11.10.24.

25 гр.

Мікробіологічний та хіміко-бактеріологічний аналіз.

ТЕМА . ПЕРЕТВОРЕННЯ МІКРООРГАНІЗМАМИ СПОЛУК АЗОТУ.

План

1. Кругообіг азоту в природі

2. Амоніфікація. Збудники, хімізм

3. Нітрифікація. Збудники, хімізм

4. Денітрифікація. Збудники, хімізм

5. Фіксація молекулярного азоту мікроорганізмами

6. Імобілізація азоту

Ключові терміни та поняття:*Резерфорд Д., молекулярний азот, гниття, Виноградський С.М., I і II фаза нітрифікації, пряма, непряма, асиміляторна і дисиміляторна денітрифікація, вільноживучі і симбіотичні азотфіксатори.*

1. Кругообіг азоту в природі

Азот — основний елемент, що визначає величину врожаю сільськогосподарських культур. Рослинам недоступний газоподібний азот, що у величезній кількості, що перебуває в повітрі. З великої різноманітності з'єднань азоту, що зустрічаються в ґрунті, вони можуть використовувати для харчування в основному тільки мінеральні форми цього елемента.

Молекула азоту є однією з найінертніших Д.Резерфорд, який вперше (1772) виділив азот повітря, назвавши його нежиттєвим тому, що ВІН не підтримує ні дихання, ні горіння. Проте тепер усім відомо, що азот є необхідною складовою частиною нуклеїнових кислот, амінокислот, білків, фосфоліпідів, численних ферментів і вітамінів, АТФ, НАД і НАДФ та інших важливих сполук усіх живих організмів.

Більшу частину азоту біосфери становить молекулярний азот N_2 на долю якого припадає до 80% усіх молекул повітря. Молекулярнийазот атмосфери не може засвоюватися більшістю вищих рослин. Ці рослини можуть використовувати для свого живлення переважномінеральні сполуки цього елемента, які знаходяться у грунті. Однакіснує велика група ґрунтових вільноживучих і симбіотичних мікроорганізмів, які, завдяки наявності у них нітрогеназної системи мають здатність засвоювати молекулярний азот атмосфери.

У природі постійно відбувається кругообіг азоту, в якому берутьучасть рослини, тварини і мікроорганізми. Це досить складний процес і його можна поділити на чотири етапи.

1. Органічні рештки рослинних і тваринних організмів, які потрапляють у грунт, розкладаються (мінералізуються) амоніфікуючими мікробами, актиноміцетами та плісневими грибами і перетворюються на амонійні сполуки — аміак та інші.
2. Амонійна форма азоту в грунті далі окислюється нітрифікуючими бактеріями і перетворюється на сполуки азотистої і азотної кислот (нітрити і нітрати).

Інтенсивність утворення нітратів у грунті залежить від його аерації. Чим краще відбувається обмін повітря, тим більше утворюється нітратів і навпаки.

3. За певних умов нітрати і нітрити під впливом денітрифікуючих бактерій можуть відновлюватися до молекулярного азоту (денітрифікація), в результаті чого зберігається відносна рівновага між вмістом молекулярного азоту в атмосфері і зв'язаним азотом грунту, рослин і тварин.
4. Фіксація атмосферного азоту грунтовими мікроорганізмами (Azotobacter, Clostridium, Rhizobium, ціанобактерії)

Отже, коли зіставити кількість амонійного, нітритного і нітратного азоту, який потрапляє в грунт у результаті фотохімічних процесів і електричних розрядів в атмосфері, з тією кількістю, що вноситься в грунт завдяки його фіксації мікроорганізмами, то стає зрозумілою виняткова важливість цього процесу на нашій планеті. Адже загальна продуктивність мікробної фіксації азоту становить від 270 до 330 млн т на рік.

2. Амоніфікація. Збудники, хімізм

Амоніфікація білків (гниття). Це найбільш динамічна ланка при перетворенні сполук азоту. При позаклітинних перетвореннях кінцевим продуктом є амінокислоти. В процесі беруть участь протеази мікроорганізмів і рослин. Далі амінокислоти або надходять до клітин мікроорганізмів, або адсорбуються на грунтових частках. При внутрішньоклітинних перетвореннях відбувається декарбоксилування та дезамінування. Останній шлях призводить до вивільнення аміаку. В процесі амоніфікації, крім бактерій, беруть участь актиноміцети і гриби.

Це складний багатофазовий процес, кінцеві результати якого залежать від будови й складу білка, умов, у яких відбувається розклад, і від збудників, що спричинюють його. Гниття білків починається з їхнього гідролізу під впливом протеолітичних ферментів, які виділяються мікроорганізмами в оточуюче середовище.

Білок + H_2O → пептони → поліпептиди → амінокислоти

Амінокислоти, що утворилися, дифундують вглиб клітини бактерій і піддаються дезамінуванню та декарбоксилюванню, під час якого утворюється аміак та радикал.

1. $R – CHNH_2COOH + H_2O \rightarrow R$

–CHOHCOOH + NH_3 Гідролітичне дезамінування

2. R – $CHNH_2COOH$ + ½O_2 →R –CO – COOH+ NH_3 Окислювальне дезамінування
3. R – $CHNH_2COOH$ + 2H →R –CH_2COOH + NH_3 Відновлювальне дезамінування
4. R – $CHNH_2COOH$ →R – CH_2NH_2+ CO_2 Декарбоксилювання

Амоніфікацію білків зумовлюють різні види аеробних і анаеробних мікроорганізмів. Особливо активними амоніфікаторами є представники роду **Bacillus**(B. subtilis, B. cereus, B. mycoides), **Pseudomonas**(P. fluorescens, P. aeruginosa), **Clostridium** (C. sporogenes, C. putrificus), Proteusvulgaris та інші.

Разом з бактеріями активну участь в амоніфікації білкових речовин беруть ґрунтові гриби й актиноміцети — **Aspergillus, Penicillium, Mucor, Trichoderma,**

Cladosporium тощо. Оскільки амоніфікацію білків спричиняють різні групи мікроорганізмів, то вона може відбуватися в широкому інтервалі кислотності

Процесу амоніфікації піддаються не тільки білки, а й їхні похідні — пептони, пептиди, амінокислоти, а також нуклеїнові кислоти та їхні похідні — пуринові і піримідинові основи, сечовина, сечова кислота, складний азотовмісний цукор хітин і гумусові кислоти.

При амоніфікації білківв анаеробних умовах можуть утворюватися і токсичні речовини, наприклад, діаміни, до яких належать кадаверин і путресцин.

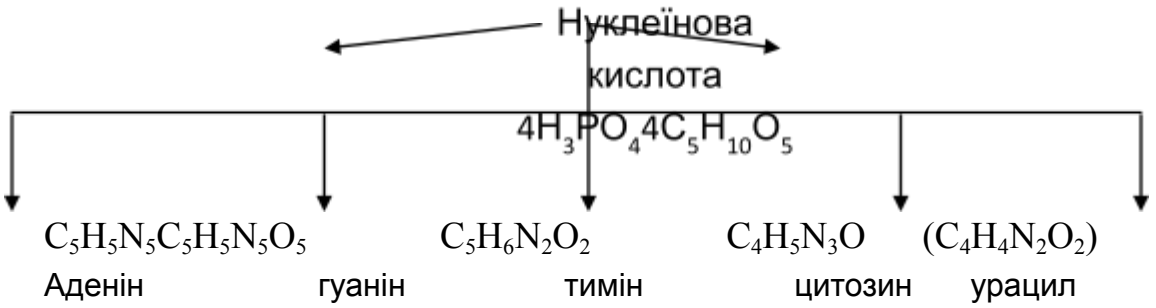
Амоніфікація гумусових сполук. Основна маса зв'язаного азоту в грунті міститься у формі перегнійних або гумусових речовин. Так, в орному шарі гектару чорнозему міститься 300 тонн гумусу. Його розклад— процес дуже повільний. Наприклад, у помірному кліматі протягом року розкладається приблизно1—3% загального запасу ґрунтового гумусу. Амоніфікацію гумінових речовин мікробами можна зобразити такою спрощеною схемою:

гумінові речовини + nO_2 = CO_2 + H_2O +NH_3.

У цьому важливому процесі беруть участь аеробні і анаеробні мікроорганізми .

Розклад нуклеїнових кислот.Під впливом ферментів рибонуклеази і дезоксирибонуклеази, які синтезуються деякими видами грибів, актиноміцетів і бактерій, нуклеїнові кислоти розкладаються до мононуклеотидів. Останні під дією нуклеотидів розщеплюються на фосфорну кислоту, рибоза або дезоксирибоза, пуринові і піримідинові

основи.



Амоніфікація сечовини.До поширених у природі азотовмісних сполук належать також сечовина, сечова і гіпурова кислоти, які містяться в сечі людини і тварин. Сечовина може синтезуватись також грибами. Наприклад, у шампіньйонів до 13% сухої маси припадає на сечовину. Розклад сечовини у грунті зумовлює особлива група уробактерій Найенергійнішими збудниками цього процесу є **Micrococcusureae,Sporosarcinaureae, Bacilluspasteurii**.

Хіміз розкладу сечовини являє собою процес дезамінування під дією ферменту уреази:

$CO(NH_2)_2 + 2H_2O \rightarrow CO(OH)_2 + 2NH_3 \rightarrow (NH_4)_2CO_3$

Вуглеаміачна сіль, що утворилася, далі розкладається на аміак та вуглекислоту: $(NH_4)_2CO_3 \rightarrow 2NH_3 + CO_2 + H_2O$

3. Нітрифікація. Збудники, хімізм

Нітрифікація є другим етапом перетворення азоту у грунті. Це мікробіологічний процес окислення аміаку, що утворився під час амоніфікації, до азотистої кислоти або її солей (нітритів), а далі до азотної кислоти та її солей

(нітратів). Відбувається в аеробних умовах у ґрунті та природних водах. Часто може викликати появу в них нітратів у токсичній кількості, а оскільки нітрати — найбільш активно мігруюча в розчині сполука азоту — їх винесення з ґрунту в розташовані нижче по схилу водоймища, що спричиняє за собою евтрофікацію цих водоймищ.

У 1890-1892 рр. С.М.Виноградський, застосувавши розроблену ним методику елективних культур, виділив чисту культуру бактерій цього процесу.До дослідів С. М. Виноградського припускалось, що причиною нітрифікації є один вид мікроорганізмів, які окислюють амонійні сполуки до нітратів. Проте працями С. М. Виноградського було доведено, що цей процес є результатом послідовної дії двох груп мікроорганізмів і відбувається він у дві фази.

Перша фаза — окислення аміаку до азотистої кислоти (вірніше, її аніону), яку здійснюють нітрозобактерії ***Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosolobus, Nitrosovibrio*** за наступним механізмом:

$$NH_3 + 3O_2 \rightarrow 2HNO_2 + H_2O + 158 \text{ кал}$$

Однак схематичний хід цього процесу описує такий цикл реакій:

$$NH_3 \rightarrow NH_2OH \rightarrow HNO \rightarrow HN(OH)_2 \rightarrow HNO_2$$

При цьому також виділяється енергія, що складає основу розвитку нітрифікуючи мікроорганізмів та засвоєння ними вуглецю з вуглекислого газу.

Друга фаза — окислення аніону азотистої кислоти до аніону азотної, що здійснюється нітратними бактеріями (народи ***Nitrobacter, Nitrospira, Nitrococcus***).

$$2\,HNO_2 + O_2 \rightarrow 2HNO_3 + H_2O + 488 \text{ кал}$$

Поряд з окисленням аміаку до азотистої кислоти в культурах нітрифікуючи мікроорганізмів йде відновлення вуглекислоти, на що затрачається близько 7% виділеної енергії

Обидві групи бактерій є облігатними аеробами, оптимальна для їх розвитку температура 25—30 градусів за Цельсієм і ph 7,5—8,0. У кислому середовищі процес не йде. Усі ці бактерії — грамтнегативні автотрофи (літотрофи), що використовують енергію окислення сполук азоту для синтезу органічних речовин з вуглекислого газу. Морфологічно ці групи різноманітні, у більшості своїй дрібні, рухомі, з полярним або перитрихальним джгутикованням. Окислення аміаку проводять на цитоплазматичній мембрані. Звільнені в ході реакцій електрони переходять у дихальний ланцюжок на цитохроми.

Вважають, що великі поклади селітри в деяких країнах — результат процесів нітрифікації, які відбувалися на нашій планеті протягом мільйонів років.

У різних грунтах інтенсивність процесів нітрифікації є різною. Чим багатший грунт, тим більше може нагромаджуватися азотної кислоти. Проте не слід забувати, що солі азотної кислоти (нітрати), на відміну від амонійних (іон амонію поглинається ґрунтовим комплексом), можуть легко вимиватися з грунту, а це істотно впливає на зниження коефіцієнта використання нітратів рослинами.

Крім того, в самій рослині нітрати повинні відновитися, щоб рослина змогла використати їх у процесах біосинтезу, а для цього потрібна енергія; амоній може використовуватися рослинами й безпосередньо. Все це змушує дослідників

вирішувати питання про штучне зниження інтенсивності процесу нітрифікації завдяки використанню специфічних інгібіторів.

4. Денітрифікація. Збудники, хімізм

Денітрифікація – процес відновлення нітратів у ґрунті до молекулярного азоту в анаеробних умовах. Він спричиняється до істотних втрат із грунту доступних для рослин форм азоту.

Пряма денітрифікація, здійснюється групою факультативно-анаеробних мікроорганізмів — денітрифікаторовВона буває двох типів — асиміляторна і дисиміляторна. При асиміляторній

денітрифікації нітрати відновлюються до аміаку, який використовується як джерело азоту для побудови тіла мікробів. У дисиміляторній денітрифікації нітрати використовуються як окислювачі органічних речовин замість молекулярного кисню, що забезпечує мікроорганізми потрібною енергією. Здатність до дисиміляторної денітрифікації мають тільки специфічні аеробні бактерії.

Збудниками прямої асиміляторної денітрифікації є представники родів Pseudomonas, Paracoccus (Pseudomonasaeruginosa, Pseudomonasfluorescens, Pseudomonasstutzeri, Paracoccusdenitrificans). Денітрифікацію можуть зумовити і термофільні бактерії з роду Bacillus.

Хід процесу описує наступна схема:

$2HNO_3 \rightarrow 2HNO_2 \rightarrow 2HNO \rightarrow N_2$

Відновлювати нітрати можуть також деякі хемолітоавтотрофи, зокрема Thiobacillusdenitrificans, яка розмножується в анаеробних умовах і є сіркоокислюючою бактерією:

$5S + 6KNO_3 + 2CaCO_3 \rightarrow 3K_2SO_4 + 2CaSO_4 + 2CO_2 + 3N_2 + 645$ кал

Непряма денітрифікація, при якій відбувається хімічних взаємодія нітратів з амонійними солями, амінами або амідами, що супроводжується виділенням газоподібного азоту.

1. $R – CHNH_2COOH + ONOH \rightarrow R – CHOHCOOH + H_2O + N_2$

2. $R – CONH_2 + ONOH \rightarrow R – COOH + H_2O + N_2$

Найбільше інтенсивно денітрифікація йде в ґрунтах з високою вологістю й поганою аерацією, що є однією з основних причин втрати із ґрунту мінерального азоту й зниження коефіцієнта використання рослинами азотних добрив.

Денітрифікатори широко поширені в ґрунтах і в ризосфері рослин, у т.ч. і винограду, тому для зниження денітрифікації в ґрунті необхідна гарна аерація, зменшення вологості в певні періоди (дренаж) і створення умов для кращого споживання нітратів ґрунту рослинами,

5. Фіксація молекулярного азоту мікроорганізмами

Запаси газоподібного азоту в атмосфері величезні: над кожним квадратним кілометром земної поверхні в повітрі міститься близько 8 млн т азоту. Проте цей азот ні для рослин, ні для тварин недоступний. Лише деякі мікроорганізми, які вільно живуть у грунті або перебувають у симбіозі з рослинами, можуть засвоювати азот безпосередньо з повітря і будувати з нього білкові сполуки свого тіла.

Однак існують азотфіксуючі мікроорганізми, здатні засвовати молекулярний азотом і будувати з нього азотовмісні органічні сполуки своєї клітини. Ці мікроорганізми вільно живуть у ґрунті або перебувають у симбіозі з рослинами. Азотфіксируючі мікроорганізми обумовлюють підвищення родючості ґрунту, і їх вивченню приділяється велика увага. Раціональне використання біологічної фіксації молекулярного азоту дає можливість суттєво підвищити врожай і ощадливіше витрачати мінеральні азотні добрива.

Вперше збагачення субстратів азотом у результаті діяльності вільноживучих мікроорганізмів було показано французьким ученим Жоденом в 1882 р. Він встановив, що живильні розчини в замкнених судинах, що містять органічні безазотисті речовини, можуть збагачуватися азотом при розвитку в них мікроорганізмів.

В 1885 г. інший французький учений — М. Бертло підтвердив цей факт відносно ґрунту. У стерилізованому ґрунті за літній період зміст азоту не змінювався, а в нестерильному — зростав. Це дозволяло припустити, що ґрунт збагачується азотом за допомогою мікроорганізмів.

Чисту культуру азотфіксуючого мікроорганізму вперше виділив С. М. Виноградский (1893). Це була анаеробна спороутворююча паличка, названа Clostridium pasteurianum. Трохи пізніше голландський мікробіолог М. Бейерінк (1901) відкрив Azotobacter chroococcum — аеробну бактерію, також здатну засвоювати молекулярний азот.

Відомо два основних природних шляхи зв'язування молекулярного азоту — фізико-хімічний і біологічний. Перший пов'язаний з впливом на молекулярний азот електричних розрядів, які бувають під час грози. Кількість зв'язаного таким чином азоту незначна і не відіграє великої ролі в живленні рослин.

Другий шлях фіксації молекулярного азоту пов'язаний з життєдіяльністю мікроорганізмів, що належать до двох груп: мікроби, які перебувають у симбіозі з рослинами, та азотфіксатори, що вільно живуть у грунті та воді.

Відомо, що вирощування бобових рослин підвищує родючість виснажених грунтів. Першу спробу з'ясувати причину цього зробив у 1838 р. французький агрохімік Ж.Бусенго. У своїх дослідах з конюшиною і горохом, добрий урожай яких було вирощено при невеликій кількості азоту в піщаному ґрунті, він припустив, що висока врожайність бобових рослин пов'язана з їхньою здатністю асимілювати атмосферний азот. При повторному досліді у 1858 р. Ж.Бусенго дістав протилежні наслідки, цього разу він прожарював пісок і поливав рослини тільки дистильованою водою, бажаючи видалити сліди азотних сполук. Проте Ж.Бусенго не здогадувався, що так він знищив мікроорганізми в піску.

Тільки через 30 років німецькі дослідники Г.Гельрігель і Г.Вільфарт розкрили причину невдачі цього видатного вченого. їм вдалося довести, що бобові рослини, посіяні в прожарений пісок (де вбито всіх мікробів), не утворюють бульбочок на коренях і не можуть фіксувати молекулярний азот атмосфери. Тоді вже було відомо, що в бульбочках на коренях бобових рослин міститься дуже багато бактерій.

Ще в 1858 р. І.Лахман, а дещо пізніше М.С.Воронін, незалежно один від одного, відкрили наявність мікробних клітин у бульбочкахбобових рослин. У 1888

р. голландський мікробіолог М. Бейєрінк вперше виділив у чистій культурі бактерії з бульбочок гороху, квасолі, вики та інших культур.

Симбіотична фіксація азоту.Бульбочки утворюються тільки у представників родини бобових (Fabaceae). У різних рослин бульбочки

розрізняються тільки за формою і величиною. Утворюються вони після проникнення в кореневу систему бульбочкових бактерій.

Численні дослідження показали, що бульбочкові бактерії відрізняються між собою, а тому рід Rhizobium треба розглядати як групу споріднених мікроорганізмів. У молодому віці ці бактерії рухливі, мають паличкоподібну форму, завдовжки від і,2 до 3 мкм, розміщення джгутиків в одних видів перетрихальне, в інших — субполярне. Бульбочкові бактерії є грамнегативними, неспороносними аеробними організмами.

Старіючи, бульбочкові бактерії втрачають джгутики, перестають бути рухливими і набувають вигляду оперезаних паличок, оскільки з віком бактеріальна клітина наповнюється жировими включеннями, які не забарвлюються. Зі старінням у бульбочках культури Rhizobiumчасто виникають потовщені, розгалужені, сферичні та іншої форми утворення, які значно більші за звичайні клітини. Ці поліморфні утворення дістали назву **бактероїдів**. Вони нерухомі і не здатні до розмноження. Проте найбільш енергійно відбувається засвоєння азоту в бульбочках саме тоді, коли бульбочкові бактерії перетворюються на бактероїди.

Встановлено, що бульбочкові бактерії можуть заражати лише певну групу бобових рослин. Вибіркова здатність цих бактерій відносно рослин дістала назву ***специфічності***. Ця властивість стала головною ознакою для розробки систематики бульбочкових бактерій.

За Л.М.Доросинським, рід Rhizobiumподіляють на такі групи: R. leguminosarum— бактерії гороху, вики, кормових бобів, чини; R. phaseoli— квасолі;
R. japonicum— сої; R. vigna— вігни, арахісу, машу; R. cicer — нуту; R. lupini— люпину, серадели; R. trifolii— еспарцету; R. lotus— лядвенцю; R. robinii— акації.

В окремих випадках спостерігається не тільки видова, а й сортова специфічність бульбочкових бактерій. Крім специфічності, цимбактеріям властива ***вірулентність*** — здатність проникати в тканину кореня, розмножуватися там і спричиняти утворення бульбочок. За певних умов ці бактерії можуть знижувати або зовсім втрачати активність.

Істотною властивістю бульбочкових бактерій є також їхня активність, тобто здатність у симбіозі з рослинами асимілювати молекулярний азот. У грунті трапляються штами активних і неактивних бульбочкових бактерій. Зараження бобових рослин активною расою бактерій веде до утворення великої кількості бульбочок на головному корені та зумовлює енергійний процес фіксації атмосферного азоту. Неактивні раси цих бактерій спричинюють утворення бульбочок, але азот не фіксується.

Бульбочки, які утворюються активними расами бактерій, мають рожеве забарвлення. Пігмент, що надає їм такого забарвлення, за хімічним складом близький до гемоглобіну крові та називається ***леггемоглобіном***(фітоглобін). Вважають, що цей пігмент сприяє процесу засвоєння азоту, підтримуючи

окислювально-відновний потенціал на певному рівні. Бульбочки, які утворюють неактивні раси бактерій, мають зеленкуватий колір.

Механізм проникнення бактерій у кореневий волосок досі ще недостатньо вивчено. Встановлено, що на поверхні клітинної оболонки бобових рослин є особливий вид білка, до якого вибірково «приклеюються» специфічні бульбочкові бактерії завдяки наявності в їхній оболонці специфічного ліпополісахариду. Припускають, що саме у відповідь на появу цього ліпополісахариду на оболонці кореневого волоска з'являється білок лектин, який зв'язує полісахариди оболонки ризобіїв. Це своєрідний механізм «впізнавання» перед виникненням бобово-ризобіального симбіозу.

Після проникнення бактерій у клітину кореневого волоска вони починають посилено розмножуватись і утворюють суцільний тяж, так звану ***інфекційну нитку*** (слизовий тяж), в якій скупчується величезна кількість бульбочкових бактерій. Останні можуть розмножуватися тільки в тетраплоїдних клітинах рослин.

Як в інфікованих бактеріями, так і в сусідніх клітинах починається активний поділ, і утворюються бульбочки. В однорічних рослин бульбочки є тимчасовим утворенням. У багаторічних вони можуть функціонувати протягом кількох років. Контакт бактерії з рослиною встановлюється через судинні пучки, які обплітають тканину бульбочки. Провідними шляхами до бульбочок надходять вуглеводи та інші поживні речовини, де вони використовуються бактеріями, а рослина одержує із бульбочок зв'язані сполуки азоту. Доведено, що найінтенсивніша віддача зв'язаного азоту із тканин бульбочки відбувається тоді, коли бактероїди перебувають у життєдіяльному стані.

Транспорт азотовмісних речовин із бульбочок у рослину здійснюється у формі амінокислот. Незначна кількість засвоєного рослиною азоту виділяється внаслідок екзоосмосу коренями в ґрунті переважно у вигляді аспарагінової кислоти.

Після відмирання і розкладу бульбочок бактерії потрапляють у ґрунт і живуть там як сапрофіти, поки знову не проникнуть у корені рослин. Питання про те, що лежить в основі взаємовідносин бактерій і бобових рослин (паразитизм чи співжиття), ще повністю не з'ясовано. Важливим є той факт, що бульбочкові бактерії, проникаючи в рослину, стимулюють розвиток у неї імунітету, який перешкоджає подальшому зараженню коренів.

Окремі бобові культури збагачують ґрунти різною кількістю азоту. При сприятливих умовах симбіозу кількість азоту, який фіксується горохом, за рік сягає 100— 300 кг/га, кормовими бобами — 160-200, люпином білим — до 300, люцерною — до 500 кг/га і більше. Бобові рослини нагромаджують до 60% азоту внаслідок фіксації молекулярного азоту. Решту азоту вони використовують із грунту у вигляді мінеральних сполук. Отже, вклад бобових рослин у забезпечення ґрунтів доступними формами азоту досить відчутний.

Бульбочки можуть утворюватися не тільки на коренях рослин, а й на інших органах. їх знайдено на листках майже 400 різних видів рослин, наприклад деяких дводольних тропічних, зокрема у павети (PavettaindicaL.) із родини маренових (Rubiaceae). Найдокладніше досліджено такі бульбочки у рослин павети і психотрії.

Вільноживучі азотфіксатори.Крім бульбочкових бактерій, у грунті є багато інших видів мікроорганізмів, які можуть засвоювати молекулярний азот атмосфери. В 1893 р. С. М. Виноградський вперше виділив і вивчив вільноживучий азотфіксатор

— анаеробну спороносну бактерію веретеноподібної форми, яку було названо на честь Л. Пастера — Clostridiumpasteurianum.

Описано багато азотфіксаторів з роду ***Clostridium (C.buturicum, C.acetobutylicum, C.pectinovorum, C.felsineum, Cl.beijerinckii*** та ін.). Ці бактерії можуть використовувати різні джерела азоту: солі амонію і азотної кислоти, а також багато різних органічних азотовмісних сполук. Із вуглецевих сполук вони використовують моноцукри, дицукри, поліцукри, органічні кислоти тощо.

Енергійним фіксатором азоту серед цієї групи бактерій є Clostridiumpasteurianum. Він може зв'язувати до 10—12 мг азоту на 1 гзбродженого цукру.

Іншим дуже поширеним вільноживучим азотфіксатором є аеробна, овальної форми, бактерія — Azotobacterchroococcum, відкрита у 1901 р. М. Бейєрінком. Розмір клітин азотобактера коливається в межах 2-3 х 4-6 мкм. Він розмножується простим поділом з утворенням поперечної перегородки. Молоді клітини азотобактера рухливі, перетрихи з віком втрачають рухливість, набувають майже коковидної форми і покриваються товстим шаром слизу (капсулою). Інодіклітини азотобактера можуть бути вкритими товстою оболонкою і перетворюватися на цисти.

Серед представників азотобактера найгрунтовніше вивчено ***A.chroococcum, A.vinelandii, A.agilis, A.beijerinckii.*** Ці види різняться за формою і розмірами клітин, пігментацією колоній.

На відміну від клостридій азотобактер інтенсивніше зв'язує молекулярний азот. Активні культури азотобактера зв'язують 15—20 мг азоту на 1 г використаного цукру або іншої органічної речовини. Він не засвоює клітковини. Однак при наявності її в грунті розмножується більш інтенсивно, оскільки між целюлозорокладачами і азотобактером існує явище метабіозу. Азотобактер потребує нейтрального середовища. В кислих грунтах він не розвивається.

Близькі до азотобактера вільноживучі азотфіксатори з роду Beijerinckia. На відміну від азотобактера, вони можуть рости навіть при pH = 3. Ці бактерії мають різну форму, бувають рухливими і нерухливими; за енергією фіксації азоту вони близькі до азотобактера.

Серед вільноживучих азотфіксуючих бактерій слід згадати про види роду Derxia і Azotomonasfluorescens.

Пошуки вільноживучих азотфіксаторів дали змогу виявити їх і в інших родинах

— Spirillaceae, Rhizobiaceae, Achromobacteriaceae, Enterobacteriaceae,

Bacillaceae та ін. Здатність до фіксації молекулярного азоту мають анаеробні пурпурні та зелені фототрофні бактерії, що живуть у заболочених озерах і мулі, деякі мікобактерії, спірохети, проактиноміцети і навіть окремі види грибів, у тому числі дріжджі.

Використання методу мічених атомів дозволило підтвердити припущення, висловлене ще в 1889 р., про те, що одна з найбільших груп мікроорганізмів, які населяють грунти, — мікроскопічні водорості — можуть засвоювати атмосферний азот. Серед них близько 40 видів синьозелених водоростей. До найпоширеніших належать Anabaena, Amorphonostoc, Aulosira, Calothrix, Nostoc, Scytonematощо.

Останніми роками вчені різних країн приділяють велику увагу вивченню процесу фіксації азоту мікроорганізмами, які містяться на корінні і в прикореневій зоні небобових рослин. Ці мікроби дістали назву ***ризосферних***, а процес зв'язування ними молекулярного азоту називається ***асоціативною азотфіксацією***.

Азотфіксуюча активність виявлена у представників багатьох родів ризосферних бактерій: ***Agrobacterium, Achromobacter, Aquaspirillum, Azospirillum, Arthrobacter, Bacillus, Flavobacterium, Enterobacter, Erwina, Flavobacterium, Klebsiella, Mycobacterium, Pseudomonas, Rhodospirillum***та ін.

Бактеріальні добрива.Поряд з іншими добривами в агровиробництві широко використовують бактеріальні препарати, виготовлені на культурах відповідних бактерій. Думка про використання бульбочкових бактерій для посилення фіксації N_2 виникла після того, як М.Бейєрінку (1888) вдалося виділити чисту культуру цих бактерій з бобових рослин. Вперше препарат бульбочкових бактерій під назвою нітрагін було виготовлено в 1896 р. Ґрунтовий нітрагін — це розмножена культура бульбочкових бактерій на стерильному грунті.

Масове виготовлення цього бактеріального добрива в нашій країні почалося з 1929 р. Нині нітрагін випускають у двох формах — нітрагін сухий (ризорбін) та нітрагін торфовий (ризоторфін).

Багаторічна практика використання цього бактеріального добрива як в Україні, так і за кордоном свідчить про значну його ефективність. При цьому слід зазначити, що застосування нітрагіну веде не тільки до збільшення врожаю бобових рослин (пересічно на 10—15%), а й до поліпшення їхньої якості, оскільки в оброблених рослинах виявлено помітне збільшення вмісту білка і вітамінів.

Вдаються й до інших видів бактеріального добрива. На пропозицію С.П.Костичева, ще в 30-х роках почали застосовувати препарати для удобрення ґрунту, які містили культуру Azotobacterchroococcum.

Виробництво азотобактерину грунтується на розмноженні чистої культури азотобактера і змішуванні її з будь-яким субстратом (грунтом, торфом, агаром тощо). Азотобактерин використовують для підвищення врожайності зернових, технічних, овочевих та інших культур. У ґрунт його вносять разом з посівним матеріалом. Дія азотобактерину ґрунтується на

використанні властивостей азотобактера,який крім фіксації молекулярного азоту може виробляти фізіологічно активні речовини, які стимулюють ріст рослин і цим сприяють підвищенню їхньої продуктивності. Середній приріст врожаю від застосування азотобактерину становить близько 10%.

6. Імобілізація азоту

За певних умов наявні в ґрунті мінеральні форми азоту внаслідок бурхливого розвитку мікрорганізмів споживаються ними й переводяться в білок цитоплазми. Подібний процес, називаний іммобілізацією азоту, спостерігається, наприклад, при внесенні в ґрунт значної маси соломи. У результаті іммобілізації азоту використання його рослинами помітно знижується, що приводить до зменшення врожаю. Таким чином, іммобілізація являє собою процес зворотний мінералізації.

Встановлено, що перетворення азотовмісних сполук по шляху мінералізації або іммобілізації повністю визначається співвідношенням азоту й вуглецю в

органічній речовині, внесеній в ґрунт. Якщо субстрат має низьке співвідношення С до N. то при його розкладанні накопичується аміак, тому що мікроорганізмам не вистачає вуглецевмісних з'єднань для асиміляції азоту.

При внесенні в ґрунт маси, багатої вуглеводами й бідної азотом, відбувається споживання мінерального азоту. Наприклад, у соломі зернових культур співвідношення С до N наближається до 100 : 1. Внаслідок внесення її в ґрунт відбувається «біологічне закріплення» мінерального азоту.

Швидкість і кількістьасимілбованого мікробами азоту зв'язані також і з типом вуглецевмісного з'єднання. Так, глюкоза, легко асимілюється мікроорганізмами, і може викликати значно більш швидке закріплення азоту, ніж целюлоза або лігнін, що дуже важко руйнується мікроорганізмами.

У загальному можна вважати, що органічні сполуки зі співвідношенням С до

N. близьким до 20—25:1, сприяють нагромадженню мінеральних форм азоту в ґрунті, а речовини з більш широким співвідношенням цих елементів викликають іммобілізацію азотних запасів. Експериментальні дані показують, що в середньому на кожні 100 г розкладеної органічної речовини мікроорганізми споживають 2 г азоту.

Біологічно закріплений азот не витрачається із ґрунту. Після відмирання мікроорганізмів білкові речовини мінералізуються й перетворюються в аміак.

Іммобілізація неорганічного азоту має важливе агрономічне значення. Так, удобрення зернових культур рослинними рештками, що бідні на азот, небажане, тому що це погіршує азотне живлення рослин. Ці добрива можна вносити в ґрунт лише з додаванням відповідних доз азотних добрив, що дає гарний результат. З іншого боку, в осінню пору

року іммобілізація може бути корисною, тому що нітрати й аміак зв'язуються й не витрачаються в результаті взимку. Навесні азот, зв'язаний у мікробній клітині, мінералізується й перетворюється в аміак і нітрати, які потім можуть бути використані рослинами. Таким чином, пора року визначає корисність або шкідливість процесу іммобілізації.

Бобові рослини, що фіксують у симбіозі з бактеріями атмосферний азот, не відчувають депресії від внесення добрив, багатих на клітковину. Навпаки, вонипідвищують їхній урожай і сприяють кращому азотонакопиченню.

д\з опрацювати тему.