

ЛЕКЦІЯ № 10

Тема: Роль мікроорганізмів у кругообігу речовин. Трансформація азотовмісних речовин

План

1. Роль мікроорганізмів у кругообігу азоту.
2. Амоніфікація.
3. Нітрифікація.
4. Денітрифікація.
5. Азотфіксація.

1. Роль мікроорганізмів у кругообігу азоту

Мікроорганізми відіграють найважливішу роль в існуванні біосфери Землі. Виконуючи функції редуцентів у ланцюгах живлення, мікроорганізми розкладають різні органічні речовини, перетворюючи їх у мінеральні речовини. Кінцевими продуктами мінералізації є вуглекислий газ і вода, інші газоподібні продукти. Відбувається не тільки деструкція органічних речовин, але й регуляція газового складу атмосфери. Провідна роль прокаріот визначається величезною чисельністю мікроорганізмів, їх поширенням, фізіологічною універсальністю.

Найважливішим мінеральним елементом є азот. Провідна роль у процесах трансформації азотовмісних сполук належить мікроорганізмам. Цикл трансформації азотовмісних речовин здійснюється рядом взаємозалежних процесів: *амоніфікації, нітрифікації, денітрифікації, фіксації молекулярного азоту*. Перетворення мінеральних форм азоту в білок мікроорганізмів – *імобілізація*.

Амоніфікація – процес мінералізації органічних азотовмісних речовин, що супроводжується виділенням аміаку. Здійснюють його різні групи мікроорганізмів. У процесі життєдіяльності мікроорганізмів частина найбільш складних органічних азотовмісних речовин запасається в ґрунті у вигляді гумусу. Амоніфікація є принципово важливим процесом у циклі трансформації азоту, у результаті якого наша планета очищається від продуктів рослинного, тваринного й мікробного походження.

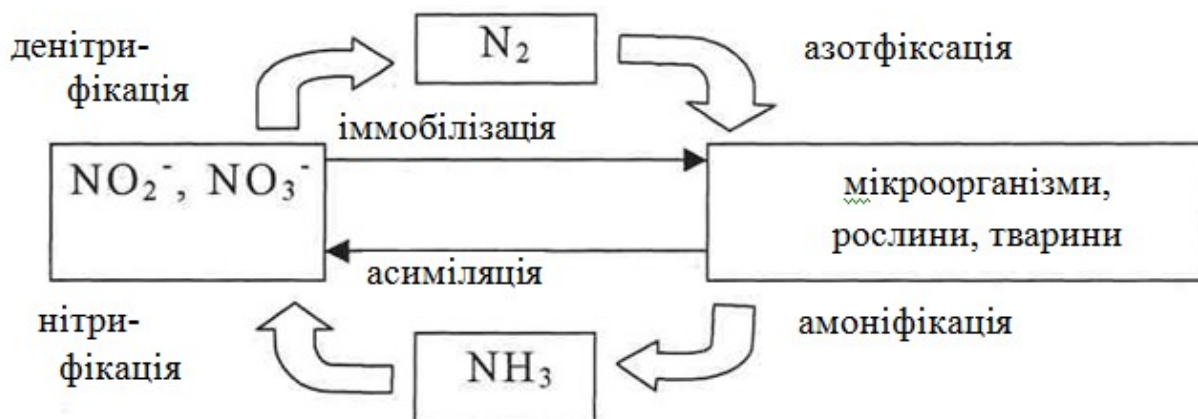
Нітрифікація – процес окиснення аміаку до нітритів і нітратів. Здійснюють цей процес бактерії, що нітрифікують, у строго аеробних умовах.

Денітрифікація – процес відновлення нітритів і нітратів денітрифікуючими бактеріями до вільного азоту. Цей процес шкідливий для сільського господарства, тому що приводить до часткового виносу (приблизно 20 %) азоту із ґрунту.

Біологічна фіксація молекулярного азоту включає процеси фіксації молекулярного азоту атмосфери вільноживучими й симбіотичними формами мікроорганізмів шляхом біологічного відновлення до аміаку.

Біологічна азотфіксація є найважливішим шляхом поповнення запасів азоту в ґрунті. Підраховано, що глобальна азотфіксація у водних системах щорічно досягає 190 млн. тонн азоту, а на суші вона становить 130 млн. т на рік, у той час як світове виробництво азотних добрив поки не перевищує 60–70 млн. т.

У природі постійно відбувається кругообіг азоту, у якому беруть участь рослини, тварини і мікроорганізми. Це досить складний процес, який можна подати за такою схемою:



З наведеної схеми видно, що деяка частина атмосферного азоту зв'язується з вільноживучими і симбіотичними **азотфіксувальними** мікроорганізмами, що збагачує ґрунт і рослини азотом. Органічні рештки рослинних і тваринних організмів, які потрапляють у ґрунт, мінералізуються **амоніфікуючими** мікроорганізмами до амонійних сполук (аміак тощо). Амонійна форма азоту у ґрунті далі окислюється **нітрифікуючими** бактеріями і перетворюється до нітритів і нітратів, які під впливом **денітрифікуючих** бактерій за певних умов можуть відновлюватися до молекулярного азоту.

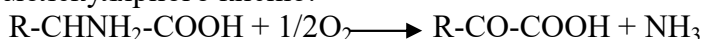
2. Амоніфікація

Різноманітні органічні азотовмісні сполуки становлять до 99 % усього запасу азоту. Перше місце серед них займають білки, на частку яких припадає не менше 50 % від органічних азотовмісних сполук.

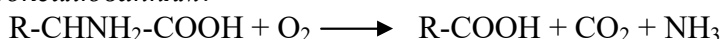
Процес амоніфікації білків полягає в діяльності амоніфікуючих бактерій, які виділяють у середовище протеолітичні екзоферменти, які каталізують розщеплення пептидних зв'язків у молекулах білків з утворенням більш дрібних поліпептидів і олігопептидів. Останні відносно легко проникають через цитоплазматичну мембрану в бактеріальну клітину, де розщеплюються внутрішньоклітинними ферментами пептидазами до амінокислот. Амінокислоти, що утворюються, безпосередньо включаються в біосинтетичні процеси мікробної клітини або слугують одним з основних субстратів для процесів катаболізму.

Руйнування амінокислот починається з їх *дезамінування*, тобто з відщеплення аміногрупи від молекули амінокислоти, що призводить до виділення аміаку. Процес дезамінування амінокислот відбувається різними шляхами.

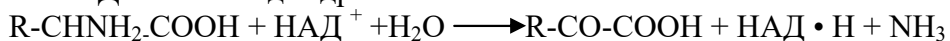
1) Найбільш часто спостерігається *окислювальне дезамінування* амінокислот при участі молекулярного кисню:



2) Нерідко окислювальне дезамінування амінокислот супроводжується *декарбоксілюванням*:



3) Багато амінокислот зазнають *гідролітичного* (у присутності води) *дезамінування* за допомогою НАД-залежних дегідрогеназ:



Подальша доля вуглецевмісних продуктів процесу дезамінування амінокислот може бути різною. Деякі з них, такі, як піровиноградна, а-кетоглутарова, щавлево-оцтова

кислоти безпосередньо включаються в процеси клітинного метаболізму, інші (більшість органічних кислот) зазнають наступної трансформації.

В **аеробних умовах** процес дезамінування амінокислот йде, як правило, енергійно й завершується окисненням вуглецевого залишку до кінцевих продуктів – вуглекислого газу, води й сульфатів.

В **анаеробних умовах** деякі амінокислоти зазнають декарбоксілювання з утворенням CO₂ і первинних амінів. До останніх належать високотоксичні сполуки кадаверин, путресцин і агматин, відомі за назвою *трупних отрут*.

Анаеробне зброджування амінокислот супроводжується накопиченням у середовищі специфічних речовин з різким неприємним запахом – аміаку, сірководню, індолу й скатолу. Тому в побуті процес анаеробної амоніфікації білків отримав назву *гниття*.

У процесі амоніфікації білків беруть участь різні групи мікроорганізмів, що поступово змінюють один одного.

В **аеробних умовах** амоніфікацію білків розпочинають неспорові бактерії, що відносяться до родів *Micrococcus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Proteus*, а також мікобактерії (*Mycobacterium*) і цвілеві гриби. На зміну їм приходять різні види бацил (*Bacillus subtilis*, *Vac. megaterium*, *Vac. mycoides* і ін.). На завершальних етапах у процес аеробної амоніфікації включаються актиноміцети.

В **анаеробних умовах** процес амоніфікації ведуть бактерії роду *Clostridium* (*Cl. cadaveris*, *Cl. paraputrificum* і ін.). Амоніфікація складних білків включає початкове розщеплення молекул на основні компоненти – білок і простетичну групу. Подальша амоніфікація білків здійснюється за звичайною схемою.

Амоніфікація нуклеїнових кислот. Складними полімерними сполуками є нуклеїнові кислоти – ДНК і РНК. *Амоніфікація нуклеїнових кислот* починається з гідролітичного розщеплення їх на мононуклеотиди за участю ферментів рибонуклеази й дезоксирибонуклеази. Далі від мононуклеотида відщеплюється спочатку залишок фосфорної кислоти, потім цукор. Утворені азотовмісні основи розкладаються до сечовини й амінокислот, а останні в кінцевому підсумку до аміаку й органічних кислот. Відщеплені від мононуклеотидів цукру в **аеробних умовах** окислюються до кінцевих продуктів вуглекислого газу й води, а в **анаеробних умовах** зазнають повільного зброджування.

Гідроліз сечовини. Дезамінування можуть зазнати й *органічні азотовмісні речовини небілкової природи*, такі, як сечовина, сечова й гіпурова кислоти, що входять до складу сечі людини і тварин. Сечовина є одним із продуктів життєдіяльності грибів і утворюється при гідролітичному розпаді аргініну. Багато мікроорганізмів здатні використовувати сечовину як джерело азоту для синтезу власних білків.

Під дією ферменту уреази, що виділяється мікроорганізмами, відбувається гідроліз сечовини з утворенням вуглекислого амонію, який майже відразу ж розкладається на складові компоненти – аміак, вуглекислий газ і воду.

Бактерії, що розкладають сечовину, одержали назву *уробактерій*. До них відносяться *Sporosarcina ureae*, *Micrococcus ureae* і *Bacillus pasteurii*. Специфічною рисою уробактерій є їх здатність розвиватися в лужному середовищі. Сечова й гіпурова кислоти також руйнуються рядом мікроорганізмів у процесі реакцій їх енергетичного метаболізму.

3. Нітрифікація

Аміак, що утворюється в процесі амоніфікації в ґрунті й воді, порівняно швидко окислюється *нітрифікуючими бактеріями* до нітритів і нітратів. Про мікробіологічну природу процесу нітрифікації вперше висловив припущення Л. Пастер. Пізніше, у 1890–1892 рр., С.Н. Виноградський виділив нітрифікуючі бактерії у чисту культуру й показав, що процес нітрифікації протікає у дві фази.

4. Денітрифікація

Нітрати в ґрунті витрачаються досить інтенсивно. Частина їх споживається в процесі живлення рослин і самих мікроорганізмів, частина вимивається із ґрунту, а деяка кількість нітратів відновлюється до газоподібної форми азоту в процесі денітрифікації.

Слід розрізняти денітрифікацію *пряму* й *непряму*.

Під *прямою денітрифікацією* прийнято розуміти біологічне відновлення нітратів і нітритів, здійснюване мікроорганізмами.

Непряма денітрифікація – це чисто хімічний процес взаємодії нітритів з амінокислотами, у результаті якого утворюється молекулярний азот. Непряма денітрифікація характерна для кислих ґрунтів при рН середовища нижче 5,5.

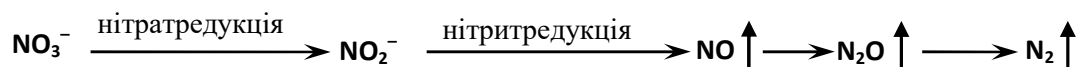
У природі більш поширена пряма денітрифікація. Вона підрозділяється на *асиміляторну* й *дисиміляторну*.

При *асиміляторній* денітрифікації нітрати споживаються як джерело азоту й відновлюються до аміаку, який витрачається клітиною в процесі біосинтезу. До асиміляційної денітрифікації здатні рослини й багато бактерій.

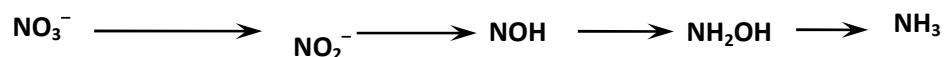
У процесі *дисиміляторної* денітрифікації нітрати й нітрити виступають у ролі акцепторів електронів у реакціях катаболізму денітрифікуючих бактерій. Дисиміляційну денітрифікацію ведуть *хемоорганогетеротрофні* бактерії, що відносяться до родів *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium* і ін.

Залежно від виду мікроорганізму, кінцевими продуктами відновлення нітратів є молекулярний азот, оксид азоту (I) або оксид азоту (II).

Дисиміляторна денітрифікація:



Асиміляторна денітрифікація:



Клітини денітрифікуючих бактерій мають досить досконалий дихальний ланцюг, що дозволяє їм вести процеси катаболізму, як в аеробних, так і в анаеробних умовах. Одними з важливих ферментів денітрифікуючих бактерій є *нітратредуктази*, що каталізують перенесення електронів на азот нітратів. Синтез нітратредуктаз в клітині відбувається тільки в анаеробних умовах при наявності нітратів у середовищі.

Здатність до дисиміляторної денітрифікації мають факультативно-анаеробні бактерії, що живуть в основному в ґрунті й воді.

Мезофіли: *Paracoccus*, *Pseudomonas denitrificans*, *Ps. fluorescens*, *Ps. aeruginosa*.

Термофіли – р. *Bacillus* (55 – 65°C).

Органіка окислюється при денітрифікуючому диханні до CO₂ і H₂O. У результаті денітрифікації ґрунт збіднюється.

У природі денітрифікуючі бактерії, а відповідно й процеси денітрифікації, широко поширені. Денітрифікуючі бактерії живуть у прісних і солоних водоймах, у різних типах ґрунтів. Із усіх видів денітрифікації основний збиток сільському господарству наносить дисиміляційна денітрифікація, тому що саме вона в основному й призводить до зниження запасів азоту в ґрунті й у водоймах. Підраховано, що втрати азотних добрив, внесених у ґрунт, у результаті денітрифікації нерідко становлять від 5 до 10%. Особливо активно денітрифікація протікає на важких, сильно перезволожених ґрунтах. Для боротьби з денітрифікацією рекомендується розпушування ґрунту з метою створення аеробних умов

життя денітрифікуючим бактеріям.

5. Біологічна фіксація молекулярного азоту

Інтерес до проблеми біологічної фіксації молекулярного азоту атмосфери обумовлений істотною роллю біологічного азоту в азотному балансі біосфери. Вирішення цієї проблеми є перспективним у плані одержання дешевого й зовсім нешкідливого для здоров'я людини й навколишнього середовища біологічного азоту для забезпечення потреб сільського господарства.

Запаси мінерального азоту в ґрунті невеликі й у середньому становлять 150 кг на 1 га орного шару. Запаси молекулярного азоту в атмосфері практично невичерпні. Над кожним гектаром ґрунту міститься такий запас азоту, який міг би забезпечити високі врожаї рослин протягом мільйонів років. Однак молекулярний азот не може бути використаний ні рослинами, ні тваринами організмами.

Азотфіксація – це унікальний процес, характерний тільки для прокариотичної клітини. Серед царства прокариот здатні фіксувати молекулярний азот різні аеробні й анаеробні бактерії й деякі актиноміцети. Усі азотфіксуючі мікроорганізми умовно можна підрозділити на дві групи: *вільноживучі* в ґрунті й *симбіотичні*, що вступають у симбіоз із вищими рослинами. Згідно з підрахунками щорічно культурні рослини виносять із ґрунту близько 100 млн. т азоту. Дефіцит азоту в ґрунті повнюється за рахунок біологічної азотфіксації. Підраховано, що вільноживучі азотфіксуючі мікроорганізми фіксують по 15-18 кг азоту на 1 га.

Фіксація азоту асоціативними мікроорганізмами

Ще в першому столітті до нашої ери греки й римляни писали про підвищення врожаю бобовими рослинами (симбіоз з бактеріями). Перші роботи в цьому напрямку, проте не досить вдалі, належать Ж. Бусенго (1838), який вирощував конюшину і горох у піщаному ґрунті, і припустив, що висока врожайність бобових пов'язана з їхньою здатністю асимілювати атмосферний азот. При повторному досліді у 1858 р. він отримав протилежні результати: бажаючи видалити сліди азотних сполук, він прожарював пісок і поливав рослини тільки дистильованою водою. При цьому вчений не здогадувався, що таким чином знищує мікрофлору в піщаному субстраті.

1883 р. – Жоден – показав накопичення азоту в ґрунті в живильних середовищах (без азоту) в замкнених посудинах, де культивувалися мікроорганізми.

1885 р. – Бергло – підтвердив, що в стерильному ґрунті за літній період вміст азоту не змінився, а в нестерильному – збільшився.

1866 р. – Воронін М. С. – опублікував роботи про бактерії в тканинах бульбочок бобових рослин. Проте перші відкриття належать І. Лахману (1858 р.)

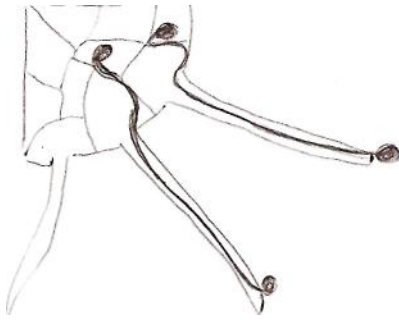
1886-1888 рр. – Хальригель і Вильфарт – довели взаємозв'язок між бульбочками на коренях бобових і фіксацією азоту. Їм вдалося довести, що бобові рослини, посіяні в прожареному піску, не утворюють бульбочок і не здатні фіксувати молекулярний азот з атмосфери.

1893 р. – Виноградський – виділив у чисту культуру анаероба *Cl. pasterianum*.

1901 р. – Бейеринк – відкрив аеробний мікроорганізм *Azotobacter chroococcus*.

Бульбочкові бактерії в симбіозі з рослинами родини Бобових (*Fabaceae*) дають за рік 100 – 200 кг азоту на 1 га, вільноживучі – 1–3 кг/га. Усього на Землі за рік утворюється 175×10^6 т N_2 .

Бульбочкові бактерії – рід *Rhizobium* – грамнегативні палички, сапрофіти, у вільному стані ростуть за рахунок органічних сполук. За специфічністю відносно рослини-хазяїна, а також за деякими іншими ознаками розрізняють кілька видів ризобій: *R. meliloti*, *R. phaseoli*, *R. lupini*, *R. japonicum*.



Бактероїди

Зараження рослин відбувається тільки через молоді кореневі волоски. Бактерії занурюються на самому кінці або близько кінця волоска й ростуть у вигляді *інфекційної нитки*, у якій скупчується величезна кількість бульбочкових бактерій, до його основи. Потім такі нитки, одягнені целюлозною оболонкою, проникають крізь тонкі стінки молодого епідермісу в кору кореня. Натрапивши тут на одну з тетраплоїдних клітин, нитка стимулює її поділ, а також і сусідніх диплоїдних клітин. Так утворюється бульбочка. Стимулювання йде за рахунок ростових речовин.

Бактерії в бульбочках розмножуються дуже швидко й утворюють великі клітини неправильної форми – *бактероїди*, об'єм яких у 10–12 разів перевищує об'єм вільноживучих *Rhizobium*. Бактероїди розташовуються окремо або групами, оточені мембраною, у цитоплазмі рослинних клітин. Тканина, заповнена бактеріями, має червонувате забарвлення, адже містить пігмент *леггемоглобін (фітоглобін)*, споріднений гемоглобіну. Він полегшує дифузію кисню через клітину рослини до бактероїду. Утворення пігменту – це специфічний результат симбіозу: простетична група (активний центр) синтезується бактероїдом, а білковий компонент – за участю рослини. Fe(II) - містить білок, котрий має високу спорідненість до кисню. Леггемоглобін захищає клітини бактероїда від високого парціального тиску кисню.

В основі специфічності симбіозу *Rhizobium* з рослиною-хазяїном лежить перший контакт з волоском кореневої системи. Бобові рослини містять *лектини* – глікопротеїни, здатні специфічно зв'язуватися з полісахаридами на поверхні бактероїда. Можливо, саме взаємодія лектинів кореневого волоска з поверхневими полісахаридами *Rhizobium* визначає, чи буде волосок інфікований. Якщо рослина і *Rhizobium* сумісні, то рослина забезпечує цукрами бактерії, а вони віддають у цитоплазму азот у формі іонів амонію – близько 95 %.

У деяких небобових рослин теж є бульби, здатні фіксувати азот. В основному це симбіоз з актиноміцетами р. *Franckia* (100–300 кг/га в рік). Розмір бульбочок може досягати величини тенісної кульки.

Ціанобактерії р. *Nostoc*, *Anabaena* відіграють велику роль у культивуванні рису (утворюють гетероцисти й нітрогеназу).

Фіксація азоту вільноживучими мікроорганізмами

До 1949 р. здатність до фіксації молекулярного азоту розглядалася як властивість лише *Clostridium* і *Azotobacter*. Після початку застосування радіоізотопного методу (N^{15}), а також реакції відновлення ацетилену до етилену, з'ясувалося, що до вільноживучих азотфіксаторів можуть бути зараховані: *Bacillus polymyxa*, ціанобактерії, метилотрофні, сульфатредуючі, метаноутворюючі бактерії. Особливо ефективним азотфіксатором є *Azotobacter*, який зв'язує 15-20 мг азоту на 1 г використаного цукру.

Azotobacter – грамнегативні, облігатні аероби, окислюють багато органічних речовин, у певних умовах пересуваються за допомогою джгутиків. Рясно виділяють слиз, мають темний пігмент – меланін. При нестачі поживних речовин утворюють цисти з товстими стінками. Багато розвиваються в ризосфері рослин. Утворюють 30-50кг азоту

на 1 га в рік. Азотобактер потребує нейтрального середовища, у кислих ґрунтах він не розвивається. Між азотобактером і целюлозоруйнівними мікроорганізмами існує явище *метабіозу* – у присутності мікроорганізмів, що розкладають целюлозу, азотобактер розмножується більш інтенсивно.

Представники р. *Azotobacter*: *A. chroococcus* (утворюють колонії чорного кольору), *A. vinelandii*, *A. agilis* (безбарвні колонії).

Ціанобактерії (40 видів) – мікроорганізми, які першими заселяють бідні (вулканічні) субстрати. Живуть в екстремальних умовах: в Антарктиді, на півночі в симбіозі з грибами лишайників. У внутрішніх водоймах і в деяких областях океану при розвитку ціанобактерій спостерігається «цвітіння води».

Хімізм фіксації молекулярного азоту

Процес зв'язування молекулярного азоту досить енергоємний. Зв'язування молекулярного азоту може відбуватися двома шляхами: *відновленням* або *окисненням*, кожен з яких є багатоступінчастим і каталізується своїми ферментативними системами.

Ферментна система, яка відповідає за фіксацію азоту, називається *нітрогеназою*. Вона складається з двох білкових компонентів:

1) *Перший компонент* – *молібдоферродоксин*, містить Mo , Fe і сульфідні групи, інактивується киснем;

2) *Другий компонент* – *азоферродоксин*, містить F і сульфідні групи, чутливий до кисню.

Нітрогеназа здійснює процес, при якому водень відновної сполуки переноситься на N_2 з утворенням NH_3 . Активування азоту і водню здійснюється *ферредоксином* – білком негемінової природи. Молекулярний азот і водень активуються електронами, які утворюються в ланцюзі ОВ процесів. Електрони передаються в нітрогеназну систему ферредоксином, який є відновником з низьким потенціалом і містить негемінове залізо.

Відновлення молекулярного азоту йде поетапно, через стадії утворення діаміна, гідразину, і в кінцевому підсумку, аміаку. Для відновлення однієї молекули азоту витрачається 12 молекул АТФ, що надходять із метаболізму клітини бактерії або рослини-симбіонта. Аміак вступає в реакції з органічними кетокислотами, утворюючи амінокислоти, що йдуть на побудову білків бактерій і рослин.