

### Rezerwy azotu

Atmosfera –  $N_2$  –  $3,9 \times 10^{15}$  ton

Ocean

- biomasa –  $5,2 \times 10^8$  ton
- rozpuszczalna partykularna materia organiczna –  $3 \times 10^{11}$  ton

Sole nieorganiczne

- azotany, azotyny, amoniak –  $6,9 \times 10^{11}$  ton
- rozpuszczony  $N_2$  –  $2 \times 10^{13}$  ton

Lądy

- organizmy żywe –  $2,5 \times 10^{10}$
- materia organiczna –  $1,1 \times 10^{11}$
- skorupa ziemna –  $7,7 \times 10^{14}$

### Azot związany rocznie

Przemiany różnych form azotu w jego obiegu są rezultatem głównie procesów mikrobiologicznych:

Azot związany rocznie:

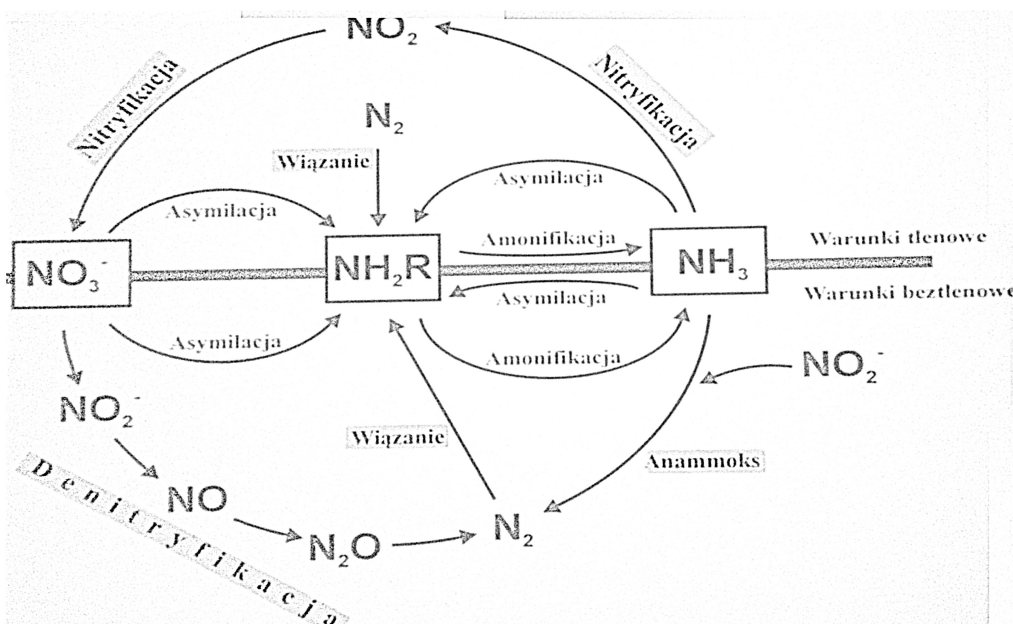
- biologiczne wiązanie azotu:
  - lądy 140 mln ton
  - oceany 100 mln ton = 240 mln ton
- przemysł nawozów azotowych 36 mln ton
- wyładowania atmosferyczne 8 mln ton

### Znaczenie

**Reakcja Haber-Bosh'a** – wykorzystywana do produkcji amoniaku na skalę przemysłową zachodzi w temperaturze około 450 st. C i ciśnieniu ok. 500 atm. Wymaga stosowania Fe jako katalizatora, i ogromnego nakładu energii.

**Obieg azotu** to cykliczne wzajemne przemiany azotu i jego związków, przeprowadzane przez organizmy żywe i procesy niebiologiczne.

Azot gazowy jest najbardziej stabilną formą azotu i stanowi zbiornik tego pierwiastka na Ziemi. Tylko nieliczne prokariota potrafią zredukować azot atm. w procesie zwanym wiązaniem azotu (asymilacją) i włączać go w swoją biomasę.



- procesami biologicznymi w których powstaje  $N_2$  jest denitryfikacja i reakcja anammox;
- po rozłożeniu związków organicznych zawierających azot dochodzi do uwolnienia amoniaku (amonifikacja);
- amoniak jest bdb źródłem azotu dla wszystkich organizmów prokariotycznych;
- amoniak jest utleniany przez bakterie nitryfikacyjne (chemolitoautotrofy) do  $NO_2^-$ , a azotyn do azotan;
- azotan może być wykorzystywany jako źródło azotu zarówno przez rośliny jak i przez prokariota mające reduktazę azotanową asymilacyjną;
- w warunkach beztlenowych azotan może być wykorzystywany jako końcowy akceptor elektronów (oddychanie azotanowe);
- denitryfikacja to oddychanie azotanowe w którym powstają produkty gazowe –  $N_2O$  i  $N_2$ .

### Reakcje mikrobiologiczne

Pięć podstawowych reakcji to transformacja jednej formy azotu w drugą:

1. **wiązanie**  $N_2$  - konwersja do amoniaku przy udziale kompleksu enzymatycznego zwanego nitrogenazą;
2. **nitryfikacja** – biologiczna transformacja jonów amonowych do azotynów i/lub azotanów;
3. **denitryfikacja** – biologiczna redukcja azotanów do azotu cząsteczkowego;
4. **amonifikacja** – uwalnianie amoniaku ze struktur organicznych głównie w procesach degradacji białek;
5. **asymilacja** – włączanie amoniaku do struktur azotu organicznego i budowy biomasy;
6. **anammox** – to utlenianie amoniaku przy pomocy  $NO_2^-$  do  $N_2$ .

### Reakcje niebiologiczne

pozostałe procesy niebiologiczne dominujące w obiegu azotu to:

- fotolityczna konwersja  $NO_2^-$  do  $N_2O$  do  $N_2$ ;
- tworzenie  $NO$  i następnie  $NO_2^-$  w czasie wyładowań atmosferycznych z  $N_2$ .

Organizmy wiążące  $N_2$  (diazotrofy) są reprezentantami różnych grup fizjologicznych prokariota, również bakterie i sinice.

### Bakterie wiążące azot atmosferyczny

1. bakterie wolnożyjące – tlenowe, beztlenowe i fakultatywnie beztlenowe
2. bakterie żyjące w symbiozie z roślinami motylkowymi i niemotylkowymi

- Wolnożyjące bakterie wiążące N<sub>2</sub>
  - 1. Tlenowe i mikroaerofilne
    - a. *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*, *Nocardia*, *Pseudomonas*
    - b. Cyjanobakterie →
    - c. *Methylobacterium*, *Methylomonas*, *Methylosinus*, *Methylococcus*,
  - 2. Fakultatywnie beztlenowe
    - a. *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *E. intermedia*, *C. freundii*, *C. intermedius*, *K. pneumoniae*, *K. aerogenes*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. herbicola*)
  - 3. Beztlenowce
    - a. Fototrofy
      - i. *Chromatiaceae*: *C. vinosum*,
      - ii. *Chlorobiaceae*: *C. limicola*
      - iii. *Rhodospirillaceae*: *R. rubrum*, *R. sphaeroides*, *R. capsulata*, *R. vanielli*, *Rhodocyclus*
    - b. Chemolitotrofy
      - i. *Methanobacterium*, *Methanococcus*, *Methanosarcina*
    - c. Heterotrofy:
      - i. *Bacillus*: *B. polymyxa*, *B. macerans*
      - ii. *Clostridium*: *C. butyricum*, *C. butylicum*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum*, *C. madisonii*, *C. kluyverii*, *C. felsineum*, *C. cactoacetophilum*, *C. pectinovorum*
      - iii. BRS: *Desulfovibrio* (*D. desulfuricans*, *D. gigas*), *Desulfotomaculum* (*D. ruminis*, *D. orientis*)

### Sinice wiążące azot atmosferyczny

#### Sinice tworzące heterocysty

1. *Nostocaceae*
  - *Anabaena*
  - Anabenopsis*
  - Aularica*
  - Cylindrospermum*
  - ⇨ *Nostoc*
2. *Scytonemataceae*
  - ⇨ *Scytonema*
  - Tolypotrix*
3. *Rivulariaceae*
  - ⇨ *Calothrix*
  - Gloeotrichia*
4. *Stigonemataceae*
  - Fischerella*
  - Hapatosiphon*
  - Mastigocladus*
  - ⇨ *Stigonema*
  - Westiellopsis*

#### Sinice nie tworzące heterocyst

1. *Chroococcaceae*
  - Synechococcus*
  - Aphanothecae*
  - Gloeothecae*
2. *Oscillatoriaceae*
  - ⇨ *Trichodesmium*
  - ⇨ *Lyngbya*
  - ⇨ *Phormidium*
  - Plectonema*
  - Pseudoanabaena*
  - *Oscillatoria*
3. *Clastidiaceae*
  - Dermocarpa*
  - Chroococidiopsis*
4. *Chroococidiaceae*
  - Myxosarcina*
5. *Hyellaceae*
  - Pleurocapsa*
  - Xenococcus*

**Niesymbiotyczne wiązanie azotu** - to wiązanie azotu atmosferycznego przez gatunki wolnożyjące bakterii.

Bakterie z rodziny *Azotobacteraceae* to:

- bezwzględne tlenowce,

- nitrogenaza tych bakterii jest podobnie jak inne nitrogenazy wrażliwa na obecność tlenu,
- uważa się że u *Azotobacteraceae* rolę ochronną przed dopływem tlenu spełnia intensywne oddychanie oraz wytwarzanie dużej ilości śluzu,
- w systematyce *Azotobacteraceae* brane są pod uwagę takie cechy jak: ruchliwość, zdolność do tworzenia cyst, tworzenie śluzu, barwników, wymagania pokarmowe.

Wyróżniamy dwie rodziny: *Azotobacter* i *Azomonas*.

1. **Rodzaj *Azotobacter***: bakterie wytwarzają formy spoczynkowe zwane cystami oraz charakterystyczne barwniki, np. *Azotobacter chroococcum* wytwarza czarny barwnik – melaninę.
2. **Rodzaj *Azomonas***: bakterie zaliczane do tego rodzaju nie wytwarzają cyst, należą tu następujące gatunki: *Azomonas agilis*, *insignis* i *makrocytogenes*.

### Symbiotyczne wiązanie azotu

Szacuje się, że tylko około 25% związanego biologicznie azotu pochodzi z działalności bakterii wolnożyjących, pozostała ilość jest wynikiem działalności mikroorganizmów żyjących w symbiozie z roślinami motylkowymi i niemotylkowymi.

### Bakterie wiążące N<sub>2</sub> w symbiozie

#### I. Symbiotyczne asocjacje

- a. Rhizobiaceae z roślinami motylkowymi
- b. Promieniowce z okrytonasiennymi (Frankia) ← Typ Alnus
- c. Cyjanobakterie z grzybami (Porosty np. *Nostoc* z *Gunnera*)
- d. *Klebsiella aerogenes* z roślinami (nodule na liściach)
- e. Morskich gatunków bakterii z małzami
- f. *Richelia intracellularis* (sinica) z morskimi okrzemkami
- g. Bakterie przewodów pokarmowych (np. termity)

Typ Parasponium

Typ Cycas

#### II. Asocjacje bakterii z trawami

- a. *Azospirillum lipoferum* z trawami tropikalnymi
- b. *Azospirillum brasiliense* z trawami tropikalnymi
- c. *Azotobacter paspali* z trawą tropikalną *Paspalum notatum*
- d. *Acetobacter azotrophicus* z trzciną cukrową
- e. *Azoarcus* spp. – endofit z trawą *Kallar*
- f. *Hapalosiphon* ze *Sphagnum*, *Nostoc* z wątrobowcami

*diazotrophicus*

### Typy symbiotycznego wiązania azotu cząsteczkowego

Wyróżnia się 3 typy wiązania azotu cząsteczkowego w symbiozie: *Parasponium*, *Cycas* i *Alnus*. *Parasponium* to symbioza bakterii z rodzajów: *Rhizobium*, *Mezorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium* z około 1100 gatunków roślin motylkowych. Korzenie roślin wydzielają aminokwasy i witaminy z grupy B oraz tryptofan, który bakterie przekształcają w IAA stymulujący rozwój włośników.

**Rośliny motylkowe** są jedną z najliczniejszych rodzin, zawierają 750 rodzajów i 16000-19000 gatunków. Wchodzą w symbiozę z bakteriami należącymi do rodzaju *Rhizobiaceae*, zdolnymi jedynie do wiązania azotu w tych warunkach.

Bakterie z rodzaju *Rhizobiaceae* najefektywniej wiążą azot cząsteczkowy. Ale tabelki z ilościami azotu związanymi rocznie przez poszczególne podgatunki nie będziemy zamieszczać (mogę jedynie ujawnić, że *Vicia fabia* rządzi – 210 kg N/ha).

Rodzaj *Rhizobium* obejmuje następujące gatunki: *R. leguminosarum* (biowary: *trifolii*, *viciae* i *phaseoli* – koniczyna, wyka i fasola), *tropici*, *etli*, *gallicum*, *giardini*, *galegae*.

Charakterystyka:

krótki czas generacji, poniżej 6h;  
 perytrychalne urzęsienie;  
 zakwaszanie podłoża z mannitolem;  
 niska odporność na antybiotyki;  
 wysoka częstość przekazywania materiału genetycznego;  
 lokalizacja genów symbiotycznych na plazmidach.

**Mezorhizobium** – zaliczamy tu gatunki o cechach pośrednich między *Rhizobium* a *Bradyrhizobium*.  
 Gatunki: *M. loti*, *huakuii*, *ciceri*, *tianshanense*.

**Bradyrhizobium** – żyją w symbiozie z roślinami motylkowymi i niemotylkowymi. Gatunki: *B. japonicum*, *B. liaoningense*.

Charakterystyka:

wolne tempo wzrostu,  
 nie wykorzystują dwucukrów jako źródła węgla,  
 wykazują dużą odporność na antybiotyki,  
 posiadają szeroki zakres gospodarczy,  
 geny symbiotyczne zlokalizowane na chromosomach.

**Azorhizobium** – gatunki: *A. elkanii*, *A. caulinodans*.

Charakterystyka:

posiadają zdolność tworzenia brodawek na łodygach i na korzeniach,  
 jako jedyne z tej rodziny mogą wiązać azot zarówno w symbiozie jak i w stanie wolnożyjącym w glebie,  
 wolne tempo wzrostu,  
 geny na chromosomach.

**Sinorhizobium** – gatunki: *S. fredii*, *meliloti*, *teranga*, *medicae*.

Właściwość	Rhizobium	Bradyrhizobium	Azorhizobium
Rzęski na podłożu płynnym na podłożu stałym	Brak perytrychalne	Brak jedna, biegunowa	jedna, biegunowa jedna, biegunowa
Zdolność wiązania N <sub>2</sub> poza rośliną	nie	nie	Wszystkie szczepy
Tempo wzrostu w labie	szybkie	wolne	szybkie
Lokalizacja genów	plazmidy	chromosomy	chromosomy
Zakres gospodarczy	Zazwyczaj wąski	Zazwyczaj szeroki	Znamy niewiele gat.
Znaczenie rolnicze	Współżyją z większością roślin motylkowych	Współżyją z roślinami motylkowymi i niemotylkowymi	małe

### Bakterie brodawkowe – infekcja

- u bakterii *Rhizobium* właściwy dla danej rośliny gatunek wchodzi do włośnika rośliny gospodarza a następnie trafia „nicią zakaźną” do kory korzenia i pod wpływem bodźca

- komórki tetraploidalne korzenia rośliny tworzą brodawkę a komórki bakterii dzielą się.
- W wytworzonej brodawce komórki przechodzą w postać bakteroidów zdolnych do wiązania azotu.
- Roślina w brodawce wytwarza czerwone białko leghemoglobinę. Jej główną funkcją jest utrzymanie zredukowanego potencjału redoks w otoczeniu brodawki.
- Bakterie wiążące azot zaopatrują roślinę w azot związany głównie w postaci aminokwasów (glutaminowy, asparaginowy), natomiast roślina dostarcza bakteriom zredukowanych związków węgla, metabolizowanych przez bakteroidy.
- W ostatecznym etapie po lizie brodawek następuje uwolnienie bakteroidów i przejście w ich pierwotną postać.
- W czasie trwania symbiozy ponad 90% związanego azotu jest dostępne dla roślin.

### Flawonoidy

korzenie roślin motylkowych, będąc w deficycie azotowym wydzielają flawonoidy, które są sygnałem do ataku dla bakterii z rodziny *Rhizobium*.

### Nodulacja

Bakterie przytwierdzają się do powierzchni włóśników korzenia i wydzielają specyficzny oligosacharyd jako sygnał produkowany przez czynnik nod.

W odpowiedzi na sygnał oligosacharydowy włóśniki deformują i ich końce zakręcają się. Bakterie zbierają się w mały pakiecik i zaindukowany zostaje podział komórek kory pierwotnej.

Bakterie wchodzi do włóśnika i przesuwają się tzw. nicią infekcyjną, dzielą się, oraz wydzielają sacharydy które tworzą kanał infekcyjny.

Niść infekcyjna rozgałęzia się i sięga aż do kory, a komórki *Rhizobium* dzielą się i tworzą brodawkę pierwotną.

Bakterie rozprzestrzeniają się w cytoplazmie komórek i zostają otoczone membranami. Dzielą się a następnie tworzą bakteroidy wiążące azot cząsteczkowy oraz syntetyzowane jest białko leghemoglobina.

Do symbiotycznego wiązania azotu i wiązania azotu przez organizmy wolnożyjące wymagana jest obecność produktów aż 21 **genów nif**.

Produkty **genów fix** wymagane są do stabilizacji funkcji brodawek, nie występują u bakterii wolnożyjących!!! np. białka regulatorowe, które monitorują poziom tlenu wewnątrz bakteroidów.

**Typ Cycas** – to asocjacje licznych gatunków sinic, takich jak: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aulosira*, *Azolla*, *Calothrix*, *Nostoc*, *Plectonema*, *Scytonema*, *Gleotricha* etc. z wieloma dość prymitywnymi roślinami jak wątrobowce, nagonasienne (Cycas) sagowce, okrytonasienne (Gunnera), porosty, pterydofity (*Azolla*).

Zdolność do wiązania azotu przez sinice wytwarzające heterocysty jest powszechna (u form ich nie wytwarzających – mniej powszechna). Sinice wchodzi zwykle wchodzą w struktury rośliny np. aparaty szparkowe liści, nie tworząc struktur tego typu jak brodawki u *Rhizobium* czy *Frankia*.

Wodna roślina *Azolla filiculoides* zawiera wewnątrz tkanek liści kolonie nitkowatej sinicy *Anabaena azollae*. Jest to zależność symbiotyczna: *Azolla* – umożliwia bytowanie sinicom na nasłonecznionej powierzchni wody a sinice asymilują azot dzięki posiadaniu heterocyst.

Wiązanie azotu przez sinice jest efektywne – wolnożyjąca *Anabaena* może związać ok. 80 kg N<sub>2</sub>/ha. Układ symbiotyczny *Azolla*-*Anabaena* charakterystyczny dla pól ryżowych wiąże trzykrotnie więcej azotu niż wolnożyjąca *Anabaena* i więcej niż układ *Rhizobium*-roślina motylkowa.

W symbiozie z *Azolla*, sinica wytwarza znacznie więcej heterocyst.

W Chinach i Wietnamie system wiążący azot *Azolla* z *Anabaena* – jest wykorzystywany w celu uzyskiwania tzw. nawozu zielonego stanowiącego karmę dla zwierząt.

**Typ Alnus** – to symbioza nitkowatych mikroorganizmów *Frankia* (pokrewne promieniowcom) z roślinami niemotylkowymi (w tym z około 300 gatunkami egzotycznych drzew i krzewów). Jest powszechna zarówno w strefie umiarkowanej, jak i w rejonach polarnych tropiku i subtropiku, strzępki bakterii z rodzaju *Frankia* wchodzi do korzeni i stymulują podział komórek kory pierwotnej korzenia; powstają narośle korzeniowe, bakterie syntetyzują nitrogenazę i wiążą azot. *Frankia* tworzy układy symbiotyczne z 178 gatunkami roślin dwuliściennych należących do 20 rodzajów wchodzących do 8 rodzin.

*Frankia* to prokariotyczne bakterie ściśle spokrewnione z promieniowcami. Są one mikroaerofilami, mezofilami, heterotrofami.

*Frankia* podobnie jak wiele promieniowców wytwarza nitkowate mycelia, które wyróżniają sporangia i pęcherzyki, w których wiązanie N<sub>2</sub> jest silniejsze.

Wydaje się, że zdolności każdego szczepu *Frankia* są ograniczone do kilku rodzajów roślin.

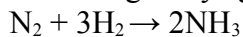
Wyróżnia się 4 specyficzne grupy *Frankia*:

1. szczepy infekujące *Alnus* (olchę) i *Myrica* (woskownicę)
2. szczepy infekujące *Casaurinaceae* (*kazauryna*);
3. szczepy infekujące gatunki *Myrica* i *Gymnostoma* (*gymnostoma*)
4. szczepy infekujące tylko gatunki z rodziny *Elaeagnaceae* (oliwkowate).

Szczepy *Frankia* grupy 1 i 2 infekują rośliny poprzez włósniki korzeniowe roślin, podczas gdy 3 i 4 penetrują poprzez przestrzenie międzykomórkowe.

### **Nitrogenaza**

biologiczne wiązanie azotu to redukcja azotu atmosferycznego do amonu przy udziale wrażliwej na tlen nitrogenazy zgodnie z reakcją:



Siła redukcyjna pochodzi z układu NADPH/ferrodoksyna via centrum nitrogenazy Fe/Mo.