

BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION AND NITROGEN FIXERS

V. V. IGNATOV

The biochemical processes of binding of atmospheric nitrogen by certain species of bacteria, actinomyces, and algae determine nitrogen circulation on the Earth. In this article the reader will become acquainted with biological nitrogen fixation and certain microorganisms exhibiting the nitrogen-fixing capacity.

Биохимические процессы связывания атмосферного азота некоторыми видами микроорганизмов, актиномицетов и водорослей определяют круговорот азота на Земле. Статья знакомит читателя с явлениями биологической фиксации азота и некоторыми микроорганизмами, обладающими азотфиксирующими способностями.

© Игнатов В.В., 1998

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ АЗОТА И АЗОТФИКСАТОРЫ

В. В. ИГНАТОВ

Саратовский государственный университет
им. Н.Г. Чернышевского

ВВЕДЕНИЕ

Круговорот азота в природе (рис. 1) – важнейшее звено в биогеохимических циклах нашей планеты. Земная атмосфера, на 78 об. % состоящая из азота, служит, по сути дела, основным резервуаром этого важнейшего элемента всего живого. Азот входит в состав белков, нуклеиновых кислот, многих простых и сложных молекул, составляющих структуры организмов любого уровня от человека до микроорганизма.

Человеку и животным азот нужен в виде белков животного и растительного происхождения, растениям – в виде солей азотной кислоты или ионов аммония. Представители животного и растительного мира не могут черпать азот непосредственно из атмосферы воздуха. Такой способностью обладает ограниченное количество видов микроорганизмов и синезеленых водорослей, которые называют азотфиксаторами, а процесс связывания азота атмосферы этими организмами – биологической азотфиксацией. Азотфиксаторы, как правило, сожительствуют с теми или иными растениями, обеспечивая их азотом, и пользуются для своей жизни многими веществами, образующимися в растениях. Термином “биологическая фиксация азота” подчеркивается,

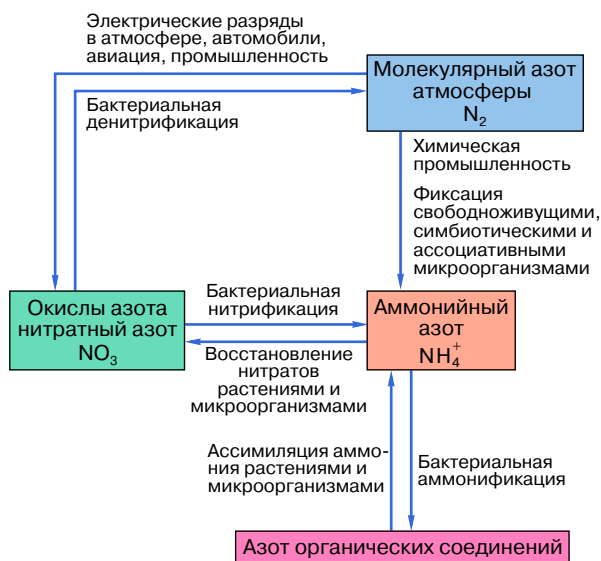


Рис. 1. Круговорот азота в природе

что мы имеем дело с уникальным биологическим явлением. Свой вклад в фиксацию азота воздуха вносят и иные (небиологические) процессы, такие, как грозы, извержения вулканов, пожары, сжигание топлива на тепловых электростанциях и в двигателях, наконец, производство аммиака по технологии лауреатов Нобелевской премии Фрица Габера (1918) и Карла Боша (1931). Именно им и фирме BASF (“Badische Anilin und Soda Fabrik”) в начале века в Германии удалось сделать переворот в мировой азотной промышленности, создав технологию получения аммиака из азота и водорода под давлением с участием катализатора, которая и поныне используется для получения минеральных азотных удобрений. Какова же доля всех видов связывания азота атмосферы? По очень приблизительным оценкам, масштаб биологической азотфиксации, происходящей ежегодно на Земле, весьма внушителен. Приблизительная оценка объемов азотфиксации в мировом масштабе приведена ниже.

Источник	Примерный диапазон, млн т N/год
Биологическая фиксация	
Суша	44–200
Мировой океан	1–120
Сжигание топлива	15–40
Пожары	10–200
Грозы	8–30
Промышленное производство аммиака	100
в том числе	
удобрения	84
прочие	16

Это привлекает внимание специалистов: биологов, биохимиков, геохимиков и представителей сельскохозяйственных наук.

Интересы ученых-биологов сфокусированы на конкретных научных направлениях, из которых можно выделить следующие:

- 1) поиск новых микробно-растительных азотфиксирующих сообществ и определение их роли в глобальной азотфиксирующей системе планеты;
- 2) исследование молекулярных механизмов взаимоотношения растений и азотфиксирующих микроорганизмов;
- 3) исследование физических и физико-химических основ явления азотфиксации;
- 4) изучение генетики азотфиксации и создание генноинженерным путем азотфиксирующих растений;
- 5) разработка комплекса агrobiологических технологий с целью повышения продуктивности азотфиксации в растениеводстве.

В этих направлениях работают многие коллективы ученых в различных странах.

ИЗ ИСТОРИИ АЗОТФИКСАЦИИ

Впервые прямые доказательства наличия азотфиксирующих микроорганизмов, живущих в симбиозе с бобовыми растениями, были получены благодаря работам немецкого исследователя Германа Гельригеля. Сравнивая источники азота для злаков и бобовых (1886 год), он показал, что если злаки черпают азот из минеральных веществ почвы, то бобовые, кроме того, обладают способностью фиксировать азот воздуха. Такую способность бобовых Г. Гельригель объяснял наличием на корневой системе клубеньков (рис. 2), развитие которых вызывают микроорганизмы. После работ Гельригеля стало ясно, что фиксация растениями азота связана с микроорганизмами, инфицирующими корневую систему растения. Потребовалось около десятка лет для подтверждения выводов Гельригеля о значимости симбиотических микроорганизмов рода ризобий (*Rhizobium*) для бобовых растений как азотфиксаторов. Голландский бактериолог М. Бейеринк выделил в 1888 году клетки ризобий в чистой культуре. В дальнейшем была показана их способность инфицировать корневую систему бобовых с определенной степенью избирательности по отношению к конкретным видам растений и вызывать образование на корнях клубеньков — специализированных образований, в которых протекает азотфиксация (рис. 2). Сейчас известно около 13 тыс. видов бобовых, многие из которых обладают способностью к симбиотической фиксации азота. Выяснено также, что маленький водный папоротник азолла (*Azolla*) находится в симбиотических отношениях с азотфиксирующими цианобактериями (синезеленые водоросли). Некоторые деревья и кустарники (например, ольха, облепиха, воскочик) имеют в качестве симбионтов актиномицеты. Поиск новых азотфиксирующих пар растение — микроорганизм далеко не закончен.

В 70–80-х годах нашего столетия в лаборатории доктора Джоан Доберейнер в Бразилии активизировались поиски азотфиксирующих микроорганизмов, обитающих на поверхности корневой системы диких и культурных злаков. Такие микроорганизмы, живущие в ассоциации с растением, называются ассоциативными азотфиксаторами. Число их видов велико, но благодаря работам доктора Дж. Доберейнер и ее последователей в центре событий оказались микроорганизмы рода азоспирилл (*Azospirillum*). Азоспириллы легко инфицируют корневую систему злаков и других растений. Подобно ризобиям, они делятся на виды, колонизирующие преимущественно те или иные сорта злаков, фиксируют азот воздуха, могут продуцировать гормоны роста растений и обладают еще другими свойствами, положительно влияющими на рост и развитие растений.



Рис. 2. Клубеньки на корневой системе бобовых растений

Кроме того, известны азотфиксирующие микроорганизмы, свободноживущие в почве, на растениях, в воде. Впервые выделить культуру свободноживущих азотфиксирующих микроорганизмов удалось в 1893 году С.Н. Виноградскому. Он выделил почвенный спороносный анаэробный микроорганизм, относящийся к роду *Clostridium* (кlostридий), названный автором в честь выдающегося французского микробиолога Л. Пастера *Clostridium pasteurianum*. Микроб растет в анаэробной (то есть без доступа кислорода) среде и в неблагоприятных условиях выживает, превращаясь в спору – клетку, покрытую прочной капсулой, защищающей ее от многих внешних факторов. В 1901 году М. Бейеринк выделил аэробно живущий почвенный микроорганизм азотобактер (*Azotobacter*), способный к азотфиксации, неприхотливый при выращивании. Этот микроорганизм интенсивно исследуют не только как удобную модельную культуру, но и применяют в технологии обогащения сельскохозяйственных посевов биологическим азотом. С тех пор коллекции свободноживущих азотфиксаторов постоянно увеличиваются, особенно с 1949 года, когда в арсенал

методов регистрации фиксации азота вошли метод изотопных индикаторов ($^{15}\text{N}_2$) и реакция восстановления ацетилена в этилен, катализируемая основным ферментом системы азотфиксации – нитрогеназой, рассмотренной в следующем разделе.

Сейчас в коллекциях свободноживущих микроорганизмов находятся не только азотобактер и кlostридии, но и многие другие микроорганизмы: клебсиеллы, бациллы и т.д. Особый интерес представляют цианобактерии (синезеленые водоросли), вызывающие цветение пресных и океанических водоемов. Учитывая огромные площади водной поверхности, вклад их в круговорот азота на Земле может быть очень велик.

Симбиотическая, ассоциативная азотфиксация и фиксация азота воздуха свободноживущими азотфиксаторами обогащают почву и воду азотом.

Судя по данным английских ученых, приведенным ниже, вклад азотфиксации за один календарный год в обеспечение азотом растений достаточно скромнен. Расчетные показатели поступления и выхода азота на сельскохозяйственных землях Великобритании в 1978 году следующие:

Поступление, тыс. т		Выход, тыс. т	
Дождь	275	Сельхозкультура и трава	
Семена	14	(в основном на корм скоту)	1367
Удобрения	1150	Выщелачивание	326
Сточные воды	26	Улетучивание аммиака	
Экскременты животных	1020	из экскрементов скота	536
Силосные стоки	9	из пожнивных остатков	50
Солома	15	из сточных вод	9
Кормовые отходы	9	Прочее (в основном денитрификация и связывание)	380
Биологическая азотфиксация	150		
Итого	2668		2668

Тем не менее, учитывая глобальное значение биологической фиксации в круговороте азота в биосфере, уникальность биохимических и физико-химических процессов фиксации азота микроорганизмами, это явление нуждается во всестороннем и глубоком изучении.

БИОХИМИЯ АЗОТФИКСАЦИИ

Микроорганизмы, усваивающие молекулярный азот, называются diaзотрофами. Все они имеют сходный биохимический механизм фиксации молекулярного азота воздуха. В основе его лежит процесс восстановления N_2 по уравнению



Реакция эта в клетке проходит при участии фермента нитрогеназы, расположенного на внутренних клеточных мембранах. Нитрогеназа, как и любой

фермент, — белок, вернее, комплекс из двух белков: МоFe-белка и Fe-белка. В состав этих белков входят ионы железа, а в первый белок и ионы молибдена. Нитрогеназы из разных азотфиксаторов несколько различаются своими молекулярными массами и содержанием металлов. Каждый из белков, в свою очередь, состоит из нескольких субъединиц. Молекулярная масса МоFe-белка различных нитрогеназ находится в пределах 200–250 кДа (кДа — килодальтон, дальтон — молекулярная масса, равная массе одного атома водорода, $- 1,67 \cdot 10^{-24}$ г). Фермент содержит по два атома молибдена, 28–34 атома железа и 18–24 атома серы на одну молекулу. Молекулярная масса Fe-белка колеблется от 50 до 70 кДа и также содержит атомы железа и серы.

Нитрогеназа — это сложный ферментный ансамбль, выполняющий функцию восстановления молекулярного азота воздуха. Этот процесс требует затраты энергии. Как это обычно осуществляется в живых организмах, энергия для подобных реакций поставляется в виде молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ). Азотфиксатору дорого обходится восстановление даже одной молекулы N_2 . По расчетам, для клеток *Rhizobium* акт восстановления одной молекулы N_2 требует затраты 25–35 молекул АТФ. Еще одна особенность функционирования нитрогеназы заключается в том, что процесс этот требует анаэробных условий. Молекулярный кислород — яд для нитрогеназы, в связи с чем многие микроорганизмы, фиксирующие азот, либо растут в анаэробных условиях и являются облигатными (обязательными) или факультативными (необязательными) анаэробами, либо представляют собой клетки, растущие в нормальных атмосферных условиях, но имеющие специальную систему защиты нитрогеназы от кислорода. Если азотфиксаторы являются анаэробными клетками, то сами условия их жизни обеспечивают нормальное функционирование нитрогеназы. Иное дело — факультативные анаэробы. При избыточном количестве кислорода клетка начинает резко интенсифицировать процессы дыхания, как бы стараясь выбрать весь кислород и обеспечить выполнение ею функций азотфиксации. Процесс этот малопродуктивен и кончается снижением азотфиксации. У многих азотфиксаторов имеются специальные механизмы защиты нитрогеназы. В них принимают участие различные сложные молекулы, из которых наиболее изучен леггемоглобин бобовых растений. Леггемоглобин удивительно напоминает по своей структуре и функции гемоглобин человека и животных, специализирующийся, как известно, на транспорте O_2 и CO_2 . Леггемоглобин расположен в клетках клубеньков, где живут азотфиксирующие микроорганизмы. Нитрогеназный комплекс, образующий аммиак из воздуха, действует по физико-химическим законам очень экономно (рис. 3). Если в среде обитания достаточно ионов аммония или нитратов, он прекращает работу. Молекулярные биологи не теряют на-

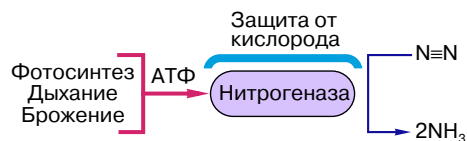
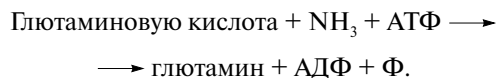
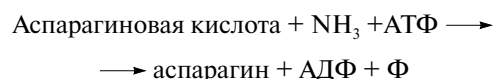


Рис. 3. Нитрогеназный комплекс

дежды, что исследование физико-химических основ процесса азотфиксации, происходящего в клетках, откроет перспективы создания новых экологически чистых, экономных технологий фиксации азота воздуха. Ведь все процессы в клетке, как правило, идут при физиологических значениях температуры, низких давлениях и без загрязнения среды обитания. Их нельзя сравнить с технологией синтеза аммиака на огромных заводах, где даже при использовании катализаторов требуется температура около $500^\circ C$ и давление 300–350 атм. Потребление растениями аммиака, образовавшегося при азотфиксации или восстановлении нитратов почвы, осуществляется ферментами, связанными с биосинтезом так называемых первичных аминокислот, прежде всего глутаминовой, аспарагиновой кислот и их амидов. Одним из активно изучаемых ферментов является, например, глутаминсинтетаза. Этот фермент катализирует реакцию



Фермент этот чрезвычайно сложен, встречается во всех организмах и принимает участие в присоединении аммиака к глутаминовой кислоте с образованием ее амида и последующим использованием его в различных реакциях синтеза азотсодержащих органических соединений. Близким по механизму действия является и аспарагинсинтетаза:



Синтез аминокислот и амидов происходит с участием и других ферментов: глутаматдегидрогеназы, аспартазы и т.д. В конечном итоге азот в виде аминокрупп вовлекается в серию биосинтетических реакций организма, поддерживая его жизненные функции.

ДИАЗОТРОФЫ

Если молекулярные механизмы фиксации азота разными diaзотрофами очень схожи, то сами diaзотрофы, их биология имеют весьма значительные различия. Во-первых, они могут являться бактериями, низшими грибами и водорослями, во-вторых, их рост, развитие, взаимоотношение с растениями и почвой имеют свои отличительные характерные черты. Так, относящиеся к симбиотическим азотфиксаторам клубеньковые бактерии рода *Rhizobium*

представляют собой микроорганизмы со средними размерами 0,7–1,8 мкм. Они подвижны в молодом возрасте, делятся перешнуровыванием и в дальнейшем теряют подвижность. Живут они в почве, на поверхности растений и способны при инфицировании бобовых вызывать образование клубеньков на корнях. Для каждого вида бобовых растений имеются свои разновидности (штаммы) ризобий, которые и получили свои названия от названий хозяина (*Rhizobium trifolii* – клубеньковые бактерии клевера, *Rhizobium lupini* – клубеньковые бактерии люпина и т.д.).

В основе способности инфицировать корневую систему хозяина лежит сложнейший и не вполне ясный молекулярный механизм, имеющий решающее значение в симбиотической фиксации азота. Обычно рассматривается несколько его стадий. Первая – приближение микробной клетки к растению за счет ее способности передвигаться в ответ на узнавание химических продуктов, выделяемых из корней растения. Этот процесс называется хемотаксисом. Вторая стадия – контактное взаимодействие микроорганизма с растением. В этом процессе важное место отводится так называемому лектин-углеводному узнаванию растения микроорганизмом. Лектин корневых волосков растений – углеводзубающий белок. Он узнает углевод поверхности бактерий и прочно связывается с ним. Сама механика этого процесса напоминает узнавание ключом английского замка. Третья стадия – механохимическая и весьма загадочная по технике исполнения. Бактерии, внедрившись в молодой корневой волосок, в виде так называемых инфекционных нитей прорастают вдоль волоска, как бы перетекают в тетраплоидные клетки коры и вызывают их быстрое деление. Они заполняют своим содержимым внутренность растительных клеток. Так как заражение бывает множественным, ткани корня в зоне проникновения микроорганизмов растут интенсивнее с образованием клубеньков, клетки которых буквально нафаршированы бактериями (рис. 4). Микробы при этом меняются и сами, они теряют клеточную стенку, изменяют свои размеры, геометрию. Кроме того, все они обволакиваются растительным белком – леггемоглибином. Размеры и число клубеньков на корнях бобовых в какой-то мере указывает на эффективность азотфиксации. Азотфиксация и образование клубеньков подавляются при обильном и экологически вредном использовании химических азотных удобрений.

Ассоциативные азотфиксаторы, принадлежащие к различным родам и видам, имеют индивидуальные особенности в анатомическом строении, физиологии, биохимии и, естественно, в процессах взаимоотношения с растением. Разнообразие ассоциативных взаимоотношений растений с микроорганизмами очень велико. Часто микробиологами не делают различия между ассоциативными и свободноживущими азотфиксаторами. Однако ассоциа-

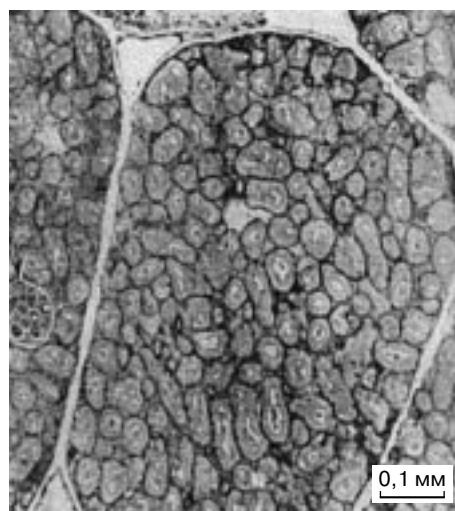


Рис. 4. Растительные клетки клубенька, заполненные микробными клетками азотфиксатора

тивные взаимоотношения касаются прежде всего так называемых ризосферных микроорганизмов, то есть тех микроорганизмов, которые живут на поверхности корневой системы растений. Микробы как бы колонизируют поверхность корневой системы (рис. 5). При этом просматриваются черты взаимоотношений, напоминающие взаимоотношения с растением симбиотических азотфиксаторов. Имеется те же этапы: хемотаксическое узнавание, лектин-углеводное узнавание и этапы установления прочных связей, обусловленные обменом веществ, полезным и растению и микроорганизмам; нет при этом только этапа образования клубеньков. Эффективность азотфиксации ассоциативной микрофлорой по сравнению с симбиотической не столь велика, однако у ассоциативных азотфиксаторов имеются важные свойства, позволяющие помочь растению в его росте и развитии (синтез фитогормонов, защита от фитопатогенов, разрушение токсических веществ).

Из числа хорошо изученных азотфиксаторов выделяются микроорганизмы рода азоспирилл. Они очень интересны, так как колонизируют корни злаков и могут быть полезны в технологии их выращивания. Азоспириллы, впервые выделенные М. Бейеринком в 1925 году в виде *Spirillum lipoferum Beijerinckii*, были как бы переоткрыты доктором Дж. Доберейнером в 1976 году и с тех пор благодаря ее инициативе быстро попали в сферу интенсивного изучения.

Очень интересны ассоциативные взаимоотношения синезеленых водорослей с водным папоротником азолой, растущим в воде рисовых полей Вьетнама, Китая, Индонезии. Естественно, что биология этого явления и особенности самих синезеленых водорослей имеют свою специфику и привлекают к

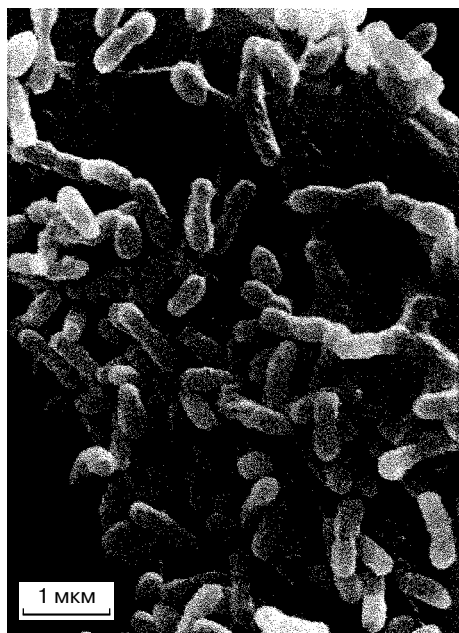


Рис. 5. Корневой волосок пшеницы с растущими на его поверхности ассоциативными азотфиксирующими микроорганизмами

себе внимание многих биологов и технологов-рисоводов. Грань между симбиозом и ассоциативностью при анализе многих азотфиксирующих пар растение–микроорганизм размыта.

ПРИМЕНЕНИЕ АЗОТФИКСАТОРОВ НА ПРАКТИКЕ

Открытие азотфиксаторов привело к созданию так называемых микробных удобрений. Уже в 1895 году Наббе и Хилтнером запатентован препарат микробной культуры Nitragin. Он выпускался в 17 вариантах для различных растений. Препарат представлял собой культуры азотфиксирующих микроорганизмов, смешанных с почвой, торфом, песком, навозом и другими субстратами. Внесение нитрагина в почву или обработка семян назывались инокуляцией и позволяли фермеру повысить качество и количество продукции. В первой половине нашего столетия наблюдался неуклонный рост научно-исследовательских работ по созданию перспективных микробных препаратов для бобовых и небобовых культур.

Однако после второй мировой войны бурное развитие химической промышленности породило надежду на решение многих вопросов технологии выращивания сельскохозяйственных культур с использованием химических удобрений. Начался период химизации сельскохозяйственного производства. Работы по исследованию микробиологических препаратов стали свертываться. Если к середине

40-х годов в мире продавалось 40 тыс. препаратов микробных удобрений, то в 1964 году — всего 1–2 тыс. Возможности большой химии, дешевизна азотных удобрений, простота их использования как бы отодвигали на второй план микробные препараты. Период переосмысления методов и стратегии использования биологических и химических источников азотного питания сельскохозяйственных растений наступил около десяти лет тому назад, когда во всех странах, в том числе и в России, возникла проблема экологизации сельскохозяйственного производства. Постоянно растущие мощности по производству синтетических азотных удобрений и их интенсивное использование кроме положительного эффекта (роста урожайности) несут в себе большую опасность — загрязнение азотсодержащими веществами почвы, подпочвенных вод, рек и озер. Минеральные удобрения вымываются из почвы, выщелачиваются и становятся вредными для человека соединениями — нитритами, нитрозаминами и т.д.

Проблема “занитрачивания” питьевых водоемов вблизи больших площадей сельскохозяйственных угодий, на которых применяют азотные удобрения, требует своего решения как в России, так и во многих промышленно развитых странах. Все это заставляет ученых и практиков искать альтернативные пути решения сельскохозяйственных задач, уделяя серьезное внимание биологической азотфиксации.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Кретович В.Л.* Биохимия усвоения азота воздуха растениями. М.: Наука, 1994.
2. *Мишустин Е.Н., Емцев В.Т.* Микробиология. М.: Агропромиздат, 1987.
3. *Общая биология: Учеб. для 10–11-х классов сред. шк. / Под ред. Д.К. Беляева, А.О. Рувинского.* 3-е изд. М.: Просвещение, 1993.
4. *Шлегель Г.* Общая микробиология. М.: Мир, 1987.

* * *

Владимир Владимирович Игнатов, доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии и биофизики Саратовского государственного университета, зав. лабораторией биохимии Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, заслуженный деятель науки РФ, вице-президент Российского микробиологического общества. Основные научные интересы: исследование молекулярных механизмов взаимодействия растений и микроорганизмов, лектины, их роль в биохимии и физиологии растительной и микробной клетки. Автор более 200 научных работ, в том числе двух монографий.