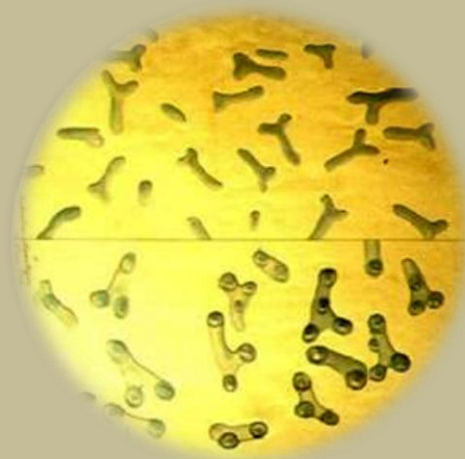
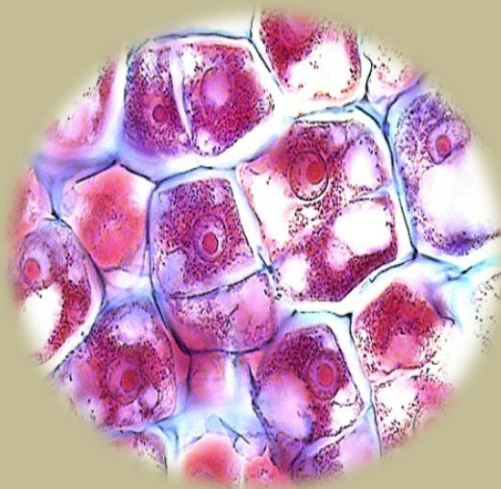
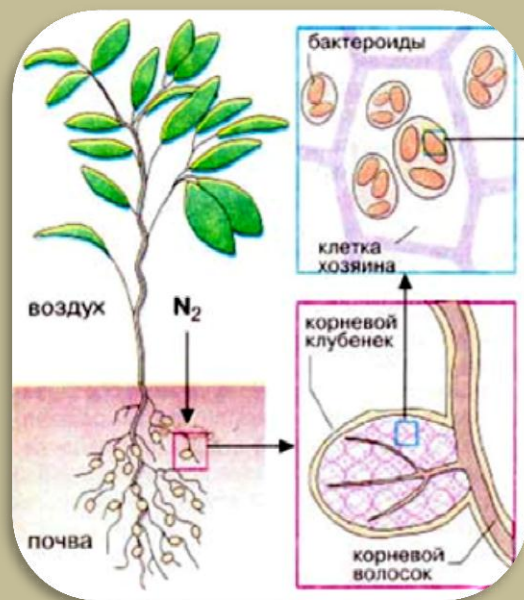
- ✓ **Специфичность**, т.е. избирательность. Не только видовая, но и сортовая. Растение, зараженное неспецифичной расой, препятствует проникновению в корень свойственной ему культуры клубеньковых бактерий.
- ✓ **Вирулентность**, т.е. способность заражать и образовывать клубеньки на корне.



✓ **Активность**, т.е. способность фиксации азота из атмосферы. В почве могут быть активные и неактивные штаммы. Неактивные образуют клубеньки, но азотфиксации в них не происходит.

Признаки активных рас:

- Клубеньки более крупные
- Много клубеньков на главном корне, на боковых мало;
- Окрашены в розовый цвет (леггемоглобин);
- В бактериоидах не накапливается гликоген и др.



Оптимальные условия для клубеньковых бактерий:



1. Кислотность среды рН 6,5-7,5;
2. Температура 24-26 °С;
3. Влажность 40-60% ПВ;
4. Фосфор и калий усиливает азот фиксацию;
5. Небольшое количество минеральных азотных удобрений стимулируют, а повышенные дозы подавляют азотфиксацию.





Ассоциативные азотфиксаторы – это группа микроорганизмов, занимающих промежуточное положение между свободноживущими и симбиотическими.

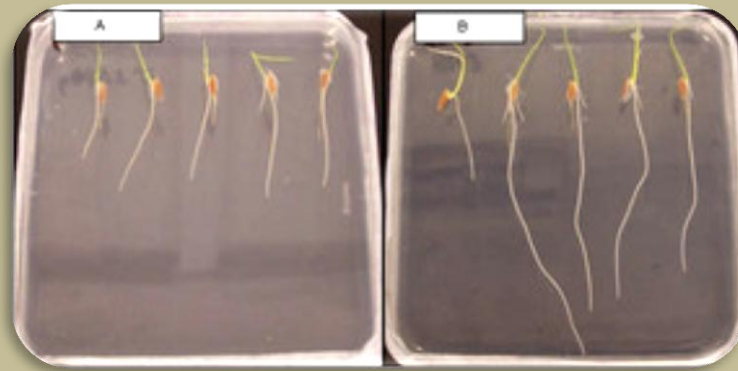
К ним относятся МО, которые обитают в прикорневой зоне почвы, на поверхности корней и надземной части растений. Могут проникать внутрь растений. Рост и развитие ассоциативных азотфиксаторов связаны с поступлением к ним от растений легкодоступных источников углерода и энергии в виде корневых выделений, а также растительных остатков.



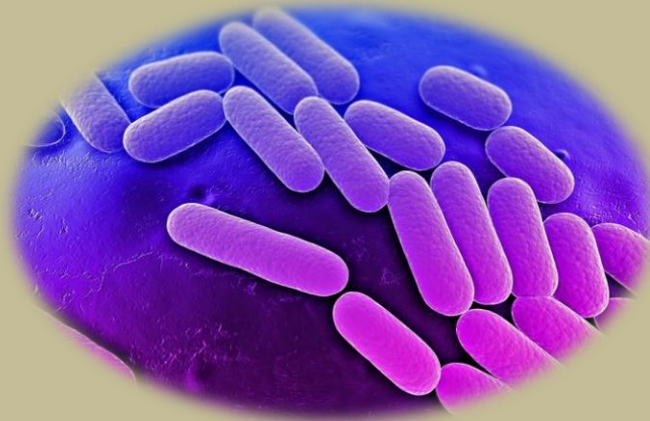
Наиболее распространенным является

Азоспирилла *Azospirillum*

Гр-, крупная, извитая, подвижная, гетеротроф, аэроб (микроаэрофил).



Впервые выделена из ризосферы растений с C4 типом фотосинтеза (н-р, кукуруза, просо, сорго, рис). Снабжает растение на 45% азотом. Из нее готовят бактериальное удобрение *Азобактерин* – кормовые травы.



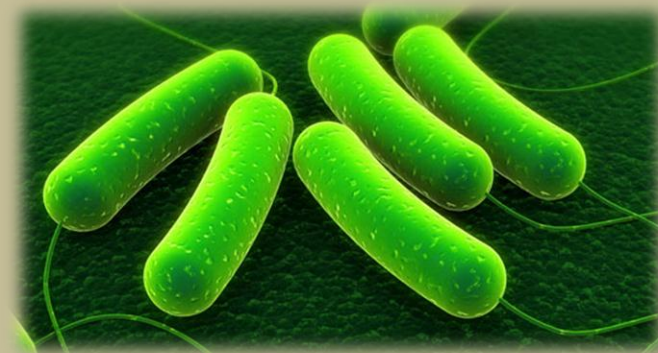
Клебсиелла *Klebsiella* в большом количестве встречается в лесных подзолистых почвах, выносит кислую среду. В зоне умеренного климата обитают и под травянистой растительностью. Это гр- палочки, неспоровые, подвижные, факультативные анаэробы.



В практике используется вид *Klebsiella planticola*, из которого готовят бактериальное удобрение *Ризобактерин* (биоплант).

Флавобактерии *Flavobacterium* гр- палочки, неспоровые, подвижные, факультативные анаэробы. Готовят бактериальное удобрение *Флавобактерин*.

Эрвиния *Erwinia herbicola* встречается на поверхности растений (стебли, листья).



Биологический азот в решении проблемы кормового и пищевого белка



Уровень обеспеченности кормовых рационов перевариваемым протеином не превышает 90% от потребности. В лучшем случае его приходилось 75г на одну кормовую единицу, а чаще и того меньше.

Недостаток одного грамма белка в корме приводит к перерасходу кормов на 1,5-2%. Так на 1кг привеса крупного рогатого скота в среднем в Беларуси в 2003 г. Затрачено 13,8 к.ед. (норматив 7,5), свиней – 6 (норматив 4) и на 1 л молока – 1,4 к.ед. (норматив 1,1). Из-за несбалансированности концентратов по перевариваемому протеину и незаменимым аминокислотам в республике теряется более 600 тыс. тонн зернофуража.

Одним из главных источников белка является биологический азот, в первую очередь бобовых культур.

Проблема сохранения и расширенного



воспроизводства естественного плодородия почвы

Наиболее экономичным путем формирования плодородия почв, снижения расходования минеральных азотных удобрений является использование биологического азота. Являясь продуктом ассимиляции молекулярного азота почвенными микроорганизмами, он составляет основу плодородия почв.

Поступление его в почву в основном осуществляется благодаря жизнедеятельности азотфиксирующих микроорганизмов (симбиотических, свободноживущих, ассоциативных бактерий и синезеленых водорослей). Удельный вес биологического азота от общего содержания его в бобовых растениях может достигать при благоприятных условиях 75-85%, и даже больше – до 95%.



При благоприятных условиях он способен накапливать в почве 150—200 кг/га. Исследования показывают, что в восстановлении почвенного плодородия доля биологического азота от общего поступления может составлять до 45-50%.

Использование на зелёное удобрение бобовых культур равнозначно внесению 35-40т/га навоза, не считая затрат на перевозку последнего от ферм и комплексов на поля. Запаханная их зелёная масса разлагается постепенно, и в растениях не накапливается свободный азот, что часто наблюдается при избыточном минеральном азотном питании растений.

Проблема энерго - и ресурсосбережения



Применение биологического азота обеспечивает условие энергосберегающих технологий в растениеводстве – экономию не возобновляемой энергии на единицу продукции и снижение её себестоимости.

Химический синтез азотных удобрений – очень энергоёмкий процесс. На него затрачивается до 25-30% энергии, используемой на с/х производство. Синтез требует температуры около 5000С и давления около 350 атм. Биологическая азотфиксация проходит в самых обычных условиях.



Биологический азот намного дешевле минерального. Одна тонна белка, полученного за счет фиксированного азота воздуха клубеньковыми бактериями и бобовыми растениями, приблизительно в 8 раз дешевле, чем за счет использования минерального азота.

Стоимость белка бобовых в 2-3 раза ниже, чем белка злаков. Себестоимость перевариваемого протеина зерна люпина составляет 156 у.ед., а например, гороха – 260, сена бобовых трав – 300, люцерновой муки – 360 у.ед. На выращивание зелёной массы люпина требуется в 4 раза меньше затрат, чем на выращивание кукурузы, подсолнечника и других небобовых культур, а с учётом его повышенной белковости энергоёмкость 1ц люпинового силоса в 10 раз меньше кукурузного.

Экологическая проблема



В последние 15-20 лет отмечают ещё одну важную роль биологического азота – экологическую:

✓Из внесенного азота растениями усваивается не более 50-60 %. Значительная часть азотсодержащих соединений вымывается и поступает в водоемы. Поэтому крупномасштабное применение удобрений связано с загрязнением окружающей среды, возникновению проблем со здоровьем у животных и человека. Внесение минерального азота может отрицательно влиять на почвенный поглощающий комплекс.

✓Снижает в севообороте применение средств химзащиты растений



✓ Позволяет применять почвозащитные способы безплужной обработки почвы после выращивания бобовых культур

✓ Благодаря уникальной способности фиксировать клубеньковыми бактериями в симбиозе с бобовыми культурами атмосферный азот, без минеральных азотных удобрений не только формируется высокобелковый, экологически чистый урожай, но и оставляет в почве значительные количества азота, используемого последующей культурой, делая безопасным в экологическом отношении два поля севооборота.



Рострегулирующая роль

Роль азотфиксирующих бактерий не ограничивается только фиксацией атмосферного азота, они еще и синтезируют физиологически активные вещества, стимулирующие рост и развитие растения-хозяина (ауксины, гиббереллины, витамины, антибиотики).

Микроорганизмы участвуют в сложных биохимических процессах, протекающих в почве, повышают коэффициент использования минеральных удобрений, положительно влияют на репродуктивные органы растений.

Антагонистические свойства азотфиксаторов



Установлено, что инокуляция семян азотфиксирующими бактериями приводит к снижению поражаемости растений грибными и бактериальными болезнями. Установлено, что клубеньковые бактерии люпина и фасоли проявляют антагонистические свойства к возбудителю корневой гнили. Инокуляция клубеньковыми бактериями уменьшает число поражённых растений на 10,3%. Клубеньковым бактериям принадлежит большая роль в уменьшении количества микроорганизмов на корнях и регулировании взаимоотношений между растением и микрофлорой.

Спасибо за внимание!