

Małgorzata Łyszcz, Anna Gałązka

*Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach*

PROCES BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU ATMOSFERYCZNEGO*

Słowa kluczowe: symbioza, bakterie brodawkowe, ryzobia, azot, nitrogenaza

Wstęp

Spośród wszystkich znanych na świecie pierwiastków, rośliny najsilniej reagują na deficyt azotu w glebie, co objawia się – w zależności od gatunku – np. słabym ukorzeniem, żółknięciem liści, sztywnością tkanek. Warunkuje prawidłowy rozwój roślin uprawnych, pobudza wzrost części podziemnych i nadziemnych roślin (6, 20). Azot jest istotnym elementem, potrzebnym do istnienia wszystkich form życia. Wchodzi w skład najważniejszych związków tworzących każdą żywą komórkę, a mianowicie białek i kwasów nukleinowych, niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych.

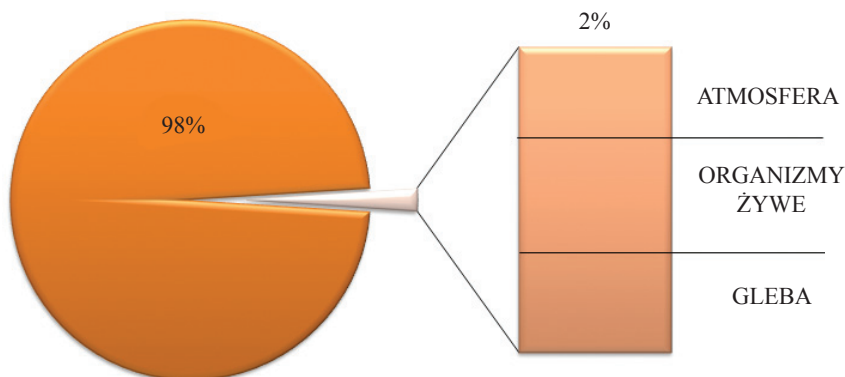
Białka stanowią najważniejszy składnik pożywienia człowieka i zwierząt, istotny element budulcowy, a także pełnią funkcję enzymów, ułatwiając wszelkie procesy komórkowe. Kwasy nukleinowe stanowią podstawowy budulec materiału genetycznego, są niezbędne w przechowywaniu i przekazywaniu informacji genetycznej (23).

W środowisku naturalnym całkowita ilość azotu szacowana jest na blisko $1,6 \times 10^{17}$ t, z czego 98% stanowi forma nieorganiczna (poza organizmami żywymi), natomiast 2% występuje w postaci biotycznej (w organizmach żywych i w ich biocenozach) (26, 52). W tych 2% znajduje się azot:

- w postaci gazowej, do którego zaliczamy azot atmosferyczny (N_2), który stanowi około 78% składu atmosfery, jednak dla większości organizmów żywych w takim stanie jest nieprzyswajalny, podtlenek azotu (N_2O), tlenek azotu (NO) oraz dwutlenek azotu (NO_2);

* Opracowanie wykonano w ramach zadania 1.4 w programie wieloletnim IUNG-PIB.

- występujący w organizmach żywych
- glebowy w postaci związków organicznych jak również w formie azotanów (NO_3), azotynów (NO_2) i jonów amonowych; (NH_4) (26, 52).



Rysunek 1. Wykres przedstawiający procentową zawartość azotu w środowisku naturalnym
 Źródło: opracowanie własne

Zasoby azotu są olbrzymie, jednak jest on niedostępny dla przeważającej części organizmów (33).

Należy podkreślić, że cząsteczka azotu atmosferycznego jest nadzwyczaj trwała, ponieważ pomiędzy atomami azotu występuje stabilne, potrójne wiązanie kowalencyjne, do rozerwania którego potrzebna jest szczególnie duża ilość energii. Wyjątkowo silne połączenie $\text{N}\equiv\text{N}$, którego energia wiązania wynosi 941 kJ (225 kcal) mol^{-1} , jest bardzo odporne na atak chemiczny. Na każdy mol zredukowanego azotu, potrzeba zużyć około 16 moli ATP. Aby podkreślić jego niereaktywność Lavoisier nadał gazowej formie N_2 nazwę „azot”, co oznacza „bez życia” (47).

Często na glebach uprawianych rolniczo występuje niedobór azotu, który jest uzupełniany chemicznie, poprzez stosowanie nawozów syntetycznych. Jednak metoda taka wymaga wysokich nakładów energii, jest kosztowna oraz w sposób negatywny wpływa na środowisko (24, 40). Dlatego też proces biologicznego wiązania azotu jest ważny ze względów ekonomicznych i ekologicznych. Szacuje się, że ilość N_2 związanego przez mikroorganizmy przewyższa około 4-krotnie ilość azotu wyprodukowanego metodami przemysłowymi (24). W środowisku naturalnym to właśnie proces biologicznego wiązania azotu jest jedną z najlepszych metod wprowadzania do gleby zredukowanych związków azotowych, które są dostępne dla roślin. Zjawisko biologicznej redukcji azotu jest zgodne z założeniami ekologicznego rolnictwa, które dąży do zmniejszenia stosowania sztucznych nawozów mineralnych oraz chemicznych środków ochrony roślin. Proces przekształcenia azotu atmosferycznego do jonów amonowych, które mogą być przyswajane przez rośliny,

jest bardzo ważny zarówno ze względów ekonomicznych, jak i ekologicznych. Tylko nieliczne organizmy prokariotyczne posiadają zdolność do przeprowadzenia tego procesu. Mikroorganizmy te zostały nazwane diazotrofami (23, 24, 35, 36, 33).

Drobnoustroje wiążące azot atmosferyczny

Wśród drobnoustrojów wiążących azot wyróżnia się dwie grupy: (1) bakterie wiążące azot w stanie symbiotycznym i (2) bakterie wiążące N_2 w symbiozie z roślinami bobowatymi, tj. bakterie brodawkowe (ryzobia), np. *Rhizobium* i *Bradyrhizobium*, oraz promieniowce z rodzaju *Frankia*, żyjące w symbiozie z roślinami drzewiastymi m.in. z olszą – *Alnus* (25, 38).

Tabela 1

Najważniejsze rodzaje drobnoustrojów wiążących azot atmosferyczny

Niesymbiotyczne bakterie	Symbiotyczne bakterie	Sinice
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Clostridium</i> • <i>Azospirillum</i> • <i>Azotobacter</i> • <i>Desulfovibrio</i> • <i>Azomonas</i> • <i>Bacillus</i> • <i>Beijerinckia</i> • <i>Rhodobacter</i> • <i>Rhodospirillum</i> 	<p><u>z bobowatymi:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhizobium</i> • <i>Bradyrhizobium</i> • <i>Sinorhizobium</i> • <i>Mesorhizobium</i> <p><u>z innymi roślinami:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Frankia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Anabena</i> • <i>Nodularia</i> • <i>Nostoc</i> • <i>Calothrix</i> • <i>Aphanothece</i> • <i>Plectonema</i> • <i>Gleocapsa</i> • <i>Rivularia</i> • <i>Gleotrichia</i> • <i>Myxosarcina</i> • <i>Tolypothrix</i> • <i>Oscillatoria</i> • <i>Mastigocladus</i> • <i>Trichodesmium</i> • <i>Pseudoanabena</i> • <i>Microcoleus</i> • <i>Scytonema</i>

Źródło: Krupka, 1984 (27); Klama, 2004 (20); Martyniuk, 2012 (37)

Najlepiej poznana symbioza, podczas której zachodzi wiązanie azotu, występuje pomiędzy roślinami bobowatymi (*Fabaceae*) oraz bakteriami brodawkowymi (ryzobia). Przyпуска się, że proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego dostarcza corocznie do gleb uprawnych około 139-170 mln t azotu (18, 37, 45). Ilość azotu związanego przez mikroorganizmy występujące w układach symbiotycznych i stanowi od około 70 do 80%, natomiast pozostałe 20-30% azotu wiązane jest przez mikroorganizmy niesymbiotyczne (5, 24, 37). Wydajność wiązania N_2 przez prokariota wolno żyjące jest mała i wynosi od około 1 do 50 kg $N_2 \cdot ha^{-1} \cdot rok^{-1}$. W układach symbiotycznych wydajność wiązania azotu osiąga wartość od 200 do nawet 500 kg $N_2 \cdot ha^{-1} \cdot rok^{-1}$ (24, 25, 31, 33).

Czasami obserwujemy oddziaływania pomiędzy osobnikami należącymi do różnych gatunków, ale współistniejących ze sobą w tych samych niszach ekologicznych. Istnienie tego zjawiska budzi ciekawość odnośnie stopnia złożoności oddziaływania, ich specyficzności, mechanizmów kontrolujących interakcję i komunikację międzygatunkową. Dodatkowym aspektem interesującym człowieka jest jego znaczenie ekonomiczne dla rolnictwa. Oddziaływania międzygatunkowe mogą decydować o żywotności i produktywności ekosystemów. Charakterystyczną cechą wszystkich układów symbiotycznych jest ich trwałość. Oznacza to, że powinny one trwać w symbiozie przynajmniej przez większą część życia.

W przypadku układów symbiotycznych, tworzonych przez bakterie i rośliny obserwujemy wysoki stopień specyficzności np. *Enisfer meliloti* zakaża lucernę, nostrzyk i kozieradkę, podczas gdy *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* – koniczynę (33, 34). Oznacza to, że symbioza ryzobiów z roślinami bobowatymi jest swoistym procesem, który charakteryzuje się tym, że dany gatunek bakterii zakaża tylko określone gatunki roślin (22). Niektóre ryzobia mogą indukować tworzenie brodawek u jednego lub kilku gatunków roślin bobowatych, a inne wykazują szeroki zakres gospodarzy roślinnych (19).

Tabela 2

Wybrane bakterie brodawkowe i ich symbiotyczni gospodarze roślinni

Roślina	Bakteria	Referencje
Rodzaj – <i>Rhizobium</i>		
Wyka	<i>R. leguminosarum</i> biowar <i>viciae</i>	Frank, 1889
Koniczyna	<i>R. leguminosarum</i> biowar <i>trifoli</i>	Frank, 1889
Fasola	<i>R. leguminosarum</i> biowar <i>phaseoli</i>	Frank, 1889
Lucerna siewna	<i>R. daejeonense</i>	Quan i wsp., 2005
Rutwica lekarska, rutwica wschodnia	<i>R. galegae</i>	Lindström, 1989
Indygowiec	<i>R. indigoferae</i>	Wei i wsp., 2002
Traganek, lespedeza	<i>R. loessense</i>	Wei i wsp., 2003
Rodzaj – <i>Ensifer</i> (dawniej <i>Sinorhizobium</i>)		
Lucerna, nostrzyk, kozieradka	<i>E. meliloti</i>	Dangeard, 1926; de Lajudie i wsp., 1994; Young, 2003
Akacja, turi	<i>E. saheli</i>	de Lajudie i wsp., 1994; Young, 2003
Soja warzywna	<i>E. xinjiangense</i>	Chen i wsp., 1988; Peng i wsp., 2002; Young, 2003
Lucerna	<i>E. medicae</i>	Rome i wsp., 1996; Young, 2003
Akacja	<i>E. americanum</i>	Toledo i wsp., 2003

Tabela 2 cd.

Rodzaj – <i>Mesorhizobium</i>		
<i>Astragalus sinicus</i>	<i>M. huakuii</i>	Chen i wsp., 1991; Jarvis i wsp., 1997
Komonica, przelot, łubin	<i>M. loti</i>	Jarvis i wsp., 1982; Jarvis i wsp., 1997
Ciecierzycza	<i>M. ciceri</i>	Jarvis i wsp., 1997

Źródło: (Brockwell i in., 2005 (4); Willems, 2006 (53); <http://www.bacterio.cict.fr/> (15); <http://www.rhizobia.co.nz/> (17); Young i in., 2004 (56)

Przykładem oddziaływania organizmów prokariotycznych z eukariotycznymi jest zjawisko symbiozy bakterii brodawkowych z roślinami bobowatymi. W tym przypadku mikroorganizm nazywamy *mikrosymbiontem* a organizm wyższy – *makrosymbiontem* (33). Wzajemna współzależność pomiędzy roślinami bobowatymi a bakteriami brodawkowymi to współzycie dwóch organizmów, z którego oba wynoszą korzyść. Mikrosymbiont przekształca azot atmosferyczny w amoniak, zaopatrując tkanki roślin w aminokwasy i białka. W zamian gospodarz roślinny dostarcza bakteriom powstające w fotosyntezie cukry i inne substancje (23).

Kompleks enzymatyczny – nitrogenaza

Kompleks enzymatyczny umożliwiający wiązanie azotu cząsteczkowego zwany jest nitrogenazą. Składa się ona z dwóch białek żelazowo-siarkowych, będących multimerami. Pierwsze z nich to białko żelazowe (Fe-proteina) zwane także reduktazą dinitrogenazy, w obrębie którego następuje wiązanie ATP, i które dostarcza elektrony o wysokim potencjale redukcyjnym. Metaloproteina Fe kodowana jest przez gen *nifH*. Jest ona dimerem zawierającym dwie identyczne podjednostki o masie cząsteczkowej około 30 kDa, które połączone są ugrupowaniem 4Fe-4S. Drugie białko to białko molibdenowo-żelazowe (Mo-Fe-proteina), inaczej dinitrogenaza, w obrębie którego następuje wiązanie i redukcja N₂. Jego masa cząsteczkowa wynosi 240 kDa. Jest tetramerem złożonym z dwóch podjednostek α i dwóch podjednostek β. Zawiera dwa centra aktywne zwane: kofaktorem-FeMo oraz centrum-P. Heterotetramer Mo-Fe kodowany jest przez geny *nifD* i *nifK*. Należy wspomnieć, że nitrogenaza jest enzymem niezwykle wrażliwym na działanie tlenu. Nawet śladowe ilości cząsteczkowego O₂ mogą prowadzić do jej nieodwracalnego uszkodzenia (2, 24, 25, 33, 28, 47).

Biologiczne wiązanie azotu to redukcja azotu atmosferycznego do NH₃ przy udziale kompleksu nitrogenazy. Proces ten można sumarycznie przedstawić następująco:



Elektrony dostarczane są z procesów energiotwórczych np. z procesów oksydacyjnych czy fotosyntezy, przenoszone są na nitrogenazę za pośrednictwem flawodoksyny i ferrodoksyny – w pierwszym etapie do reduktazy dinitrogenazowej, a następnie z równoczesnym zużyciem 16 moli ATP do dinitrogenazy.

Bakterie z rodzaju *Azospirillum* spp. i *Rhizobium* spp.

Jedną z najczęściej opisywanych grup bakterii wolnożyjących i wiążących azot są bakterie z rodzaju *Azospirillum* spp. Bakterie te są Gram-ujemne i należą do klasy α - *Proteobacteria*, w której znajdują się także inne grupy mikroorganizmów wiążących azot, takie jak *Rhizobium* czy *Bradyrhizobium* (1, 24, 43). *Azospirillum* są szeroko rozpowszechnione na całym świecie i występują w dużych ilościach (nawet do 10^7 komórek/g gleby ryzosferowej) (13) oraz w asocjacji z korzeniami, łodygami i liśćmi różnych roślin (głównie zboża i trawy), uprawianych zarówno w klimacie umiarkowanym, jak i tropikalnym (43, 24, 13, 1). Bakterie te są jednymi z najlepiej zbadanych bakterii występujących w strefie korzeniowej roślin i stymulujących ich wzrost. Należą one to grupy bakterii PGPR (ang. *plant growth-promoting rhizobacteria*). Obecnie znanych jest 18 gatunków *Azospirillum*, (w kolejności odkrycia): *A. lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens*, *A. irakense*, *A. largimobile*, *A. doebereineriae*, *A. oryzae*, *A. melinis*, *A. canadense*, *A. zea*, *A. rugosum*, *A. picis*, *A. thiophilum*, *A. formosense*, *A. fermentarium*, *A. himalayense*, *A. humicireducens* (16, 43). Spośród nich gatunki *A. brasilense* i *A. lipoferum* są najlepiej przebadanymi i dobrze opisanymi gatunkami. Bakterie te są szeroko rozpowszechnione na świecie, występują w klimacie umiarkowanym, tropikalnym i zwrotnikowym. Bakterie z rodzaju *Azospirillum* występują w strefie korzeniowej roślin lub jako endofity w powierzchniowych tkankach roślinnych (24). Niewątpliwie odgrywają one znaczącą rolę uprawie roślin, ponieważ wiążą wolny azot atmosferyczny przy udziale kompleksu nitrogenazy (ang. *biological nitrogen fixation* – BNF). Dodatkowo należy wspomnieć, iż jest to ważna grupa bakterii, także ze względu na możliwość uruchamiania przez nie mechanizmów zwalczających patogeny roślinne (bioprotektanty), poprawiających pobieranie składników pokarmowych (bionawozy) oraz zdolności do produkcji hormonów roślinnych (biostymulatory); (43).

Bakterie brodawkowe, zwane ryzobiami, zaliczane są do dobrze znanej grupy bakterii glebowych, które – współżyjąc z roślinami bobowatymi – powodują powstawanie na nich brodawek korzeniowych, w których zachodzi procesie wiązania azotu atmosferycznego. W tych układach symbiotycznych dochodzi do przekształcenia azotu do formy przyswajalnej dla gospodarza roślinnego (29, 30, 54). Podobnie jak rośliny, które są gospodarzami dla mikrosymbiontów, również ryzobia nie stanowią, z punktu widzenia systematyki, jednolitej grupy o wspólnej filogenezie (44, 53, 56, 53).

Wśród symbiotycznych bakterii wiążących azot najczęściej opisywaną grupą są bakterie z rodzaju *Rhizobium* spp. Zaliczane są one do Gram-ujemnych, tlenowych, urzęsionych pałeczek, które nie tworzą form przetrwalnych. Sklasyfikowane są do klasy α -*Proteobacteria*. *Rhizobium* po łacinie oznacza „żyjący w korzeniu”. Do rodzaju *Rhizobium* zaliczanych jest obecnie 93 gatunków. Wykazują one zdolność do nawiązywania symbiozy z korzeniami roślin bobowatych, np. fasolą, grochem, wyką (9, 11, 17, 51).

Ogólna charakterystyka poszczególnych etapów procesu symbiozy

Nawiązanie symbiozy między rizobiami a roślinami bobowatymi jest złożonym procesem, w wyniku którego dochodzi do wytworzenia efektywnej brodawki korzeniowej wiążącej azot atmosferyczny (31, 34, 31).

A) Wzajemne rozpoznanie partnerów symbiozy

Proces powstawania efektywnej brodawki korzeniowej rozpoczyna się od wymiany cząsteczek sygnałowych pomiędzy rośliną i bakteriami symbiotycznymi (48). Korzenie rośliny wydzielają dużą ilość substancji, będących atraktantami dla odpowiednich mikrosymbiotycznych partnerów. Spośród szeregu związków najważniejsze dla procesu symbiozy są flawonoidy. Ich zadaniem jest ograniczenie wzrostu bakterii konkurujących z ryzobiami oraz indukcja u bakterii brodawkowych ekspresji genów (*nod*, *nol* i *noe*), zwanych ogólnie genami *nod* (ang. *nodulation genes*) (8, 48, 49, 52). Z kolei bakterie, w odpowiedzi na sygnały roślinne, uaktywniają geny NOD. Geny te odpowiedzialne są za kodowanie białek biorących udział w bakteryjnej syntezie i eksporcie czynnika Nod (10). Czynniki Nod jest lipochitoooligosacharydem sygnałowym (41, 42, 48).

B) Adsorpcja bakterii brodawkowych do powierzchni młodych włośników korzeniowych

Po zasiedleniu strefy ryzosferowej przez bakterie brodawkowe następuje ich adsorpcja do młodych włośników korzeniowych. Badania mikroskopowe koniczyny szczepionej *R. leguminosarum* bv. *trifolii* wykazały, że proces adsorpcji zachodzi w dwóch etapach. W pierwszym etapie (mechanizm niespecyficzny, adhezja odwracalna) adsorbują się jedynie niewielka liczba bakterii, zarówno specyficznych, jak i niespecyficznych wobec gospodarza roślinnego. Natomiast w etapie drugim (mechanizm specyficzny, adhezja nieodwracalna) następuje adsorpcja tylko bakterii specyficznych w stosunku do gospodarza roślinnego (12, 34, 46, 48).

C) Zniekształcenie włośników korzeniowych

W wyniku odpowiedzi na obecność zaadsorbowanych do powierzchni włośnika korzeniowego bakterii dochodzi do zmiany kierunku jego wzrostu i do deformacji. Zniekształcenie to jest wywołane zahamowaniem wzrostu ściany w miejscu, w którym przyczepiona jest komórka bakteryjna, co powoduje zagięcie i skręcenie włośnika, a także powstanie struktury zwanej „laską pasterza” (ang. *shepard's crook*) (3, 34, 48).

D) Rozwój nici infekcyjnej

W wyniku obrony rośliny przed infekcją, bakteria zostaje unieruchomiona pomiędzy roślinnymi ścianami komórkowymi i elementami błony cytoplazmatycznej wygiętego włósnika. W skręconym włósniku bakterie rosną i dzielą się w strukturach zwanych niciami infekcyjnymi (ang. *infection threads*) (14, 48). Zadaniem nici infekcyjnej jest wprowadzenie bakterii do tworzących się brodawek. Równocześnie powstaje tzw. prymordium (związek) brodawki korzeniowej z dzielących się komórek miększu kory pierwotnej (8, 31, 34, 48, 50, 52).

Po utworzeniu przez nić infekcyjną prymordium brodawki korzeniowej zachodzi uwolnienie bakterii na drodze endocytozy ze szczytu nici do wnętrza komórek roślinnych. Podczas uwalniania bakterie brodawkowe zostają otoczone błoną perybakteroidalną-PBM (ang. *peribacteroid membrane*) pochodzenia roślinnego. Zadaniem tej struktury jest mechaniczna ochrona przed reakcją obronną gospodarza oraz wymiana substancji między partnerami. Bakterie otoczone błoną perybakteroidalną tworzą tzw. symbiosomy. W obrębie symbiosomów dochodzi do różnicowania się ryzobliów i powstają tzw. bakteroidy wiążące azot atmosferyczny. Natomiast z tetraploidalnych komórek kory korzenia powstają brodawki korzeniowe. Bakteroidy znajdujące się w brodawkach posiadają zdolność wiązania azotu atmosferycznego z udziałem kompleksu enzymatycznego – nitrogeazy (8, 21, 31, 34).

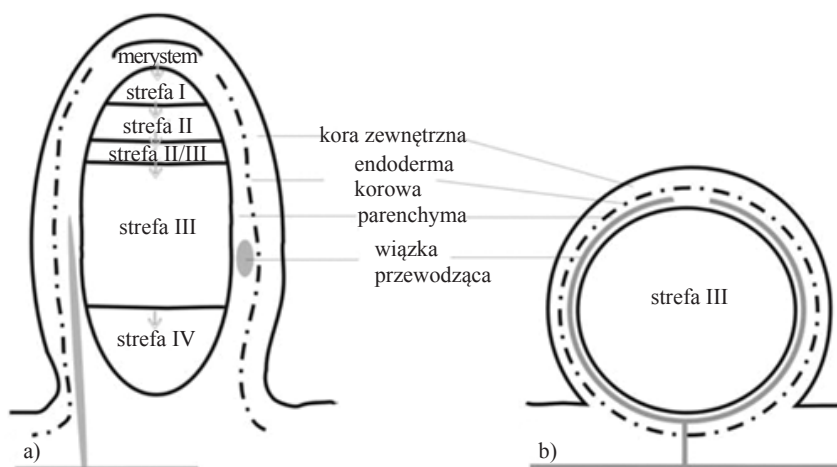
Brodawki korzeniowe roślin bobowatych to organy o złożonej strukturze, których zadaniem jest stworzenie odpowiednich warunków do redukcji azotu atmosferycznego przez bakterie brodawkowe. Generalnie u roślin motylkowatych można wyróżnić dwa rodzaje brodawek, różniących się morfologią i sposobem powstawania (rys. 2).

- Brodawki zdeterminowane czyli ograniczone – występują u roślin pochodzących ze strefy tropikalnej np. soja, fasola, komonica. Są kształtu kulistego (sferycznego). Brodawki te charakteryzują się ograniczonym wzrostem, co spowodowane jest krótkotrwałą aktywnością merystemu (funkcjonuje zaledwie kilka dni). W przeciwieństwie do brodawek niezeterminowanych, tkanka bakterioidalna brodawek zdeterminowanych nie jest zróżnicowana na strefy, a ich wiązki przewodzące tworzą system zamknięty. Rozmiary brodawki powiększają się w wyniku rozrastania się komórek, a nie ich podziałów. Brodawka eksportuje zredukowany azot w postaci ureidów, czyli pochodnych mocznika (Rys. 2); (10, 14, 31, 32).

- Brodawki niezeterminowane czyli nieograniczone – występują u roślin pochodzących ze strefy umiarkowanej np. koniczyna, groch, lucerna czy wyka. Mają kształt cylindryczny. Tkanka merystematyczna może funkcjonować przez cały okres wegetacji (rys. 2).

W dojrzałej tkance brodawki nieograniczonej można wyróżnić strefy (rys. 2):

- I. Strefa merystematyczna – utworzona przez dzielące się komórki merystematyczne.
- II. Strefa infekcji – w jej obrębie dochodzi do uwolnienia bakterii z nici infekcyjnej do komórek roślinnych oraz do powstania symbiosomów.
- II/III. Strefa przejściowa - dochodzi w niej do różnicowania się bakteroidów.
- III. Strefa symbiotyczna – w niej zachodzi proces wiązania atmosferycznego azotu; bakteroidy mają kształt liter: T, X i Y.
- IV. Strefa starzenia się – komórki roślinne i bakteroidalne ulegają degeneracji.



Rysunek 2. Schemat przedstawiający brodawki a) typu niezdeterminowanego i b) typu zdeterminowanego

Źródło: Sujkowska, 2009 (48)

Wiązki przewodzące w brodawce niezdeterminowanej rozrastają się i tworzą system otwarty, a zredukowany azot transportowany jest do różnych części rośliny w formie amidów (7, 10, 14, 28, 31, 32).

W zewnętrznej części obu typów brodawek znajduje się kora zewnętrzna, której funkcją jest ochrona brodawki przed inwazją mikroorganizmów z ryzosfery i przed wysychaniem. Uznaje się ją za element bariery tlenowej ograniczającej dyfuzję tlenu do wnętrza brodawki. Po wewnętrznej stronie endodermy korowej znajdują się wiązki przewodzące, które wnikają do endodermy korzenia, a ich funkcja związana jest z transportowaniem produktów asymilacji (31, 39).

Podsumowanie

Azot (N_2) stanowi około 80% ziemskiej atmosfery. Niestety, w formie gazowej jest nieprzyswajalny dla większości organizmów żywych. Dlatego rośliny, zwierzęta

i mikroorganizmy mogą doświadczać tzw. „głodu azotowego”, mimo że w atmosferze występuje on w tak dużych ilościach. Wszystkie organizmy żywe wykorzystują azot do budowy aminokwasów, białek, kwasów nukleinowych i innych składników niezbędnych do życia.

Biologiczne wiązanie azotu jest procesem, który zmienia obojętny N_2 w biologicznie użyteczny NH_3 . Proces ten zachodzi w naturze jedynie przy udziale mikroorganizmów prokariotycznych nazwanych diazotrofami. Pod względem ekologicznym można wyróżnić dwie grupy bakterii wiążących azot atmosferyczny: wolnożyjące np. *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp. oraz bakterie wiążące azot w układach symbiotycznych z roślinami bobrowatymi, np. *Rhizobium* spp.

Redukcja azotu atmosferycznego jest złożonym procesem, którego efektem jest powstanie brodawki korzeniowej, w której zachodzi proces wiązania azotu. Jednak wymaga on dużego nakładu energii. Mikroorganizmy wiążące azot potrzebują 16 moli adenozyotrójfosforanu (ATP) dla zredukowania 1 mola azotu. Badania potwierdzają, że symbioza bakterii brodawkowych i roślin bobowatych w znaczący sposób zmniejszyła zapotrzebowanie roślin na syntetyczne nawozy mineralne i przyczynia się do powstawania upraw ekologicznych.

Literatura

1. Bashan Y., Levany H.: Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol., 1990, **36**: 591-608.
2. Bothe H., Schmitz O., Yates M.G., Newton W.E., Nitrogen Fixation and Hydrogen Metabolism in Cyanobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2010, **74**, **4**: 529-551.
3. Brewin N.J.: Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. Crit. Rev. Plant Sci., 2004, **23**: 293-316.
4. Brockwell J., Searle S.D., Jeavons A.C., Waayers M.: Nitrogen Fixation in Acacias: an Untapped Resource for Sustainable Plantations. Farm Forestry and Land Reclamation. ACIAR Monograph., 2005: 115 - 132.
5. Cheng Q.: Perspectives in biological nitrogen fixation research. J. Integr. Plant Biol., 2008, **50**(7): 784-796.
6. Chodań J., Grzesiuk W., Mirowski Z.: Zarys gleboznawstwa i chemii rolnej. PWN Warszawa, 1980.
7. Crespi M., Gálvez S.: Molecular mechanisms in root nodule development. J. Plant Growth Regul., 2000, **19**: 155-166.
8. Deakin W. J., Broughton W. J.: Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion system. Nat. Rev. Microbiol., 2009, **7**: 312- 320.
9. Doyle J. J.: Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. Trends Plant Sci., 1998, **3**: 473-478.
10. Gage D. J.: Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing *Rhizobia* during nodulation of temperate legumes. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004, **68**: 280-300.
11. Garrity G. M., Bell J., Lilburn T. G.: Taxonomic outline of the Procaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Release 5.0. Springer-Verlag, New York, 2004.
12. Głowacka M., Szyprowska S.: Rola lipopolisacharydów *Rhizobium* w tworzeniu efektywnej symbiozy. Post. Mikrobiol., 1996, **35**: 451-452.

13. Hartmann A., Baldani J.I.: The Genus *Azospirillum*. Prokaryotes, 2006, **5**: 115-140.
14. Hirsch A. M., Lum M. R., Downie J. A.: What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? Plant. Physiol., 2001, **127**: 1484-1492.
15. <http://www.bacterio.cict.fr/>
16. <http://www.bacterio.net/azospirillum.html>
17. <http://www.rhizobia.co.nz/>
18. Ishizuka J.: Trends in biological nitrogen fixation research and application. Plant Soil., 1992, **141(1-2)**:197-209.
19. Jakubowska A., Kowalczyk K.: Biochemiczne i molekularne podstawy symbiotycznych oddziaływań bakterii i roślin. Post. Bioch., 1998, **44(1)**:73-82.
20. Kłama J.: Współzycie endofitów bakteryjnych z roślinami. Acta Sci. Pol., Agric., 2004, **3(1)**: 19-28.
21. Komaniecka I., Choma A.: Składniki lipidowe *Rhizobiaceae*. Post. Mikrobiol., 2001, **40**, **1**: 7-30.
22. Kopicńska J., Golinowski W.: Czynniki nod – cząsteczka sygnałowa w interakcji rośliny motylkowate-*Rhizobium*. Kosmos, 1995, **44**: 579-587.
23. Kretowicz W.: Przemiany azotu w roślinach, PWRiL, Warszawa, 1977.
24. Król M.: *Azospirillum* – asocjacyjne bakterie wiążące azot. Monografie i rozprawy naukowe, IUNG-PIB, Puławy, 2006, **15**: 45-55, 66-74.
25. Król M. J., Zielewicz - Dukowska J.: Genetyczne aspekty wiązania N₂ bakterii z rodzaju *Azospirillum*. Post. Mikrobiol., 2005, **44**, **1**: 47-56.
26. Krug E. C., Winstanley D.: The need for comprehensive and consistent treatment of the nitrogen cycle in nitrogen cycling mass balance studies: I. Terrestrial nitrogen cycle. Sci Total. Environ., 2002, **293**: 1-29.
27. Krupka H.M.: Wybrane problemy biologicznego wiązania azotu atmosferycznego. Wiad. Ekol., 1984, **30(3)**: 249-270.
28. Księżak J., Staniak M., Bojarszczuk J.: The regional differentiation of legumes croppingarea in Poland between 2001 and 2007. Polish J. Agron., 2009, **1**: 25-31.
29. Laguerre G., Louvrier P., Allard M. R., Amarger N.: Compatibility of rhizobial genotypes within natural populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. Appl. Environ. Microb., 2003, **69**: 2276-2283.
30. Liu J., Wang E. T., Chen W. X.: Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. Syst. Appl. Microbiol., 2005, **28**: 465-477.
31. Łotocka B.: Anatomia rozwojowa i ultrastruktura brodawek korzeniowych o nieograniczonym wzroście i jej specyfika u roślin z plemienia *Genisteeae*. Rozprawy Naukowe i Monografie, Wydawnictwo SGGW, Warszawa, 2008, ss. 226.
32. Łotocka B., Golinowski W.: Powstawanie i rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowatych. Kosmos, 1995, **44**: 569-578.
33. Mądrzak C. J.: Molekularne mechanizmy symbiozy *Rhizobiaceae* z roślinami motylkowatymi. Rozprawa habilitacyjna, Wydawnictwo AR w Poznaniu, 1995, Poznań, ss.232.
34. Małek W., Kontrola genetyczna symbiozy *Rhizobium meliloti* z *Medicago sativa*. Rozprawa habilitacyjna XLVI. Wydawnictwo UMCS Lublin, 1992, ss.158.
35. Mancinelli R. L.: The nature of nitrogen: an overview. Life Support Biosph. Sci., 1996, **3**: 17-24.
36. Mancinelli R. L., Smernoff D. T., White M. R.: Controlling denitrification in closed artificial ecosystems. Adv. Space. Res., 1999, **24**: 329-334.
37. Martyniuk S.: Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi. Polish J. Agron. 2012, **9**: 17–22.
38. Martyniuk S.: Znaczenie biologicznego wiązania azotu atmosferycznego w rolnictwie ekologicznym. J. Res. Appl. Agric. Engin., 2008, **53(4)**: 9-14.
39. Minchin F. R.: Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. Soil Biol. Biochem., 1997, **29**: 881- 888.

40. Napora A., Kacprzak M., Nowak K., Grobelak A.: Wpływ bakterii endofitycznych na promowanie wzrostu roślin w warunkach stresowych. *Post. Biochem.*, 2015, **61(4)**: 398-402.
41. Oldroyd G. E. D., Downie J. A.: Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Natl. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004, **5**: 566-576.
42. Perret X., Staehelin C., Broughton W. J.: Molecular basis of symbiotic Promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, **64**: 180-201.
43. Rodrigues A.C., Bonifacio A., de Araujo F.F., Lira Junior M.A., Figueiredo M.B.: *Azospirillum* sp. as a Challenge for Agriculture. In: *Bacterial Metabolites in Sustainable Agroecosystem*, D.K. Maheshwari (Editor), Springer International Publishing Switzerland, 2015: 29-51.
44. Sawada H., Kuykendall L. D., Young J. M.: Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen – fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 2003, **49**: 155-179.
45. Sawicka A.: Czynniki ograniczające wiązanie azotu atmosferycznego u roślin motylkowatych i traw. *Biul. Oceny Odmian*, 1997, **29**: 53-58.
46. Smit G., Swart S., Lugtenberg B. J., Kijnej W.: Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol. Microbiol.*, 1992, **6**: 2897–903.
47. Stryer L., Berg J. M., Tymoczko J. L.: *Biochemia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, 2009, Warszawa.
48. Sujkowska M.: Przebieg procesu infekcji w układzie symbiotycznym rośliny motylkowate – *Rhizobium*. *Wiadomości Botaniczne*, 2009, **53(1/2)**: 35 -53.
49. Turska-Szewczuk A., Russa R.: Charakterystyka lipopolisacharydów *Rhizobium* i ich znaczenie w procesie symbiozy. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43, 4**: 434-458.
50. Tylman I., Kowalczyk S.: Receptory i szlaki sygnałowe regulujące symbiozę brodawkową i mikoryzę arbuskularną. *Post. Biol. Komórki*, 2012, **39, 3**: 429-458.
51. Weir B. S., Turner S. J., Silvester W. B., Park D.-C., Young J. M.: Unexpectedly Diverse *Mesorhizobium Strains* and *Rhizobium leguminosarum* Nodulate Native Legume Genera of New Zealand, while Introduced Legume Weeds Are Nodulated by *Bradyrhizobium* Species. *Appl. Environ. Microb.*, 2004, **70**: 5980-5987.
52. Wielbo J., Skorupska A.: Ewolucja układu symbiotycznego *Rhizobium* – rośliny motylkowate. *Post. Mikrobiol.*, 2003, **42, 3**: 263-283.
53. Willems A.: The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil*, 2006, **287**: 3-14.
54. Wolde-Meskel E., Terefe work Z., Frostegard A., Lindstrom K.: Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from agroforestry legume species in southern Ethiopia. *Int. J. Syst. Evol. Micr.*, 2005, **55**: 1439-1452.
55. Young J. M., Park D. C., Weir B. S.: Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium* spp. implications for species determinations. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004, **238**: 125-131.

Adres do korespondencji:

mgr Małgorzata Łyszcz
Zakład Mikrobiologii Rolniczej
IUNG-PIB, Puławy
ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy
tel. 81 4786960
e-mail: mlyszcz@iung.pulawy.pl