Тема:
Превращение микроорганизмами соединений азота

1. Круговорот азота в природе
2. Аммонификация
3. Нитрификация
4. Денитрификация
5. Иммобилизация азота
6. Биологическая азотфиксация

Круговорот азота в природе

Азот является важнейшим органогенным элементом, который входит в состав белковых веществ, ферментов, АТФ, нуклеиновых кислот любого живого существа.

Азот в природе находится в трех формах:

1. Органическая форма азота (белки, ферменты, нуклеиновые кислоты);
2. Минеральная форма азота (аммиак, нитраты, нитриты);
3. Молекулярная форма азота (N_2 – в атмосфере).

- Атмосферный азот вовлекается в круговорот благодаря азотфиксирующим микроорганизмам.
- Растения усваивают фиксированный м/о азот и превращают его в растительный белок.
- Животные поедают растительный белок и образуют животный белок.

Цикл превращений азота в природе с участием микроорганизмов состоит из 4 этапов:

1. аммонификация белковых веществ;
2. Нитрификация;
3. Денитрификация;
4. фиксация атмосферного азота м/о.

Аммонификация (минерализация азота, гниение, мобилизация азота) - это разложение органических азотсодержащих веществ с выделением азота в виде аммиака (белки, ферменты, мочевина, хитин, нуклеиновые кислоты).

Значение:

1. Участие в круговороте веществ в природе, санитары планеты, очищают от растительных, животных и микробных остатков, гнилостные процессы используют при выделке кож.

2. Порча мяса и мясопродуктов, рыбы и рыбопродуктов, яиц, молока и других белковых продуктов, шелковых и шерстяных тканей и изделий.

Аммонификация белков.

Разложение идет в 2 фазы:
1-я фаза протеолиз белков по схеме:
Белки = (экзопротеазы, пептидазы) = пептон = полипептиды = олигопептиды = аминокислоты.

2-я фаза аминокислоты поглощаются клетками микроорганизмов и внутри них происходит дезаминирование и декарбоксилирование.

Дезаминирование – отщепление аминогруппы

$$R\text{-}\underset{\underset{NH_2}{|}}{\overset{\overset{H}{|}}{C}}\text{-}COOH$$

Виды дезаминирования

– востановительное

$$RCHNH_2COOH + 2H^+ = RCH_2COOH + NH_3$$

– окислительное

$$RCHNH_2COOH + 1/2O_2 = RCOCOOH + NH_3$$

– гидролитическое

$$RCHNH_2COOH + H_2O = RCHOHCOOH + NH_3$$

– прямое

$$RCH_2CHNH_2COOH + H_2O = RCH{=}CHCOOH + NH_3$$

Декарбоксилирование – отщепление CO_2

$$RCHNH_2COOH = RCH_2NH_2 + CO_2$$

Продукты аммонификации

В аэробных условиях	В анаэробных условиях
Белок = NH_3 CO_2 H_2O SO_4	Белок = NH_3 CO_2 H_2S Амины Орг. к-ты Трупные яды (меркаптан, индол, скатол, кадаверин и др.)

Возбудителями аммонификации являются аммонифицирующие (гнилостные) бактерии. Широко распространены в природе.

Характеристика:

- Грам+ и грам -;
- палочки;
- подвижны;
- споровые и неспоровые;
- мезофиллы;
- аэробы, факультативные и облигатные анаэробы;
- гетеротрофы.

Аэробы:

– грибовидная бацилла Bacillus mycoides
– картофельная палочка Bacillus mesentericus
– сенная палочка Bacillus subtilis
– фосфорная палочка Bacillus megaterium
– чудесная палочка Bacterium prodigiosum
– Pseudomonas fluorescens

Факультативные анаэробы:

– протей обыкновенный Proteus vulgaris
– кишечная палочка Escherichia coli

Облигатные анаэробы:

– гнилостная палочка Clostridium patrificus
– спорогенная палочка Clostridium sporogenus

Аммонификацию в аэробных условиях вызывают плесневые грибы и актиномицеты.

Аммонификация мочевины.

Мочевина – продукт разложения белков в организме человека и животного, выделяющийся наружу с мочой.

Азот мочевины растениям не доступен. Только после его аммонификации микроорганизмами он переходит в форму NH_3 и становится доступным.

Под действием фермента уреаза, который выделяют микрооорганизмы, происходит гидролиз мочевины с образованием карбоната аммония, который почти тотчас же разлагается на составные компоненты - NH_3, H_2O, CO_2.

Химизм:

$CO(NH_2)_2 + H_2O =$ уреаза $= (NH_4)CO_3$ (углеаммиачная соль) $= 2NH_3 + CO_2 + H_2O$

Возбудители:
Уробактерии, содержат фермент уреаза, широко распространенный в почве, навозе, сточных водах.

Шаровидные	Палочковидные
Micrococcus ureae	**Bacillus probatus**
Sporosorcina ureae	**Bacillus pasteurii**

Характеристика:
Грам+, кокки, палочки, подвижны, споровые, аэробы, алкалофилы (pH 8-10), ауксоавтотрофы, аминоавтотрофы.

Более слабо могут вызывать аммонификацию бактерии рода Pseudomonas и Cytophaga.

Аммонификация хитина.

Хитин – это вещество хорошо распространено в почве. Входит в состав панциря ракообразных, покров насекомых, клеточную стенку грибов. Очень стойкое соединение.

Хитин – это азотсодержащий полисахарид ($C_{18}H_{30}O_{12}N_2$)

Химизм:

$C_{18}H_{30}O_{12}N_2 + 4H_2O =$ хитиназа $= 2C_6H_{11}O_5NH_2$ (глюкозамин) $+ CH_3COOH$

$2C_6H_{11}O_5NH_2$ (глюкозамин) $+ 2H_2O =$ хитиназа $= 2C_6H_{12}O_6$ (глюкоза) $+ NH_3$

Возбудители:

– актиномицеты – стрептомицеты, проактиномицеты, микромонаспоры.

– плесневые грибы – мукор, аспергиллус.

– бактерии – bacterium chitinovorum, pseudomonas, cytophaga

При аммонификации выделяется NH_3 часть которого:

– используется растениями

– усвоят микробы

– закрепится в почве

– улетучится

– окислится при нитрификации.

Нитрификация.

Это процесс окисления аммиака или аммиачных форм азота сначала в азотистую кислоту или нитриты, которая затем окисляется в азотистую кислоту или нитриты.

Процесс окисления идет в 2 фазы:

1-я фаза нитрозная: $2NH_3 + 3O_2 = 2HNO_2 + 2H_2O + 285$ кДж

2-я фаза нитратная: $2HNO_2 + O_2 = 2HNO_3 + 87$ кДж

Возбудители первой фазы – нитрозные бактерии, окисляют аммиак.

1. род Nitrosomonos
2. Nitrosospira
3. Nitrosococcus
4. Nitrosolobus
5. Nitrosovibrio
6. Nitrosocystis

Возбудители второй фазы – нитратные бактерии, окисляют азотистую кислоту.

1. род Nitrobacter
2. Nitrospira
3. Nitrococcus

Характеристика:

- Грам + ;
- кокки, палочки, извитые, дольчатые;
- подвижные и неподвижные;
- неспоровые;
- вызывают процесс окисления, аэробы;
- у всех есть мембраны на которых происходит хемосинтез, хемолитоавтотрофы;
- энергию которую получают при окислении аммиака или азотистой кислоты используют для построения органического вещества.

Факторы, влияющие на нитрификацию:

1. Наличие кислорода;
2. Кислотность pH 6-9;
3. Оптимальная температура 28-30 ^{0}C;
4. Органическое вещество подавляет нитрификацию;
5. Влажность 40-60%.

Значение:

1. Образование залежей селитры;
2. Служит показателем микробиологической активности почвы и ее плодородия;
3. Нитраты и нитриты усваивают растения.

Отрицательное значение:

1. Нитраты легко вымываются из почвы.

Денитрификация.

Это процесс восстановления нитратов и нитритов до молекулярного азота.

Значение:

1. Она носит отрицательный характер, т.к. почва теряет доступную форму азота для растений.
2. С другой стороны денитрификация происходящая в мировом океане полезна, т.к. обезвреживаются нитраты.

2 вида денитрификации:

1. Прямая (микробиологическая) – биологическое восстановление нитратов в результате деятельности микробов.

– ассимиляторная – большой роли не играет. Микробы используют азот нитратов для построения органического вещества:

$NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NO \rightarrow NH_4OH \rightarrow NH_4 \rightarrow$ аминокислоты $\rightarrow$ белок $\rightarrow NH_3$

– диссимиляторная – микробы используют кислород нитрата для получения энергии в результате нитратного дыхания:

$NO_3 \rightarrow NO_2 \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$

Возбудители – денитрифицирующие бактерии:

Pseudomonas fluorescens

Pseudomonas studzeri

Paracoccus denitrificans

Характеристика:

- Грам - ;
- палочки, кокки;
- неспоровые;
- подвижные;
- гетеротрофы;
- факультативные анаэробы:

Есть кислород – окисление:

$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 = 6CO_2 + 6H_2O$ + эн.

Нет кислорода – нитратное дыхание:

$5C_6H_{12}O_6 + 24KNO_3 = 24KHCO_3 + 6CO_2 + 18H_2O + 12N_2$ + эн.

Условия для прохождения денитрификации: **анаэробные**.

Мера борьбы: обработка почвы.

2. Косвенная (химическая) – это химическое восстановление нитратов, которое происходит только в кислой среде pH мене 5,5.

$$RCHNH_2COOH + HNO_3 = RCHOHCOOH + H_2O + N_2$$

Меры борьбы: известкование почв.

Иммобилизация азота.

Это использование микроорганизмами аммиачного азота для построения своего органического вещества.

Перевод аммиачного азота в тело микробов.

Процесс обратный аммонификации.

Значение:

1. Процесс носит отрицательный характер, т.к. азот становится недоступным для растений.
2. Поздно осенью иммобилизация полезна, т.к. азот закрепляется в почве и не вымывается.

Соотношение в почве процессов аммонификации и иммобилизации зависит от баланса углерода к азоту в органическом веществе почвы.

У микроорганизмов на каждые 100 г органического вещества приходится 50 г углерода и 2 г азота. Идеальный баланс углерода к азоту в почве для микроорганизмов 25:1.

При узком соотношении менее 25:1 в почве преобладает аммонификация над иммобилизацией.

Например: при внесении в почву сушенной крови (соотношение углерода к азоту 4:1), микробы чтобы получить углерод разлагают это вещество и выделяют аммиак.

При широком соотношении более 25:1 в почве преобладает иммобилизация над аммонификацией.

Например: при внесении в почву соломы (соотношение углерода к азоту 100:1) микробы, чтобы получить азот, добирают его в аммиачной форме.

Иммобилизованный азот является биологически связанным (закреплен) в теле микробов. После их отмирания происходит реминерализация иммобилизированного азота с выделением аммиака.

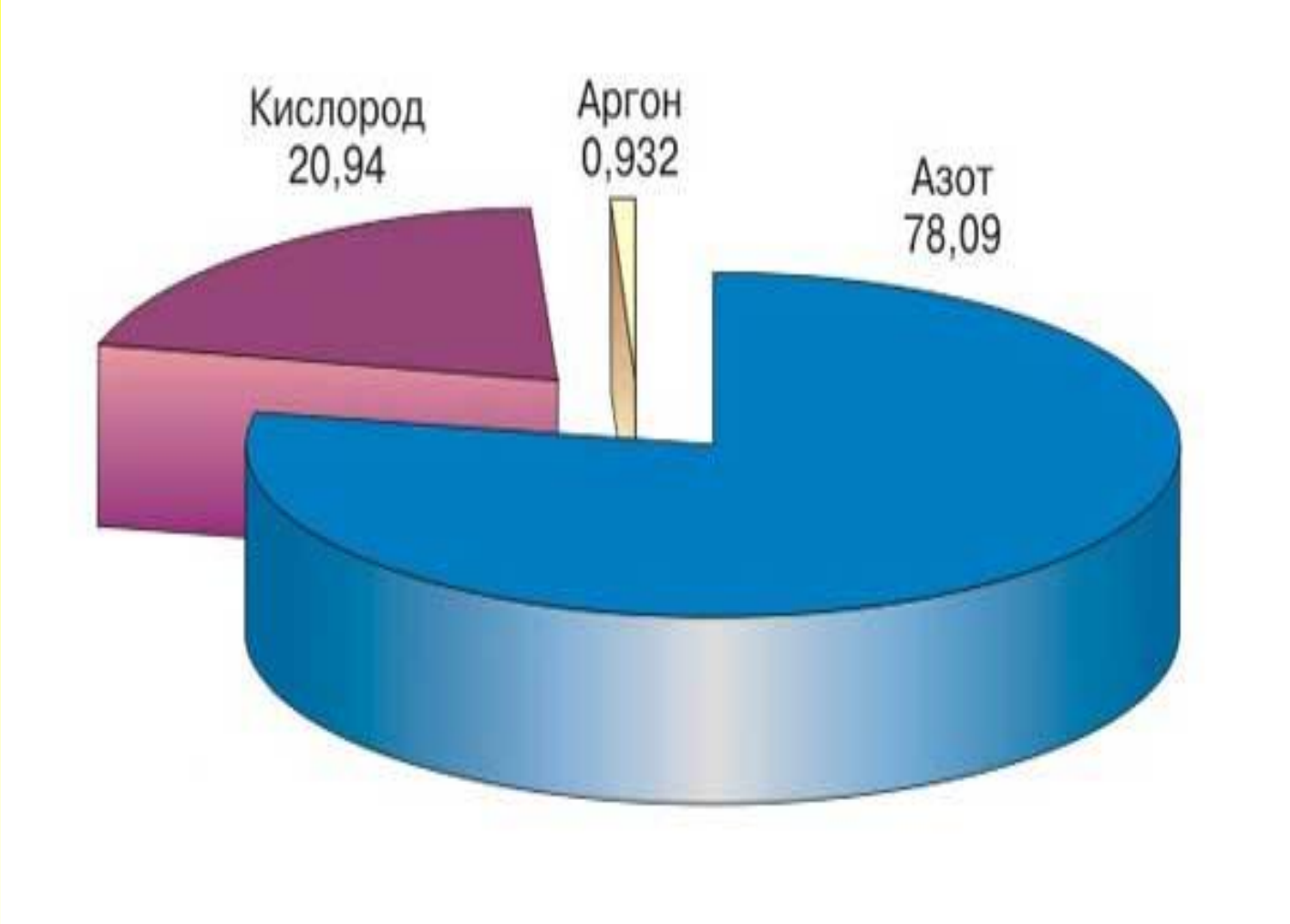
Биологическая азотфиксация.

Азотфиксация - это процесс, характерный только для прокариотической клетки, усвоение молекулярного азота азотфиксирующими микроорганизмами для построения своего органического вещества.

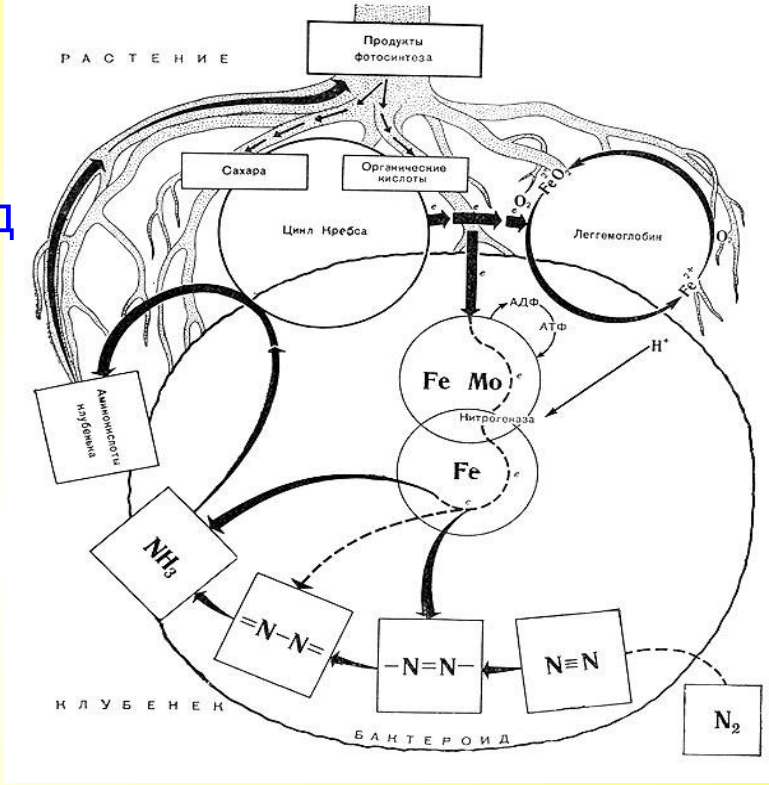
Способны фиксировать молекулярный азот:

- Сине-зеленые водоросли (Цианобактерии);
- Аэробные и анаэробные бактерии;
- Некоторые актиномицеты (Франки).

6. Биологическая азотфиксация



БИОЛОГИЧЕСКАЯ АЗОТФИКСАЦИЯ - усвоение некоторыми микроорганизмами молекулярного азота атмосферы и перевод его в органические соединения (образуют аммиак, который служит исходным веществом для образования белков).



N_2 N≡N энергия этой связи 225 ккал.

Фермент способный разорвать эту связь – **нитрогеназа**

Химизм: Процесс усвоения азота происходит по восстановительному пути:

Схема восстановления:

$N{\equiv}N + 2H \rightarrow Mo \rightarrow HN{=}NH + 2H \rightarrow H_2N{=}NH_2 + H_2 \rightarrow 2NH_3 \rightarrow R{-}CH_2{-}COOH$

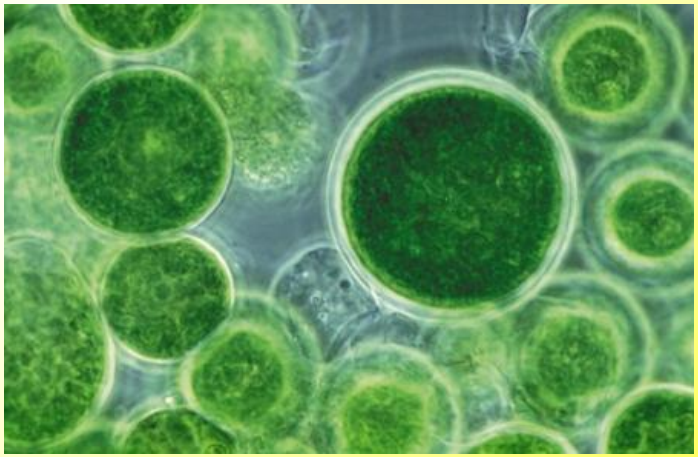
(диимид) (гидразин) (аминокислота)

Процесс играет огромную роль в природе, так как происходит превращение азота в доступные для растений формы, повышается почвенное плодородие.

Микроорганизмы, способные фиксировать молекулярный азот:

1. **Сине-зеленые водоросли** (цианобактерии род ***Nostoc, Anabaena***);

Синезёленые водоросли. Анабена (Anabena).

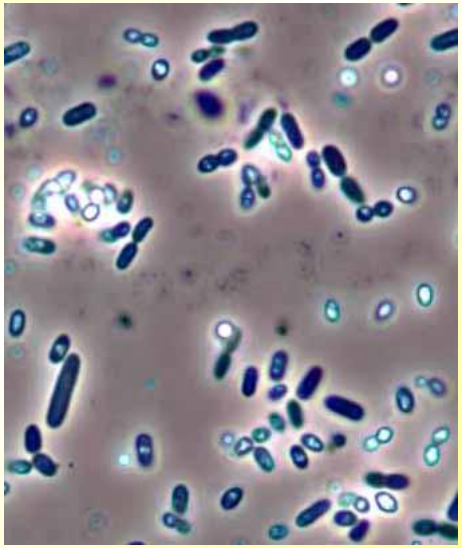


2. Симбионты небобовых растений – род *Frankia* (Франки)

Frankia on the roots of *Shepherdia argetea*
(Шефердия серебристая).

Symbiotic N-fixation in *Alnus viridis*
(Ольха зелёная)

3. Бактерии:



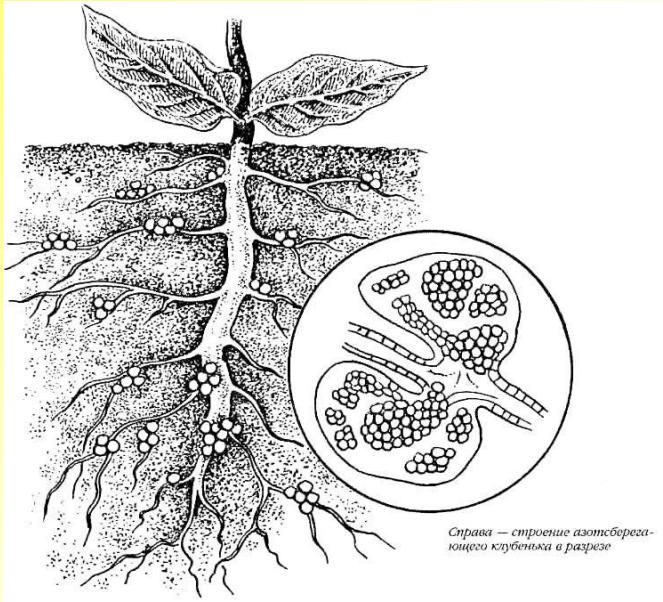
3.1. Свободноживущие:

– Аэробы (Род *Azotobacter*);

– Анаэробы (Род *Clostridium*).

3.2.Симбиотические:

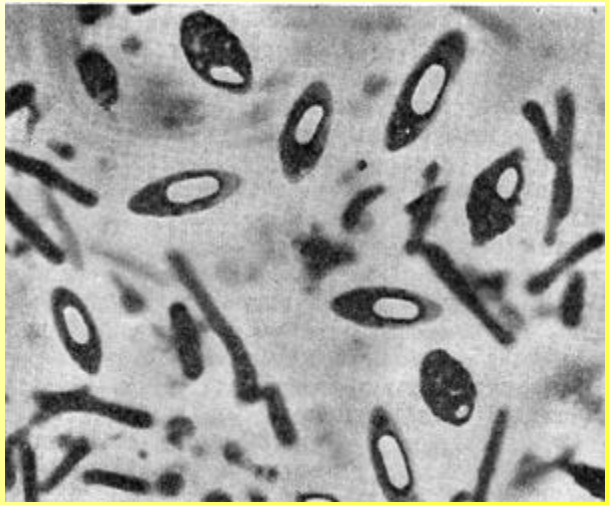
– Симбионты бобовых растений (Род *Rhizobium).*



СВОБОДНОЖИВУЩИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ

Живут в почве самостоятельно и используют молекулярный азот для построения органического вещества, после их отмирания они минерализуются, а азот выделяется в виде аммиака.
Накапливают до 40 кг/га азота.

Анаэробные свободноживущие азотфиксаторы:
Наиболее сильная азотфиксирующая способность у маслянокислой бациллы – Clostridium pasteurianum.
Фиксирует 5-10 мг азота на 1 г потребленного источника углерода.



Характеристика: Грам+, палочки, подвижные, споровые, спорорасположение клостридиальное, запасное вещество гранулеза, облигатные анаэробы, используют моно- ди- и полисахариды, геторотрофы.

Широко распространен в наших почвах. Встречается в почвах с pH от 4,5 до 9, оптимальная pH = 7.

Оптимальные условия для его развития:

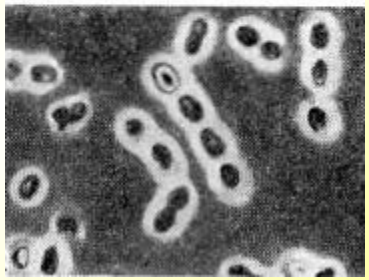
– анаэробные условия;
– нейтральная среда;
– влажность 60-80% ПВ;
– наличие органического вещества.

Другие анаэробные свободноживущие азотфиксаторы:

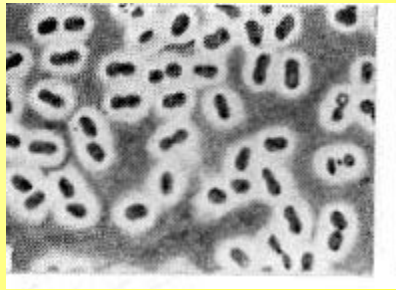
1. Clostridium butylicum
2. Clostridium pectinovorum
3. Clostridium omelianum
4. Коринебактерии
5. Зеленые и пурпурные серные бактерии

Аэробные свободноживущие азотфиксаторы.
Открыты в 1901 году Бейеринком (Azotobacter chroococcum).

Относятся к семейству Azotobacteriaceae
Род. Azotobacter



Представители:
1. Azotobacter chroococcum;



2. Azotobacter vinelandii;

3. Azotobacter agilis.

Фиксирует 10-15 мг азота на 1 г потребленного источника углерода.

Характеристика:

Грам- , в молодом возрасте подвижные палочки с возрастом становятся неподвижными крупными кокками. Кокки соединяются попарно и покрыты общей капсулой, неспоровые, аэробы, гетеротрофы, используют моно- ди- и полисахариды, ароматические вещества.

Азотобактер требователен к плодородию и окультуренности почвы.

Оптимальные условия для его развития:

– аэробные условия;
– pH – 7,2-8;
– влажность 60-80% ПВ;
– наличие органического вещества;
– высокая потребность в фосфоре, калии, кальции, молибдене, боре.

Azotobacter chroococcum используется для микробной индикации плодородия и окультеренности почв. Этот микроб выделяет биологические активные вещества: витамины, гормоны, антибиотики против патогенов, ферменты.

Из него готовят бактериальное удобрение азотобактерин (ризофил).
Обрабатывают этим удобрением семена перед посевом не бобовых культур: овощные, картофель, зерновые только на плодородных окультуренных почвах. При этом прибавка урожая составляет 20-30%.

Другие представители семейства Azotobacteriaceae:

Род. Beijerinekia (Бейеринкия)
Распространен в почвах южного полушария, образует слизистые красно-коричневые колонии. Любит кислые почвы, отличается кальцефобностью;

Род. Azomonas
Распространен в почвах тропиков;

Род. Derxia
Распространен в почвах тропиков, образует коричневые колонии, красноземы.

Цианобактерии – сине-зеленые водоросли.
Могут фиксировать молекулярный азот, как в симбиозе, так и в свободноживущем состоянии.

Свободноживущие цианобактерии есть в почвах всех типов. Фиксируют азот только многоклеточные цианобактерии: Nostoc и Anabaena.

Характеристика:
Аэробы, влаголюбивые, нейтрофилы, фотолитоавтотрофы, 70-100 кг азота на 1 га. Широко используют как бактериальное удобрение, особенно при выращивании риса.

АССОЦИАТИВНЫЕ АЗОТФИКСАТОРЫ.

Занимают промежуточное положение между свободноживущими и симбиотическими азотфиксаторами.

Как свободноживущие, они живут самостоятельно и имеют свой собственные механизм азотфиксации.

Как симбиотические, они имеют более тесное отношение с растениями.

Ризосфера – около корня.

Ризоплана – на поверхности корней.

Эпифиты – живут на поверхности растений, а некоторые проникают внутрь корней, листьев, стеблей.

Эффект от них выше, чем от свободноживущих.

К ассоциативным бактериям относят:

Азоспирилла – azospirillum

Впервые выведен из ризосферы. В настоящее время широко практикуется использование азоспириллы, как бактериального удобрения.

Klebsiella

Мелкая палочка, капсульная, неподвижная, неспоровая, факультативный анаэроб.

Flavobacterium

Палочки, неспоровые, подвижные. Развиваются в ризосфере кормовых трав.

Из ассоциативных бактерий готовят бактериальные удобрения:

Ризобактерин

Основа биопрепарата: ассоциативные азотфиксирующие бактерии *Klebsiella planticola*

Диазофит

Мизорин

СИМБИОТИЧЕСКИЕ АЗОТФИКСАТОРЫ.

Фиксируют азот атмосферы живя только в симбиозе.
К ним относят:

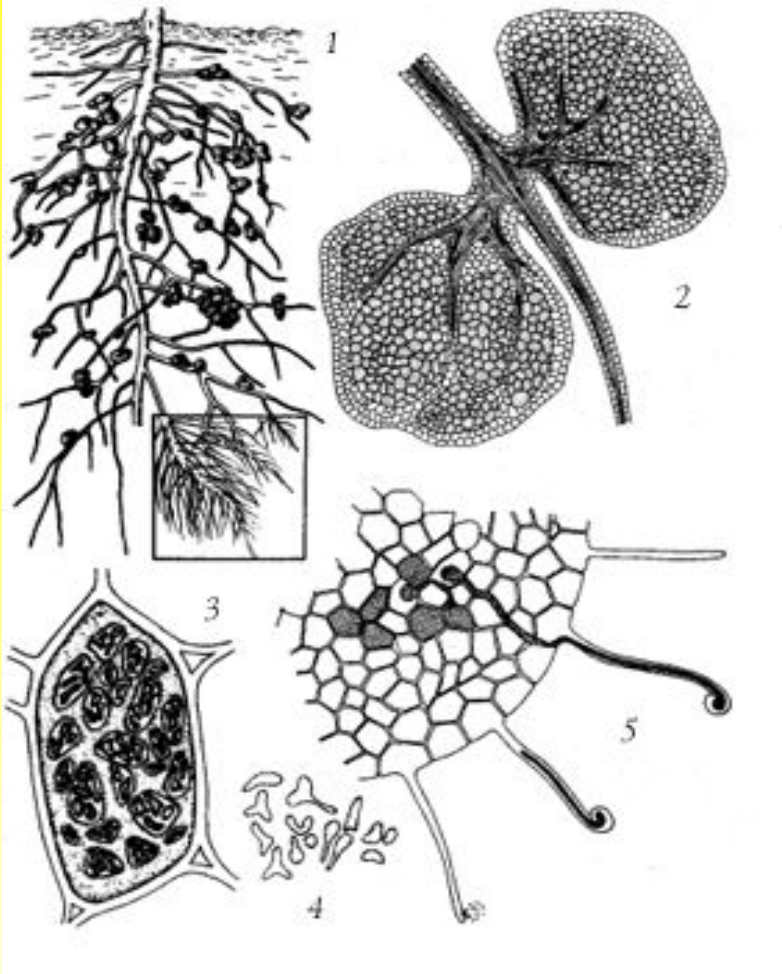
Цианобактерии – они образуют экзосимбиоз с грибами – лишайники (при более низкой температуре).
Симбиоз с водными папоротниками – азотфиксирующая способность 100-120 кг/га азота. Азотфиксация идет при повышенной влажности и температуре.

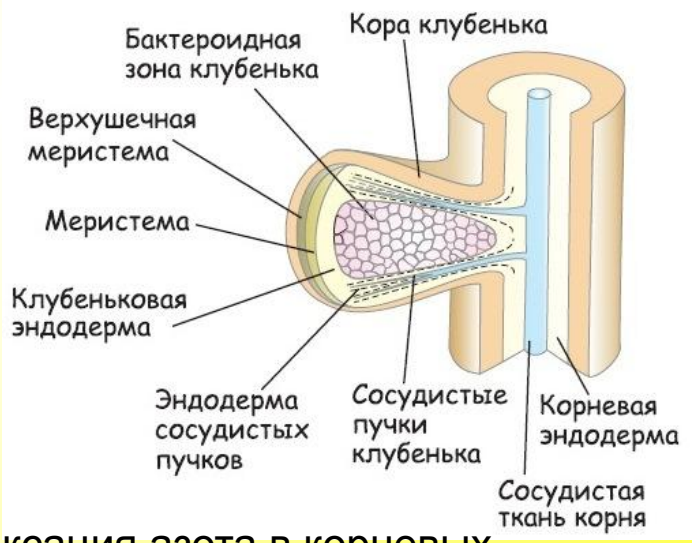
Актиномицеты (франки) – симбиоз с покрытосеменными высшими растениями. Они образуют клубеньки, которые называются **актинориза**.
В европейских странах используют для обработки семян и корней (инокуляция).

Клубеньковые бактерии бобовых растений = ризобии. Образуют эндосимбиоз (внутри ткани).
Относятся к роду Rhizobium.

Свойства клубеньковых бактерий:

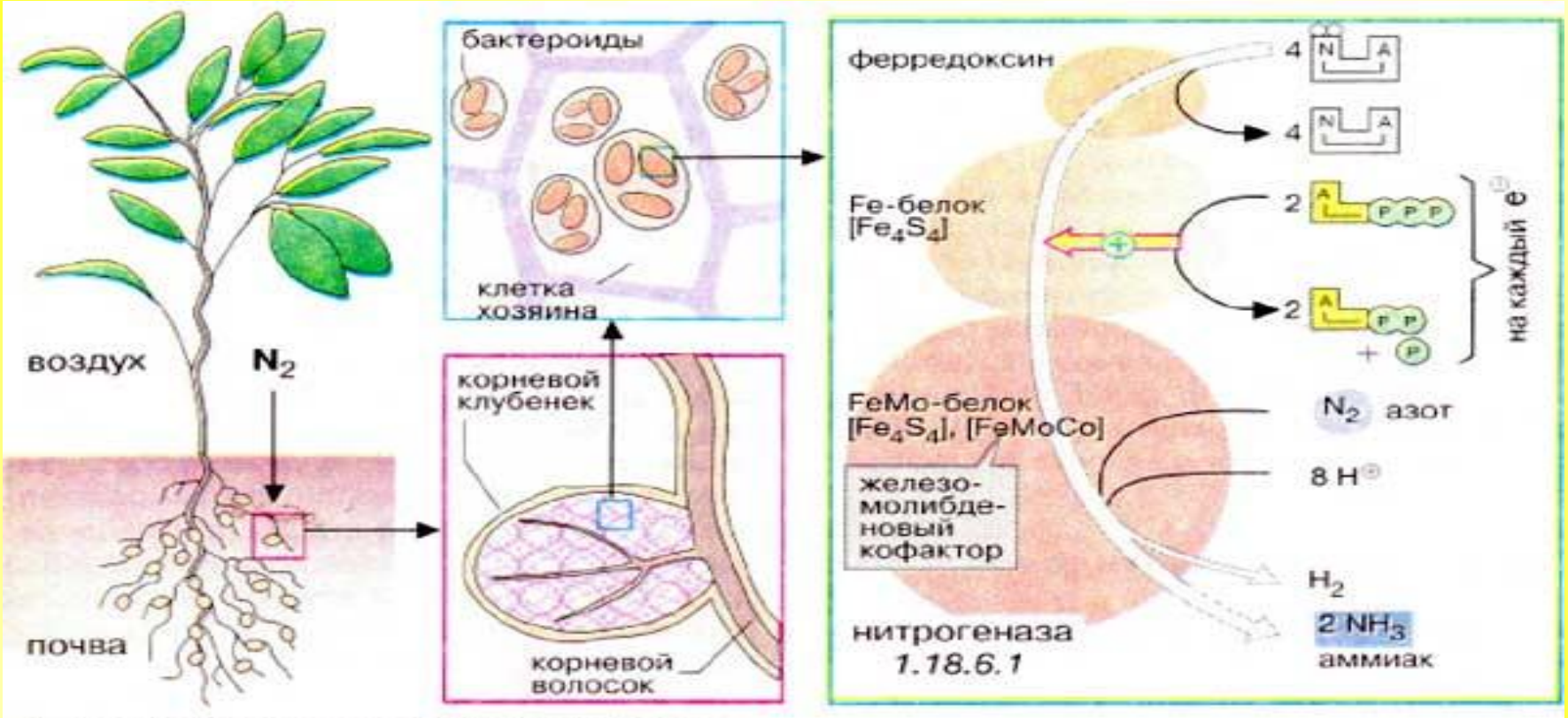
1. Вирулентность – способность проникать и развиваться внутри ткани корня;





Симбиотическая фиксация азота в корневых клубеньках бобовых:
1 – корень гороха с клубеньками;
2 – клубеньки в разрезе;
3 – растительная клетка в разрезе, заполненная бактериями;
4 – бактерии, находящиеся в клетках растения приобретают необычную форму;
5 – внедрение бактерий через кончики корневых волосков, и рост инфекционных нитей

2. Активность – способность фиксировать азот атмосферы;



Азотфиксирующая способность клубеньковых бактерий:

Однолетние травы 50-100 кг/га азота

Многолетние травы 150-300 кг/га азота.

3. Специфичность – разным видам бобовых растений присущи определенные виды клубеньковых бактерий:

Rhizobium trifolii – клевер;

Rhizobium leguminosarum – горох, бобы, вика, чина;

Rhizobium phaseoli – фасоль;

Rhizobium lupini – люпин;

Rhizobium jponicum – соя.

Бактероиды (под микроскопом):
I - посевной вики; II - клевера; III - люцерны; IV - мохнатой вики

Характеристика:

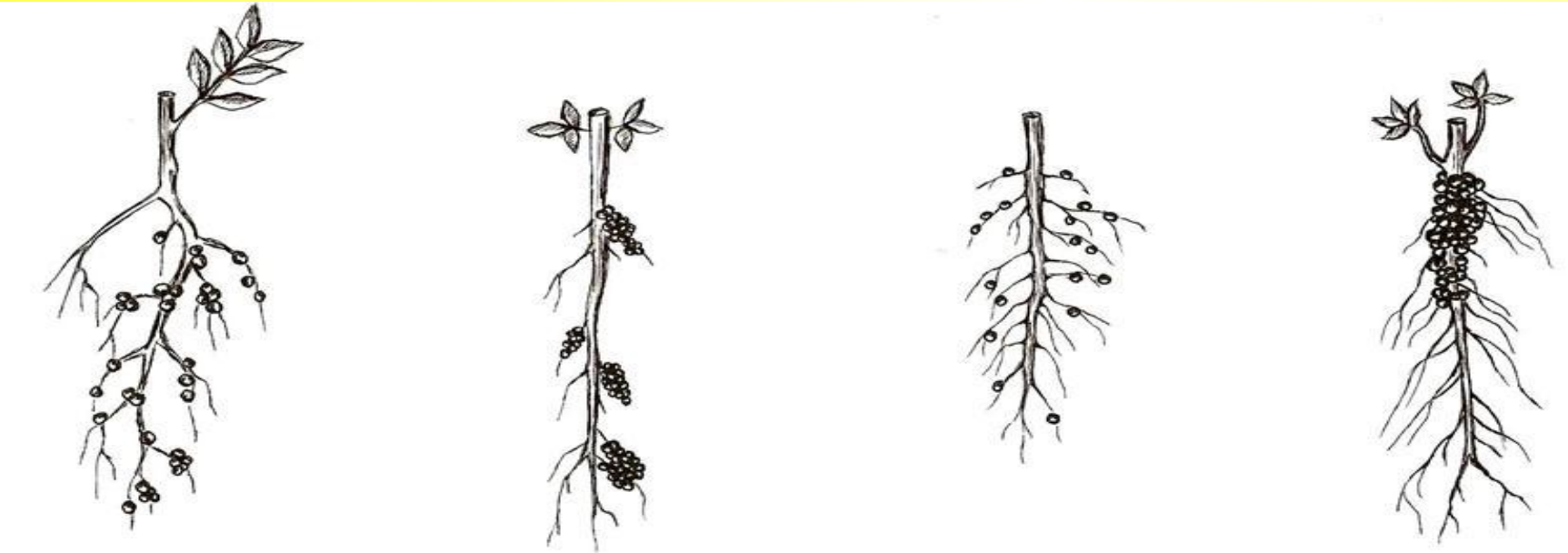
Грам- , молодые клетки палочки, подвижны, азот фиксировать не могут.

Попадая в растение они теряют подвижность и переходят в состояние «опоясанных палочек», которые образуют бактероиды. Именно бактероиды фиксируют азот атмосферы.

По форме они различные: т-образная, у-образная, сферическая, грушевидная и др. Крупные, неподвижные.

Клубеньковые бактерии неспоровые, гетеротрофы, нейтрофилы и мезофилы.

Активные клубеньки более крупные, находятся ближе к стеблю и имеют розовую окраску. Неактивные – на периферии и более мелкие.



Клубеньки на корнях:

люпина ***люцерны*** ***фасоли*** ***вики***

Суть симбиоза: растение обеспечивает бактерии органическим углеродом и условиями для жизни, а бактерии обеспечивают растение азотом на 2/3 их потребности.

Оптимальные условия для клубеньковых бактерий:

1. pH = 6,5-7,5, min - 4,0-4,5;
2. Температура 24-26, min ниже 0 и выше 35;
3. Влажность 60-70% ПВ, min -16%;
4. P и K усиливают азотфиксацию;
5. Микроэлементы B и Mo усиливают азотфиксацию;
6. Азот минеральных удобрений подавляет азотфиксацию.

Из клубеньковых бактерий готовят бактериальные удобрения:

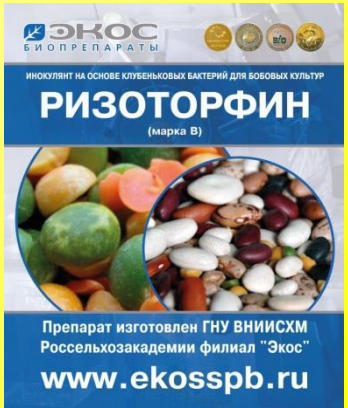
Нитрагин

Две его формы:

1. Ризоторфин – торфяной нитрагин
2. Ризобин – порошковый нитрагин

Обрабатывают семена перед посевом бобовых растений и строго специфично – бактеризация или инокуляция семян.

Прибавка урожая составляет 30-40%.



Развитие корневой системы при применении Ризоторфина

Ризофос

3-х марок:

«Галега» на основе клубеньковых бактерий ***Rhizobium galegae***

«Люцерна» на основе клубеньковых бактерий ***Rhizobium meliloti***

«Клевер» на основе клубеньковых бактерий ***Rhizobium trifolii***

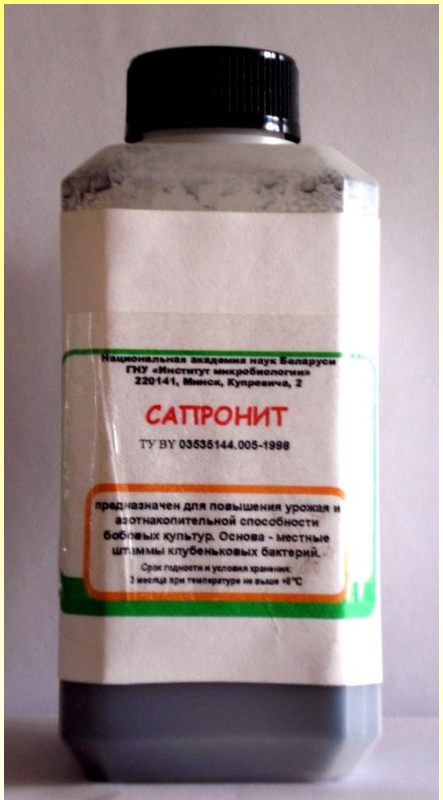
Норма внесения: **200мл** на 1 гектарную норму высева семян

СояРиз

на основе клубеньковых бактерий

Rhizobium japonicum

Норма внесения: **200г /гектарную *норму семян***



Сапронит

Состав: живая культура симбиотических азотфиксирующих бактерий рода *Rhizobium*, специфических для каждого вида бобовых растений.

Вогал

Основа биопрепарата: клубеньковые бактерии *Rhizobium galegae*

Ризобофит (Украина)

МИКРОБНЫЕ УДОБРЕНИЯ ПОЗВОЛЯЮТ:

-уменьшить дозы вносимых минеральных азотных и фосфорных удобрений на 20-30%;

-повысить урожайность сельскохозяйственных культур на 15-30%

-повысить качество и безопасность выращиваемой продукции;

-обеспечить устойчивость растений к неблагоприятным условиям окружающей среды