

IWONA PAŚMIONKA

*Katedra Mikrobiologii
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kollątaja
al. Mickiewicza 24/28
30-059 Kraków
E-mail: iwona.pasmionka@urk.edu.pl*

MIKROBIOLOGICZNE PRZEMIANY AZOTU GLEBOWEGO

WSTĘP

Azot jest pierwiastkiem biogennym szeroko rozpowszechnionym w przyrodzie. Występuje w atmo-, lito-, hydro- i biosferze na różnych stopniach utlenienia (od $-III$ do $+V$) (MARTINEZ-ESPINOSA i współaut. 2011, STASZEWSKI 2012), w formie cząsteczkowej, mineralnej i organicznej. Azot cząsteczkowy w postaci N_2 to gaz, główny składnik powietrza atmosferycznego (78%) (GÓRSKA i współaut. 2001). Azot mineralny to jony: amonowy – NH_4^+ , azotanowy (III) – NO_2^- i azotanowy (V) – NO_3^- , natomiast azot w formie organicznej wchodzi w skład m.in. aminokwasów, białek, kwasów nukleinowych, mocznika, witamin, chlorofilu i alkaloidów (GÓRSKA współaut. 2001, STASZEWSKI 2012). Pierwiastek ten trafia do gleby z nawozami mineralnymi i organicznymi, resztkami roślinnymi, opadami, ale również na drodze biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (STASZEWSKI 2012). W glebie nie kumuluje się, lecz podlega stratom w wyniku m.in. ulatniania się do atmosfery (amoniak, tlenki azotu i azot cząsteczkowy) i wymywania do wód (głównie azotany) (SAPEK i współaut. 2002). Prawie całość, bo ok. 99% azotu w glebie występuje w formie organicznej. Najwięcej azotu w glebach mineralnych znajduje się w poziomach próchnicznych. Ilość azotu w warstwie ornej uprawnych gleb w Polsce wynosi 0,02–0,35%, co stanowi 600–10500 kg/ha. Z tego tylko 1–2% jest dostępne dla roślin. Jest on pobierany z gleby przez rośliny w postaci jonów NH_4^+ i NO_3^- . Jony amonowe w glebie są wiązane przez minerały ilaste i substan-

cję organiczną, a jony azotanowe (V) są łatwo rozpuszczalne – znajdują się w roztworze glebowym, mogą też ulegać wymywaniu (STASZEWSKI 2012).

Azot to pierwiastek, który w najwyższym stopniu wpływa na plonowanie roślin (STARZYK i współaut. 2013). Brak biologicznie dostępnego azotu często jest czynnikiem ograniczającym wzrost i produkcję biomasy, nawet w środowiskach o odpowiednim klimacie i dostępie wody (MARTINEZ-ESPINOSA i współaut. 2011). Stymuluje on wzrost roślin, sprawia, że są intensywnie zielone, reguluje wykorzystanie składników pokarmowych (STASZEWSKI 2012). Zarówno niedobór, jak i nadmiar azotu jest szkodliwy dla roślin. Niedobór objawia się słabym wykształceniem liści i ich żółknięciem, gorszym krzewieniem, strzelistością. Ponadto, przy niedoborze azotu ilość i jakość plonów znacznie się zmniejszają (KLAMA 2004). Nadwyżka powoduje natomiast nadmierny wzrost, spowolnienie dojrzewania, skłonność do wylegania oraz wrażliwość na choroby, a także spadek wartości biologicznej (STASZEWSKI 2012).

Mikroorganizmy, które uczestniczą w przemianach azotu należą do bakterii, archeonów i grzybów (MARTINEZ-ESPINOSA i współaut. 2011). Występowanie mikroorganizmów w glebie ściśle wiąże się z roślinnością. Zależy od rodzaju i gatunku rośliny, ale także odmiany, a nawet stadium rozwojowego. Drobnoustroje spełniają wiele ważnych funkcji. Biorą udział w przemianach i udostępnianiu różnych substancji, spalniają rozwój innych, często szkodliwych dla roślin drobnoustrojów, co poprawia zdrowot-

ność roślin. Skład mikroflory w glebie zależy w znacznym stopniu od wydzielin korzeniowych roślin. Gdyby nie aktywność mikroorganizmów, zasoby dostępnego azotu uległyby wyczerpaniu. Drobnoustroje biorą udział w mineralizacji związków organicznych, dzięki czemu następuje włączenie azotu z powrotem do obiegu (WIELGOSZ i współaut. 2004).

Azot w glebie ulega wielu przemianom, z których większość przebiega przy udziale mikroorganizmów. Procesy te to: symbiotyczne i niesymbiotyczne wiązanie azotu atmosferycznego, proteoliza, amonifikacja, nityfikacja i denityfikacja. Wiązanie azotu cząsteczkowego polega na jego redukcji do jonów amonowych, proteoliza - na hydrolitycznym rozkładzie białek do aminokwasów, a amonifikacja - na rozkładzie aminokwasów do jonów amonowych. Nityfikacja to utlenianie jonów amonowych do azotanów (III), a następnie azotanów (V), natomiast denityfikacja to redukcja azotanów do azotu cząsteczkowego (WIELBO i SKORUPSKA 2003).

Naturalny obieg azotu w przyrodzie jest zakłócany przez działalność człowieka m.in. w wyniku stosowania azotowych nawozów mineralnych, spalania paliw kopalnych, uwalniania azotu do gleb i wód wraz ze ściekami (MARTINEZ-ESPINOSA i współaut. 2011).

MIKROBIOLOGICZNE PRZEMIANY AZOTU

WIĄZANIE AZOTU ATMOSFERYCZNEGO

Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego jest przeprowadzany przez mikroorganizmy określane jako diazotrofy. Należą one do domen: Archea i Bacteria. Można wśród nich wyróżnić zarówno organizmy wolnożyjące, jak i żyjące w symbiozie z roślinami. Wiązanie azotu polega na redukcji azotu cząsteczkowego do jonów amonowych. Proces ten stanowi znaczne źródło azotu w glebie. Jest bardzo ważną częścią obiegu tego pierwiastka, ponieważ dostarcza go w formie dostępnej dla roślin (WIELBO i SKORUPSKA 2003).

Azot cząsteczkowy występujący w powietrzu jest związkiem nieprzyswajalnym dla roślin i zwierząt z powodu bardzo małej reaktywności. Proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego prowadzi do powstania amoniaku, czyli azotu w formie dostępnej dla organizmów wyższych (MARTYNIUK 2008). Jest on realizowany dzięki nitrogenazie, enzymowi, który przyspiesza redukcję cząsteczki N_2 .

Nitrogenaza złożona jest z dwóch komponentów: białko-Fe oraz białko-MoFe, które w czasie redukcji N_2 łączą się ze sobą

prześciowo. U niektórych bakterii zamiast molibdenu występuje wanad (np. u *Azotobacter saliestris*, *Anabaena variabilis*) lub tylko żelazo (np. u *Clostridium pasteurianum*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum*) (WIELBO i SKORUPSKA 2003). Poza tymi wyjątkami, kompleks ten u wszystkich mikroorganizmów wiążących azot nie różni się strukturalnie ani funkcjonalnie.

Czynnikiem ograniczającym działanie enzymu jest tlen. Nitrogenaza jest aktywna w warunkach beztlenowych lub w obecności niewielkich koncentracji O_2 . Większe stężenia tego pierwiastka powodują jej unieczynnienie (MARTYNIUK 2008). Drobnoustroje w różny sposób temu przeciwdziałają. Sinice wytwarzają komórki o grubych ścianach, tzw. heterocysty, do których tlen nie dociera. Bakterie tlenowe zmieniają łańcuch oddechowy lub wytwarzają śluz. W brodawkach zaś wytwarzana jest leghemoglobina wiążąca tlen (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007).

Czynnikami, które wpływają na efektywność wiązania azotu przez diazotrofy są także obecne w glebie metale ciężkie, pestycydy i niektóre nawozy. Stosowanie nawozów organicznych wpływa pozytywnie na wzrost tych mikroorganizmów i intensywność przebiegu procesu wiązania azotu (GRATA i KRZYŚKO-ŁUPICKA 2007).

Badania nad wpływem odczynu na efektywność wiązania azotu atmosferycznego wskazują, że stężenie jonów wodorowych odgrywa bardzo ważną rolę w przebiegu tego procesu. KLAMA i współaut. (2005) badała wpływ pH na aktywność nitrogenazy, a co za tym idzie, efektywność wiązania azotu przez *Acetobacter diazotrophicus*, bakterię występującą w klimacie tropikalnym pod m.in. trzcina cukrową. Bakterie te wykazywały najwyższą efektywność wiązania azotu przy pH=7, dużą efektywność osiągały w przedziale pH od 5 do 9, przy wartościach granicznych pH=2 i pH=11. Z tego wynika, że odczyn odgrywa znaczną rolę w efektywności wiązania azotu przez *Acetobacter diazotrophicus*.

NIESYMBIOTYCZNE WIĄZANIE AZOTU

Proces niesymbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego prowadzą drobnoustroje wolnożyjące w glebie, m.in. bakterie tlenowe: *Azotobacter* sp., *Azotococcus* sp., *Azospirillum* sp., *Beijerinckia* sp., *Dexia* sp., i beztlenowe - *Clostridium* sp., a także bakterie fotosyntetyzujące - *Rhodobacter* sp. i sinice: *Anabaena* sp. i *Nostoc* sp. Organizmy te są szeroko rozpowszechnione w glebach i zbiornikach wodnych różnych stref klimatycznych. Ich wymagania siedliskowe są niejednorodne (MARTYNIUK 2008). Jak podają PISARSKA i PIETR (2014), 30% azotu przyswajanego na

drodze biologicznej jest wiązane przez mikroorganizmy niesymbiotyczne.

Jednymi z najlepiej poznanych bakterii wiążących azot są *Azotobacter* sp. Ich liczebność w glebach w strefie umiarkowanej sięga od kilku komórek do kilku tysięcy w jednym gramie gleby (NATYWA i współaut. 2013), a czynnikiem ograniczającym ich wzrost jest odczyn. Są czułe na zakwaszenie środowiska; rzadko występują przy pH poniżej 6 (MARTYNIUK 2008). Jak podaje MARTYNIUK (2002), bakterie z tego rodzaju były obecne w 15 na 27 próbek gleb zebranych z różnych miejsc w Polsce, co stanowiło ok. 55,5%. Najwięcej *Azotobacter* sp. zaobserwowano w żyznych glebach, których odczyn był bliski obojętnego. Bakterie *Azotobacter* sp. są wrażliwe na czynniki fizyczne i chemiczne, dlatego mogą być traktowane jako wskaźniki zmian środowiska (STARZYK i współaut. 2013).

Zdolność do wiązania azotu atmosferycznego ma także wiele gatunków bakterii endofitycznych, np. *Acetobacter* sp., *Herbaspirillum* sp. i *Azospirillum* sp. (KRÓL i PERZYŃSKI 2001). Współdziałanie między endofitami a roślinami jest korzystne dla obydwu grup. Bakterie endofityczne, oprócz wiązania azotu, wytwarzają też substancje korzystne dla korzeni roślin, zapewniające ich lepszy rozwój (STARZYK i współaut. 2013). W zamian za to, są lepiej zaopatrywane w składniki odżywcze oraz ochraniane przed wysokim stężeniem tlenu, który niszczy nitrogenazę. Ponadto, bakterie endofityczne pełnią ważną rolę w glebach, na których uprawiane są rośliny motylkowe, stymulując rozwój bakterii brodawkowych. Szczepienie soi *Bradyrhizobium japonicum* bakterią *Pseudomonas fluorescens* przyspiesza brodawkowanie. Podobnie dzieje się w przypadku inokulacji koniuczyny czerwonej *Rhizobium leguminosarum* i *Bacillus brevis* (KLAMA 2004).

Aktywność endofitycznych diazotrofów powoduje powiększenie zasobów azotu dostępnego dla roślin. Z tego powodu mikroorganizmy te są stymulatorami wzrostu roślin (PISARSKA i PIETR 2014). Wysoką efektywność wiązania azotu wykazują bakterie *Azospirillum* sp., np. *A. brasilense* w asocjacji z kukurydzą może powodować zwiększenie plonu o 18%. Natomiast *Acetobacter diazotrophicus* w uprawie trzciny cukrowej wiąże do 150 kg N/ha w ciągu roku (KLAMA 2004).

Bakterie *Azospirillum* sp. są obecne w glebach klimatu umiarkowanego. Żyją w symbiozie z korzeniami roślin, m.in. pszenicy i kukurydzy. Na ich występowanie w glebie wpływ mają czynniki fizyczne i chemiczne (zawartość azotu, materii organicznej, zasolenie, wilgotność i zwięzłość gleby), warunki pogodowe, a także gatunek i faza

rozwojowa rośliny oraz nawożenie (STARZYK i współaut. 2013).

Wiązanie azotu gazowego z atmosfery przez wolnożyjące diazotrofy jest niewielkie, ze względu na to, że jest przeprowadzane wyłącznie podczas wzrostu drobnoustrojów. Ponadto, azot nie trafia do środowiska od razu, a dopiero po tym, jak komórki bakterii obumrą (NATYWA i współaut. 2013). Bakterie niesymbiotyczne wiążą 10–50 kg N/ha/rok. Dzięki *Azotobacter* sp., które aktywnie wiążą azot, do gleby trafia 1–5 kg N/ha/rok. Liczniejsze w glebie *Arthrobacter* sp. dostarczają 5–25 kg/ha/rok tego pierwiastka, podobnie jak sinice. Laseczki *Clostridium* sp. wiążą 0,1–0,5 kg N/ha/rok (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007).

Współżycie między różnymi gatunkami drobnoustrojów może odgrywać istotną rolę w niesymbiotycznym wiązaniu azotu atmosferycznego. Wolnożyjące mikroorganizmy wiążące azot, mogą przyswajać go w dużo większych ilościach w obecności innych drobnoustrojów. Badania przeprowadzone przez KLAMĘ i SAWICKĄ (2001) dowodzą, że istnieje ścisły związek między aktywnością wiązania azotu a obecnością innych drobnoustrojów w glebie. Badania te wykazały, że użycie szczepów bakterii w odpowiednich kombinacjach (np. *Acetobacter diazotrophicus* z *Pseudomonas fluorescens*) powoduje zwiększenie aktywności nitrogenazy nawet 10-krotnie.

SYMBIOTYCZNE WIĄZANIE AZOTU

Asymilacja azotu na drodze symbiozy drobnoustrojów z roślinami stanowi 70–80% azotu trafiającego do cyklu globalnego w wyniku wiązania biologicznego (MARTYNIUK i OROŃ 2007).

Do bakterii symbiotycznych należą przede wszystkim bakterie brodawkowe z rodziny Rhizobiaceae (*Rhizobium* sp., *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium* sp., *Bradyrhizobium* sp.), żyjące w symbiozie z roślinami bobowatymi (Fabaceae). Inne przykłady endosymbiontów to m.in. promieniowce *Frankia* sp. (WIELBO i SKORUPSKA 2003).

Frankia sp. to Gram-dodatnie bakterie, diazotrofy dużo słabiej wyspecjalizowane niż rizoobia. Żyją w symbiozie z gatunkami roślin okrytozalążkowych należących do ośmiu rodzin: Betulaceae, Casuarinaceae, Myricaceae, Elaeagnaceae, Rhamnaceae, Rosaceae, Coriariaceae i Datisceae (WIELBO i SKORUPSKA 2003). Najbardziej znana jest jednak ich symbioza z olchą (MARTYNIUK 2008). Ilość azotu wiązanej przez promieniowce jest podobna do ilości azotu wiązanej przez rizoobia (WIELBO i SKORUPSKA 2003).

Wydajność procesu wiązania azotu jest zależna od współdziałania roślin z drobnou-

ustrojami. Rośliny muszą zagwarantować odpowiednie warunki, czyli środowisko bez-tlenowe i źródła energii potrzebne do redukcji azotu, natomiast bakterie muszą mieć zdolność do wiązania tego pierwiastka na odpowiednim poziomie, wykraczającym poza ich zapotrzebowanie.

Zakażanie roślin bakteriami jest procesem wieloetapowym. Zaczyna się od wzajemnego rozpoznania partnerów, dzięki wydzielaniu przez rośliny związków flawonoidowych, hamujących wzrost innych bakterii, a przyciągających określone gatunki rizobów. Kolejnym etapem jest przyleganie bakterii do włóśników korzeni i wytwarzanie chitolipoligosacharydów, tzw. czynników Nod, które powodują modyfikacje włóśników, co zapoczątkowuje powstawanie brodawek. Rizobia zakażają rośliny tworząc nici infekcyjne (WIELBO i SKORUPSKA 2003).

Brodawki korzeniowe tworzą się z komórek kory pierwotnej korzeni. Wyróżnia się dwa rodzaje brodawek. Pierwsze są aktywne merystematycznie, czyli zdolne do ciągłego wzrostu, mają wydłużony kształt, a azot przenoszą w postaci związków amidowych (np. asparagina, glutamina). Brodawki drugiego rodzaju mają ograniczoną zdolność wzrostu, są na ogół okrągłe, a azot transportują w formie ureidów (np. alantoina) (MARTYNIUK 2008). Wewnątrz brodawek bakterie przekształcają się w bakteroidy posiadające zdolność wiązania azotu. Następuje to w wyniku ekspresji genów *nif* i *fix*, które kodują białka nitrogenazy (WIELBO i SKORUPSKA 2003). Rośliny przez wiązki przewodzące transportują do brodawek węglowodany, będące źródłem energii dla bakteroidów. W komórkach roślinnych tworzona jest leghemoglobina, czyli białko chroniące kompleks nitrogenazy przed nadmiernym stężeniem tlenu. Wtedy uaktywnia się nitrogenaza i następuje wiązanie azotu. Leghemoglobina sprawia, że brodawki są zabarwione na czerwono. Powstałe w wyniku wiązania jony amonowe są w komórkach roślinnych wbudowywane do aminokwasów, a następnie przenoszone poza brodawki (MARTYNIUK 2008). Symbioza bakterii brodawkowych z roślinami motylkowymi dostarcza średnio 100-400 kg N/ha/rok (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007).

W okresie, kiedy bakterie brodawkowe nie żyją w symbiozie z roślinami, są obecne w glebie jako saprofity. Ich występowanie ma związek zarówno z czynnikami glebowymi i klimatycznymi, jak i zabiegami agrotechnicznymi. Przeżywalność w glebie bakterii symbiotycznych bez roślin, z którymi żyją w symbiozie, jest niejednakowa. Istotny wpływ na ich liczebność w środowisku glebowym ma stężenie jonów wodorow-

wych oraz skład granulometryczny, głównie zawartość części spławialnych. Większości bakterii symbiotycznych służy odczyn zbliżony do obojętnego, większa zawartość części spławianych i wapnowanie gleby (MARTYNIUK i OROŃ 2007).

Z badań MARTYNIUKA i współaut. (2005) wynika, że obecność bakterii brodawkowych w polskich glebach jest zróżnicowana. Symbionty koniczyny (np. *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*) były obecne w większości badanych gleb, symbionty łubinu i fasoli (*Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli*, *Bradyrhizobium* sp.) występowały rzadziej, natomiast symbiontów lucerny (*Sinorhizobium meliloti*) w większości gleb nie stwierdzono. Wynika z tego, że symbionty koniczyny czerwonej i grochu potrafią dłużej przetrwać w glebie niż symbionty lucerny i łubinu.

ROZKŁAD ORGANICZNYCH POŁĄCZEŃ AZOTU

Azot wchodzący w skład substancji organicznej jest rozkładany do formy amonowej w wyniku procesu mineralizacji, na który składają się proteoliza i amonifikacja.

Proteoliza polega na hydrolizie białek, w wyniku czego tworzą się peptydy, a w dalszej kolejności aminokwasy. Proces katalizowany jest przez enzymy proteolityczne, wydzielane do środowiska przez mikroorganizmy heterotroficzne. Uczestniczą w nim grzyby, promieniowce i inne bakterie (m.in. *Proteus* sp., *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp.) (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007). Powstałe aminokwasy mogą być pobierane przez mikroorganizmy i rośliny, jednak większość z nich ulega dalszym przemianom. Proteolizie ulegają też inne niż białka, złożone związki organiczne zawierające azot, np. kwasy nukleinowe, które dzięki nukleazom hydrolizują do nukleotydów, a następnie zasad azotowych (WYCZÓŁKOWSKI i DABEK-SZRENIAWSKA 2005).

Drugim etapem mineralizacji jest amonifikacja. Proces ten polega na przekształcaniu aminokwasów do amoniaku. Dezaminacja w glebie ma miejsce głównie w wyniku przemian biochemicznych, następujących dzięki obecności enzymów, dezaminaz, wydzielanych przez mikroorganizmy (DABEK-SZRENIAWSKA i współaut. 2006). Jak podaje SZOSTAK i współaut. (2005), rozkład aminokwasów do amoniaku i dwutlenku węgla trwa 1-6 dni. Amoniak następnie przekształca się w $N-NH_4$. Forma ta może zostać pobrana przez rośliny, pozostać w roztworze glebowym, ulec sorpcji lub ulotnić się do atmosfery (SZOSTAK i współaut. 2005). W procesie amonifikacji uczestniczą liczne bakterie

(*Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Serratia* sp., *Escherichia coli*, promieniowce) oraz grzyby (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007). Ze względu na duże zróżnicowanie tych mikroorganizmów w glebie proces przebiega bez względu na warunki. Wśród amonifikatorów są organizmy tlenowe i beztlenowe, preferujące odczyn kwaśny i alkaliczny, dostosowane do różnych temperatur i wilgotności (DĄBEK-SZRENIAWSKA i współaut. 2006).

Czynniki, które wpływają na proces mineralizacji organicznych związków azotu w glebie to m.in. właściwości gleby, uwilgotnienie, odczyn, warunki pogodowe, pora roku i nawożenie azotowe. Kwaśny odczyn gleby wpływa na intensyfikację procesu amonifikacji, przez co następuje zwiększenie ilości NH_4^+ (SAPEK i KALIŃSKA 2004).

NITRYFIKACJA

Nitryfikacja przeprowadzana jest zarówno przez organizmy autotroficzne, jak i heterotroficzne. Nitryfikatory występują w glebach, wodach słodkich i słonych, górnych warstwach osadów i w skałach. Są organizmami tlenowymi. Utlenianie amoniaku do azotanów (III) i azotanów (V) jest dla nich źródłem energii potrzebnej do wzrostu i rozwoju (PODLASKA i RUSSEL 2013).

Wiele czynników wpływa na intensywność tego procesu, m.in. odpowiednia ilość fosforu, wapnia i innych makroskładników, a także odpowiedni stosunek manganu do miedzi (ADAMCZYK i GODLEWSKI 2010). Czynnikiem ograniczającym nitryfikację jest kwaśny odczyn. Jednak w wyniku prowadzonych badań dowiedziono, że proces ten może zachodzić nawet w glebach o pH poniżej 5 (DE BOER i KOWALCHUK 2001). Autotroficzne nitryfikatory są czułe na zakwaszenie środowiska (STREMIŃSKA i BŁASZCZYK 2004). Optymalne dla nich pH wynosi 7,5–8 (SZARLIP i WSPÓLAUT. 2010). W środowisku mogą również występować substancje hamujące przebieg procesu nitryfikacji, do których zalicza się m.in. metan, etan, chloroetan, etylen i tlenek węgla (PODLASKA i RUSSEL 2013). Nitryfikatory heterotroficzne są mniej wrażliwe na kwaśny odczyn i działanie związków hamujących (PAUL i CLARK 2000).

Mikroorganizmy przeprowadzające nitryfikację mają duży wpływ na rozwój roślin. W wyniku ich działania powstają w glebie jony azotanowe, które są lepiej przyswajane przez rośliny niż jony amonowe. Nitryfikatory zachowują w glebie równowagę pomiędzy różnymi formami azotu (PODLASKA i RUSSEL 2013). Z drugiej strony, proces nitryfikacji może być niekorzystny, gdyż wiąże się z procesami przyczyniającymi się do strat azo-

tu, m.in. poprzez dostarczanie substratów potrzebnych do denitryfikacji (ADAMCZYK i GODLEWSKI 2010, PODLASKA i RUSSEL 2013).

NITRYFIKACJA AUTOTROFICZNA

Nitryfikację autotroficzną przeprowadzają chemoautotrofy. Proces ten polega na utlenianiu amoniaku przez bakterie nitryfikacyjne do azotanów. Przebiega w dwóch etapach. Utlenianie do azotanów (III) przeprowadzają bakterie z grupy *Nitroso-* (ang. ammonium oxidizing bacteria, AOB), a utlenianie do azotanów (V) bakterie z grupy *Nitro-* (ang. nitrite oxidizing bacteria, NOB) (STREMIŃSKA i BŁASZCZYK 2004, STASZEWSKI 2012).

Enzym, który odgrywa główną rolę w procesie nitryfikacji, to monooksygenaza amonowa, dla której substratem jest amoniak. Enzym ten jest związany z błoną komórkową. W wyniku jego działania amoniak jest przetwarzany do hydroksyloaminy (NH_2OH). W dalszej kolejności następuje utlenianie do azotanów (III) przez oksydoreduktazę hydroksyloaminy, enzym uwalniany do przestrzeni peryplazmatycznej (DE BOER i KOWALCHUK 2001, STREMIŃSKA i BŁASZCZYK 2004, SZARLIP i współaut. 2010). Monooksygenaza amonowa może też utleniać wiele związków organicznych będących inhibitorami utleniania amoniaku, a więc hamujących nitryfikację. Energia uwolniona w procesie nitryfikacji jest wykorzystana przez mikroorganizmy do ich wzrostu. Utlenianie jonu amonowego, a więc pierwsza faza nitryfikacji jest uważana za etap ograniczający w nitryfikacji autotroficznej (DE BOER i KOWALCHUK 2001). Dzieje się tak ze względu na to, iż nitrobakterie są aktywniejsze od nitrozobakterii. Dzięki temu w glebie nie dochodzi do nagromadzenia toksycznych azotanów (III) (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007).

NITRYFIKACJA HETEROTROFICZNA

W glebach o odczynie kwaśnym (np. glebach leśnych) dużą rolę odgrywa nitryfikacja heterotroficzna. Jest przeprowadzana m.in. przez *Arthrobacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Paracoccus denitrificans*, *Alcaligenes faecalis*. Bakterie te mają enzymy bardzo podobne do nitryfikatorów autotroficznych. Pewne heterotrofy, np. *Thiosphaera pantotropha*, łączą nitryfikację z tlenową denitryfikacją. Heterotrofy mogą wykorzystywać do nitryfikacji zarówno organiczne, jak i nieorganiczne związki azotu. W przeciwieństwie do nitryfikacji autotroficznej, utlenianie amoniaku przez heterotrofy nie jest związane ze wzrostem komórkowym (DE BOER i KOWALCHUK 2001).

Nitryfikację przeprowadzają także grzyby. Najlepiej poznanym pod tym względem gatunkiem jest *Aspergillus flavus* (PAUL i

CLARK 2000). Proces ten ma jednak dla tych organizmów mniejsze znaczenie, ponieważ w jego wyniku nie uzyskują energii. Powstające produkty pośrednie mogą hamować wzrost i rozwój bakterii. Efektywność nityfikacji prowadzonej przez grzyby nie jest duża, jednak w glebach licznie zasiedlonych przez te organizmy może odgrywać ważną rolę (STREMIŃSKA i BŁASZCZYK 2004).

DENITRYFIKACJA

Denitryfikacja polega na redukcji azotanów do azotu cząsteczkowego. Przebiega w warunkach beztlenowych. Produktami procesu są N_2 , ale także N_2O i NO . Korzystne pH, w którym proces przebiega najintensywniej, wynosi 6-8. Pomimo tego obserwuje się ten proces także w glebach o odczynie kwaśnym, np. w glebach leśnych. Dzieje się tak w przypadku wysokiej ilości azotanów (STREMIŃSKA i BŁASZCZYK 2004).

Denitryfikacja właściwa polega na przekształcaniu azotanów do azotu cząsteczkowego i tlenków azotu, a więc produktów gazowych. Przebiega w ściśle beztlenowych warunkach i prowadzi do strat azotu z gleby w wyniku ulatniania. Denitryfikacja częściowa polega na redukcji azotanów do azotynów lub do amoniaku i ma miejsce w warunkach względnie beztlenowych (STASZEWSKI 2012).

Denitryfikacja jest powszechna wśród mikroorganizmów glebowych. Większość z nich to heterotrofy i fakultatywne beztlenowce. Należą do różnych gatunków, jednak największą grupę stanowią *Bacillus* sp. i *Pseudomonas* sp. (SZARLIP i współaut. 2010). Zdolność do denitryfikacji mają także bakterie *Achromobacter* sp., *Spirillum* sp. i *Micrococcus* sp. (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007). Proces ten przeprowadzają również niektóre grzyby (*Aspergillus nidulans*, *Fusarium oxysporum*).

Kwaśny odczyn gleby sprzyja rozwojowi grzybów, także tych wytwarzających toksyny. Są to głównie *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. i *Fusarium* sp. Ich metabolity oddziałują niekorzystnie na mikroorganizmy. Część spośród mykotoksyn cechuje się działaniem bakteriobójczym i grzybobójczym. Są to np. aflatoksyny, rubratoksyny i dikumarol. Toksyny te działają szkodliwie m.in. na mikroorganizmy wiążące azot atmosferyczny (NATYWA i współaut. 2014).

Denitryfikacja przebiega intensywniej w przypadku: kumulacji w glebie azotanów (III) i (V), niedoboru tlenu i wysokiej wilgotności. Wpływ na ten proces ma też rodzaj szaty roślinnej. Z rolniczego punktu widzenia, denitryfikacja jest procesem negatywnym. Całkowita denitryfikacja prowadzi do strat azo-

tu z gleby w wyniku ulatniania azotu gazowego i tlenków azotu. Natomiast częściowa może prowadzić do powstania toksycznych dla roślin azotanów (III) lub amoniaku, który także może ulotnić się z gleby (PIOTROWSKA i KUSEWICZ 2007).

PODSUMOWANIE

Azot jest pierwiastkiem, który odgrywa bardzo ważną rolę w środowisku. Wpływa na tempo procesów zachodzących w ekosystemach: produkcję i rozkład biomasy. Jego obieg oraz dostępność dla organizmów są w bardzo dużej mierze uzależnione od drobnoustrojów. To one przeprowadzają większość reakcji, składających się na przemiany azotu. Mikroorganizmy zapewniają niewyczerpalność zasobów tego biogenu.

Drobnoustroje umożliwiający krążenie azotu w glebie są zróżnicowane. Należą do organizmów autotroficznych i heterotroficznych, tlenowych i beztlenowych, wolnożyjących i symbiotycznych.

Dzięki mikroorganizmom możliwe jest włączenie azotu atmosferycznego w obieg. Dzieje się tak w wyniku wiązania azotu przez wolnożyjące i symbiotyczne bakterie, określane jako diazotrofy. Największe znaczenie, zwłaszcza na terenach rolniczych, mają bakterie brodawkowe, tzw. rizobia, żyjące w symbiozie z roślinami bobowatymi. To one najefektywniej wiążą azot.

Rozkład azotu wchodzącego w skład materii organicznej również przeprowadzają drobnoustroje. W wyniku proteolizy następuje rozkład białek do aminokwasów, które z kolei rozkładane są do amoniaku. Proces ten przebiega przy udziale licznych bakterii i grzybów.

Amoniak może być w glebie utleniany do azotanów w procesie nityfikacji. Reakcja ta zachodzi w dwóch etapach. Nityfikacje mogą prowadzić też organizmy heterotroficzne, zarówno bakterie, jak i grzyby.

Nadmiar azotanów podlega procesowi denitryfikacji, czyli redukcji w warunkach beztlenowych. Następstwem tego jest uwalnianie do atmosfery azotu w postaci gazowej. W obecności niewielkiej ilości tlenu może zachodzić denitryfikacja częściowa, której produkty to azotany (III) lub amoniak. Jest to proces niekorzystny dla rolnictwa, gdyż powoduje straty azotu z gleby, ale z drugiej strony zapewnia pełny obieg, włączając azot glebowy do globalnego cyklu krążenia tego pierwiastka.

Bardzo wiele czynników wpływa na efektywność procesów przemiany azotu w glebie. Można wśród nich wymienić czynniki fizyczne, chemiczne i biologiczne, takie jak: rodzaj gleby, jej natlenienie, uwilgotnienie, odczyn,

zasolenie, zawartość materii organicznej, pierwiastków śladowych, obecność substancji stymulujących lub hamujących, obecność innych organizmów. Dużą rolę odgrywa szata roślinna, rodzaj, gatunek, a nawet odmiana rośliny i jej stadium rozwojowe. Znaczenie mają też warunki klimatyczne, pora roku, przeprowadzane zabiegi agrotechniczne i rodzaj nawożenia.

Za jeden z głównych czynników limitujący efektywność przemian azotu można uznać odczyn gleby. Wpływa on w bardzo dużym stopniu na aktywność wszystkich procesów przeprowadzanych przez mikroorganizmy. Optymalny odczyn dla większości drobnoustrojów powinien być bliski obojętnego, a zakwaszenie środowiska oddziałuje na nie niekorzystnie. Są w glebie jednak mikroorganizmy mogące się rozwijać i przeprowadzać procesy przemiany azotu w glebach o odczynie niższym. Do tej grupy należą niektóre bakterie i przede wszystkim grzyby.

Streszczenie

Azot jest jednym z najważniejszych pierwiastków biogennych. Jest niezbędny do prawidłowego wzrostu i funkcjonowania wszystkich organizmów. Pierwiastek ten występuje w glebie w wielu formach i jest bardzo aktywny. Ulega przemianom z jednych form chemicznych w inne. Mikroorganizmy odgrywają ważną rolę w przemianach azotu.

Główne procesy składające się na cykl azotu to: wiązanie, amonifikacja, nityfikacja i denityfikacja. Wiązanie azotu atmosferycznego jest ważnym źródłem biologicznie dostępnego azotu w biosferze, amonifikacja to redukcja związków organicznych do amoniaku, nityfikacja to dwuetapowy proces utleniania amoniaku do azotanów, a denityfikacja to redukcja azotanów do azotu gazowego.

Intensywność mikrobiologicznych procesów w glebie zależy m.in. od typu gleby, wilgotności, natlenienia, roślinności, nawożenia. Odczyn również wywiera wpływ na przemiany azotu w glebie. Większość gatunków mikroorganizmów optymalnie wzrasta w odczynie obojętnym. W kwaśnych glebach aktywność mikroorganizmów i intensywność procesów jest hamowana.

LITERATURA

- ADAMCZYK B., GODLEWSKI M., 2010. *Różnorodność strategii pozyskiwania azotu przez rośliny*. Kosmos 59, 211-222.
- DĄBEK-SZRENIAWSKA M., ZIMON A., WYCZÓLKOWSKI A., 2006. *Aktywność enzymów w procesie amonifikacji w glebie z dodatkiem azotowych substancji organicznych*. Acta Agrophys. 8, 23-33.
- DE BOER W., KOWALCHUK G. A., 2001. *Nitrification in acid soils: micro – organisms and mechanisms*. Soil Biol. Biochem. 33, 853-866.
- GÓRSKA E. B., RAGUS B., RUSSEL S., 2001. *Wytworzenie nitrogeazy przez bakterie z rodzaju Bacillus wyizolowane z gleby*. [W:] *Drobnoustroje środowiska glebowego*. DAHM H., POKOJSKA-BURDZIEJ A. (red). Wyd. Adam Marszałek, Toruń, 141-146.
- GRATA K., KRZYŃSKO-LUPICKA T., 2007. *Ekologiczne skutki działania fosforanu mocznika na diazotrofy glebowe w okresie jesiennym*. Cz. I. Proc. ECoPol 1, 137-140.
- KLAMA J., 2004. *Współżycie endofitów bakteryjnych z roślinami*. Acta Sci. Pol. Agricult. 3, 19-28.
- KLAMA J., SAWICKA A., 2001. *Aktywność nitrogeazy w glebie gliniasto piaszczystej wzbogaczonej w glukozę i szczepionej różnymi bakteriami*. [W:] *Drobnoustroje środowiska glebowego*. DAHM H., POKOJSKA-BURDZIEJ A. (red). Wyd. Adam Marszałek, Toruń, 161-164.
- KLAMA J., SAWICKA A., NIEWIADOMSKA A., SWĘDRZYŃSKA D., 2005. *Wpływ pH na zdolność wiązania azotu atmosferycznego przez Acetobacter diazotrophicus*. Inżynieria Ekologiczna 12, 127-128.
- KRÓL M. J., PERZYŃSKI A., 2001. *Charakterystyka bakterii ryzosfery zbóż z rodzaju Azospirillum*. Folia Univ. Agric. Stetin. Agricult, 88, 111-116.
- MARTINEZ-ESPINOSA R. M., COLE J. A., RICHARDSON D. J., WARTMOUGH N. J., 2011. *Enzymology and ecology of the nitrogen cycle*. Biochem. Soc. Transact. 39, 175-178.
- MARTYNIUK S., 2002. *Systemy biologicznego wiązania azotu*. Nawozy i Nawożenie 1, 264-277.
- MARTYNIUK S., 2008. *Znaczenie procesu biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym*. J. Res. Appl. Agricult. Engin. 53, 9-14.
- MARTYNIUK S., OROŃ J., 2007. *Bioróżnorodność mikrobiologiczna gleb na przykładzie bakterii wiążących azot atmosferyczny – oddziaływanie wybranych zabiegów agrotechnicznych*. Fragmenta Agronom. 4, 18-23.
- MARTYNIUK S., OROŃ J., MARTYNIUK M., 2005. *Diversity and numbers of root – nodule bacteria (rhizobia) in polish soils*. Acta Soc. Botanicor. Pol. 74, 83-86.
- NATYWA M., SELWET M., AMBROŹY K., POCIEJOWSKA M., 2013. *Wpływ nawożenia azotem i deszczowania na liczebność bakterii z rodzaju Azotobacter w glebie pod uprawą kukurydzy w różnych fazach rozwoju rośliny*. Pol. J. Agronom. 14, 53-58.
- NATYWA M., SELWET M., MACIEJEWSKI T., 2014. *Wpływ wybranych czynników agrotechnicznych na liczebność i aktywność drobnoustrojów glebowych*. Fragmenta Agronom. 31, 56-63.
- PAUL A. P., CLARK F. E., 2000. *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Wyd. Uniwersytetu M. Curie-Skłodowskiej, Lublin, 231-235.
- PIOTROWSKA M., KUSEWICZ D., 2007. *Mikroflora gleby*. [W:] *Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy i środowiska ich występowania*. LIBUDZISZ Z., KOWAL K., ŻAKOWSKA Z. (red). PWN, Warszawa, 195-200.
- PISARSKA K., PIETR S. J., 2014. *Bakterie endofityczne – ich pochodzenie i interakcje z roślinami*. Post. Mikrobiol. 53, 141-151.
- PODLASKA B., RUSSEL S., 2013. *Charakterystyka bakterii nityfikacyjnych i ich rola w obiegu azotu*. Tom 3. Interdyscyplinarne Zagadnienia w Inżynierii i Ochronie Środowiska, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, 263-279.
- SAPEK A., SAPEK B., PIETRZAK S., 2002. *Obieg i bilans azotu w rolnictwie polskim*. Nawozy i Nawożenie 1, 100-121.
- SAPEK B., KALIŃSKA D., 2004. *Mineralizacja organicznych związków azotu w glebie w świetle długoletnich doświadczeń łąkowych IMUZ*. Woda – Środowisko – Obszary Wiejskie, 4, 183-200.

- STARZYK J., NIEWIADOMSKA A., WOLNA-MARUWKA A., SWĘDRZYŃSKA D., 2013. *Zmiany liczebności Azospirillum i Azotobacter w glebie pod uprawą kukurydzy (Zea mays L.) z zastosowaniem różnych nawozów organicznych*. Fragmenta Agronom. 30, 147-155.
- STASZEWSKI Z., 2012. *Azot w glebie i jego wpływ na środowisko*. Zeszyty Naukowe. Inżynieria Łądowa i Wodna w Kształtowaniu Środowiska 4, 50-58.
- STREMIŃSKA M. A., BŁASZCZYK M., 2004. *Cykl biogeochemiczny azotu w glebach ekosystemów borów iglastych*. Post. Mikrobiol. 43, 235-250.
- SZARLIP P., WŁODARCZYK T., BRZEZIŃSKA M., GLIŃSKI J., 2010. *Production and uptake of nitrous oxide (N₂O) as affected by soil conditions*. Acta Agrophys. 187, 1-66.
- SZOSTAK B., JEZIERSKA-TYS S., BEKIER-JAWORSKA E., 2005. *Intensywność procesu amonifikacji i nityfikacji w glebie na terenie ferm świń*. Acta Agrophys. 6, 251-260.
- WIELBO J., SKORUPSKA A., 2003. *Ewolucja układu symbiotycznego Rhizobium – rośliny motylkowate*. Post. Mikrobiol. 42, 263-283.
- WIELGOSZ E., SZEMBER A., SKWAREK J., 2004. *Wpływ wybranych roślin na liczebność i aktywność bakterii biorących udział w przemianach azotu*. Ann. UMCS 59, 1689-1696.
- WYCZÓLKOWSKI A., DABEK-SZRENIAWSKA M., 2005. *Enzymy biorące udział w mineralizacji azotu organicznego*. Acta Agrophys., Rozprawy i Monografie 3, 37-61.

KOSMOS Vol. 66, 2, 185–192, 2017

Iwona Paśmionka

Department of Microbiology, University of Agriculture in Krakow, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków,
E-mail: i.pasmionka@ur.krakow.pl

MICROBIOLOGICAL TRANSFORMATIONS OF SOIL NITROGEN

Summary

Nitrogen is one of the most important biogenic compounds, indispensable for growth and functioning of all the organisms. This chemical element exist in soil in many forms, some of which are very active. Microorganisms play an important role in the nitrogen cycle. Main processes involved in the nitrogen cycle consists of nitrogen fixation, ammonification (reduction of organic compounds to ammonia), nitrification (two-step process of oxidation of ammonium to nitrate) and denitrification (conversion of nitrate to gaseous nitrogen). Nitrogen fixation is the most important source of biologically available nitrogen in the biosphere.

The intensity of microbial processes in soil depends on type of soil, its humidity, oxygenation, kind of vegetation and fertilization. Acidity of soil also exerts influence on the nitrogen cycle. For most microbial species, their growth is optimal in neutral conditions. In acid soils activity of microorganism is inhibited.

Key words: nitrogen fixation, nitrogen cycle, soil microorganisms