

I. Значение на азотното хранене

В сухото вещество на растенията освен С, О и Н₂ се съдържа още и азот в количество 2 - 4%, а в белтъците той е 15 – 19% и заема четвърто място по количество в състава на органичните вещества. За да бъде усвояван азотът е необходима енергия, която може да се получи при разграждане на въглехидрати. Растежа на растенията зависи съществено от наличието на азот в почвата. Между усвояването на азота и продуктивността на растенията съществува тясна зависимост. Тази зависимост важи както за отделното растение, така и за цялата растителност.

Растителните процеси на растенията се ограничават от количеството на азота, в следствие, на което много от тях остават ниски, с малко клетки в тъканите, с груби клетъчни стени. Азотното съдържание в атмосферата е около 80%, но растенията страдат от недостиг на азот и са принудени да използват само този, който е в почвата. Азотното съдържание в почвата е силно ограничено и за да се осигури необходимото количество за растенията, необходимо е той да бъде внасян в почвата чрез азотно подхранване.

II. Източници на азот в почвата

Източник на азот за повечето растения е този от почвата, който се намира в органична и неорганична форма. Минералните вещества, които растенията извличат от почвата, са във вид на нитратни и амониеви соли, а органичните съединения са белтъчните вещества на хумуса и продуктите от тяхното разпадане – аминокиселини. Това са различни форми азот, които растенията си доставят за синтеза на органични вещества. Количеството на азота в почвата е недостатъчно – около 0,002 – 0,004% амонячен азот и 0,004% нитратен азот и заедно органичен и неорганичен азот от 0,3 – 0,4%, в почвата преобладава органичният азот.

Въпроса за усвояване на органичния азот е бил разрешен лабораторно, в стерилна

среда, където органичният азот е подаден във вид на карбамид – $\text{H}_2\text{N-CO-NH}_2$,

СХЕМА

или аспарагии – $\text{CO}(\text{NH}_2) \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CHNH} \cdot \text{COOH}$. Било е установено, че тези съединения лесно се усвояват от растенията. Белтъците, липидите и други неразтворими във вода съединения не се усвояват от растенията. За да може азотът, съдържащ се в тези вещества, да се поеме от растенията, последните в почвата се подлагат на процеса амонификация с участие на почвените микроорганизми – амонификатори. Благодарение на ензими, съдържащи се в тези микроорганизми, белтъчните съединения се хидролизират до аминокиселини, а последните се дезаминират до оксикиселина и се освобождава амоняк:



Този амоняк под действие на нитрифициращи бактерии може да се окисли до нитрати или пък при кисели и недобре аерирани почви да образува амониеви соли. Обикновено зелените растения използват неорганично свързан азот под форма на нитратни и амониеви йони (NO_3^- и NH_4^+). Тъй като поглъщането и пренасянето на азота изисква енергия, която се получава при дишането, при студени и слабо аерирани почви растенията често страдат от недостиг на азот поради подтискане на дишането от ниските температури.

III. Асимилация на азота и първична синтеза на амоняк

Погълнатият от растенията азот се включва във вид на аминокрупа към въглеродните съединения, като се образува аминокиселина. Преди това, за да бъде усвоен азотът от нитратите, необходимо е да последният да бъде редуциран до амоняк. Това се извършва в няколко последователни реакции с участието на няколко вида ензими, както това е показано на схемата по-долу. Както се вижда от схемата, всяка реакция се

съпровожда с изменение на валентността на азота и се катализира от съответен ензим: нитратредуктаза, нитритредуктаза, хипонитиритредуктаза, хидроксиламинредуктаза. Всеки ензим работи с участието на определени микроелементи: при нитратредуктазата – молибден, при нитритредуктазата и хипонитиритредуктазата –

СХЕМА

мед, желязо и магнезий, а при хидроксиламинредуктазата – манган и магнезий. Всички изброени ензими са флавопротеиди и се активират от горепосочените микроелементи. Донатор на електрони за редукция на нитратите са НАДН₂ и НАДФН₂ и редуцираният фередоксин. Участието на тези вещества в редукцията на нитратите в представено на

Нитратредуктазата е индуктивен ензим, тъй като той се активира само в присъствието на малко количество нитрати (2 – 4 мкг на растение) и за кратко време (3 – 4 часа).

СХЕМА

Реакцията на преаминиране се катализира от специфични ензими трансминази или аминотрансферази, чиято активна група е фосфорният естер на витамин В₆ – пиридоксалфсфат:

СХЕМА

IV. Първична синтеза на аминокиселини

Тя протича по две реакции:

1. *Реакция на редуционнно аминирание*. При растенията тя е била открита от Кретович при прорастъци от житни растения, тиква и грах. Тя протича по следната схема:

който участва, е аланиндехидрогеназа и работи с кофактор НАДН₂. Друг ензим, открит от същия автор е глутаматдехидрогеназата, който катализира образуването на глутаминова киселина от кетоглутарова киселина и NH₃.

По-разпространена реакция за синтезата на аминокиселини е реакцията на трансаминирание, открита от Браунщейн и Крицман през 1937г.

СХЕМА

Тази реакция преминава в няколко етапа: аминокиселина взаимодейства с някоя кетокиселина, в резултат на което се образува нова аминокиселина и една кетокиселина, т.е. трансаминането или преаминането се извършва между една аминокиселина, като последната приема аминогрупата от аминокиселината.

2. Втора важна реакция, водеща до включването на неорганичния азот в аминокиселини, е *АТФ-зависимото превръщане на глутамата в глутамин*.

СХЕМА

Биосинтезата на аспарагинова киселина се извършва по два начина: 1) *Чрез реакцията на трансаминане*, при което кислородът в I кетогрупа на оксалата се заменя с amino-група.

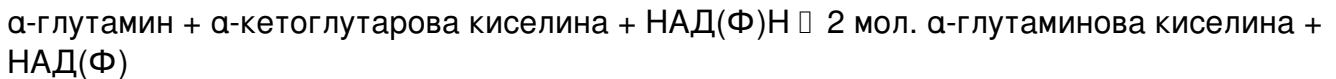
СХЕМА

Подобни реакции са обратими и служат като звено между метаболитните пътища на аминокиселините и въглехидратите. Аспарагинова киселина се синтезира в реакцията на пряко аминирание.

2) Чрез пряко аминирание на фумарата:

СХЕМА

Доскоро се смяташе, че основният път на асимилация на амония става посредством редукиращото аминирание: α -кетоглутарова киселина, катализирана от глутаматдеhidрогеназа и реакциите на трансаминирание. След откриване на новия ензим глутаматсинтетеза е било показано, че в бактериите *Aerobacter aerogenes* има друг алтернативен път, който функционира в условия на наличие на нитрати и при недостатъчно количество на амоний в средата. Сега този ензим е намерен не само в бактерии, но и във висши растения. Глутаматсинтетезата катализира следната реакция:



Както се вижда от реакцията, глутаминът е донор на аминокгрупата, чрез която става аминирание на α -кетоглутаровата киселина. Образуват се две молекули глутаминова киселина. От уравнението се вижда още, че глутаматсинтетезата работи при наличието на глутамин. Последният се синтезира от глутаминова киселина и амоняк с участие на ензима глутаматсинтетеза:



По такъв начин двата ензима образуват система, която действа едновременно и последователно.

Въпросът за ключовите реакции на асимилацията на амоний – първо синтезата на глутамин и от него на глутаминова киселина, е непосредствено свързан с биологичната фиксация на молекулярния азот, тъй като първият продукт от асимилацията на молекулярния азот е амонякът, който след това ще бъде използван чрез горепосочените реакции за синтезата на аминокиселините.

Синтезата на аминокиселините може да се извърши още от първичния траен продукт на фиксация при С3-тип растения – 3-фосфорглицеринова киселина (ФКГ). Последната под действието на ензими от енолазната система се превръща във фосфоенолпируват (ФЕП). Пируваткиназата превръща ФЕП в пирогроздена киселина, от която чрез пряко редуциционно аминирание се получава аланин. Освен по този пряк начин, включвайки се в цикъла на Кребс, пирогроздената киселина става източник за получаване и на други аминокиселини. Така например от оксалоцетната киселина чрез аминирание се получава аспарагинова киселина.

V. Вторична синтеза на аминокиселини и синтеза на амиди

В резултат на хидролиза на белтъка се получават аминокиселини и амиди. Така получените аминокиселини се разграждат чрез следните реакции:

1. *Дезаминиране*. При него се освобождава аминната група и се образува съответна кетокиселина. Обикновено то е окислително. Така например при окислително дезаминиране:

аланин + H₂O – 2H⁺ ⇌ пирогроздена киселина + H₃;

аспарагинова киселина + H₂O – 2H⁺ ⇌ оксалоцетна к-на + H₃;

глутаминова киселина + H₂O – 2H⁺ ⇌ кетоглутарова к-на + H₃.

Освободените кетокиселини отново се превръщат в аминокиселини или се включват в дишането, като се разграждат до CO₂ и вода.

2. *Окислително декарбоксилиране.* При него се освобождава CO₂ от карбонилната група и се образуват тъй наречените амини:



Например: цистеин → цистеамин

аспарагинова к-на → β-аланин

(двата амина влизат в състава на КоА)

триптофан → хетероауксин (γ-индолоцетна к-на – растежен регулатор)

глутаминова к-на → γ-аминомаслена к-на

3. *Взаимно превръщане на една аминокиселина в друга.* Например:

пролин + O₂ → оксипролин

серин + H₂ → цистеин

пролин □ орнитин

Освободеният при тези реакции амоняк отново се включва в органични съединения чрез реакции на амидиране на глутаминовата и аспарагиновата киселина, в резултат на което се образуват двата най-разпространени амида – глутамин и аспарагин. Аспарагиновата киселина може да се синтезира освен чрез аминирането на оксалоцентната киселина още и чрез аминиране на фумаровата киселина, катализирано от ензима аспартаза. Образованата аспарингова киселина се амидира подобно на глутаминовата киселина и се получава аспарагин.

VI. Биологична фиксация на азота

Още в 1838г. френският учен Бусенго е наблюдавал, че добивът от пшеница е по-голям, когато се засява след бобови растения, отколкото след житни растения. От този факт Бусенго направил предположението, че бобовите растения асимилират молекулярен азот и по такъв начин обогатяват почвата с този макроелемент. Тези предположения не са били възприети тогава и даже много учени по това време, като Либих и др., са възразили на Бусенго. Едва след 50 години – в 1886г., с точни експерименти, проведени от Хелригел и др., било установено, че някои растения фиксират атмосферен азот. Този учен се счита за откривател на грудковите бактерии. Чиста култура от грудкови бактерии е била получена от Бейринт в 1888г., в които се извършва азотфиксация. С това той показал, че тези бактерии (*Rhizobium*) образуват грудките на корена. Както бе изтъкнато, във въздуха се съдържа 70 – 80% свободен молекулярен азот, който поради голямата си инертност не може да се редуцира при обикновени условия, а само при температура 400°C и 300 атмосфери налягане и катализатор може да се свърже в NH₃. Способността да се свързват по биологичен начин атмосферен азот имат някои свободни и симбиотично живеещи бактерии и синьозелени водорасли. В почвата широко са разпространени свободноживеещи азотфиксиращи бактерии. Така напр. 1 г почва съдържа от 2000 до 20000 бактерии, които за една година могат да обогатят почвата с 20 – 40 кг азот на 1 хектар. Известни са два вида свободно живеещи бактерии – аеробни и анаеробни. От аеробните най-широко разпространени са *Azotobacter* и *Chroococcum*, а от анаеробните – *Clostridium pasteurianum*.

Синьозелените водорасли също усвояват азот. По литературни данни натрупването на азот в почвата от тези водорасли може да достигне до 50 кг на един хектар за една година. Обогатяване с азот с помощта на синьозелени водорасли практически се

използва при отглеждането на ориз, като за целта се използват *Anabaena*, *Nostoc* и др. Тези синьозелени водорасли са напълно автотрофни, тъй като усвояват и въглерод, т. е. фотосинтезират. Те са разпространени в почвата, във водоеми, в горещи източници и други места. При тях фиксацията на азота започва с редукция на молекулярния азот – реакция, изискваща голямо количество енергия, която се получава от дишането.

Реакцията се катализира от ензима нитрогеназа. Установено е, че в лабораторни условия за фиксация на 1 г азот на азотобактериите са необходими 50 г глюкоза, а *Clostridium*

изразходва 170 г, което показва, че при естествени условия в почвата в недостатъчно количество са хранителните субстрати за развитие на бактериите. Известно е също така, че при ниски температури (от 0 до 3 –

4 °C

) нитрогеназата при синьозелените водорасли изгубва активността си, което говори, че този ензим не се адаптира към ниски температури. Неговият температурен оптимум е 20 – 25 °C. Сега е известно, че способността да фиксират азот е широко разпространена и при други видове бактерии, като сулфатредуциращите бактерии и пурпурната бактерия

(
Rhodospirillum rubrum

).

Освен свободно живеещите бактерии азот фиксират и симбиотично живеещите в корените на висшите растения бактерии. Най-известни са видовете *Rhizobium*, разпространени в грудките на бобовите растения. Установено е, че чрез симбиотичните азотфиксации в почвата може да се натрупат 200 кг азот на хектар – близо 10 пъти повече от свободно живеещите бактерии.

Витранен за първи път е установил, че грудковите клетки съдържат хемоглобин, наречен легхемоглобин и неговото количество се увеличава от интензивността на светлината. Бактериите *Rhizobium* са дребни с X-образна форма. Когато живеят свободно в почвата, те се делят и размножават и въпреки че съдържат ензима нитрогеназа, не могат да усвояват азота от въздуха. Тази способност бактериите придобиват в грудките на корена, където обикновено навлизат чрез кореновите власинки. В зависимост от вида на растенията грудките имат различна форма, натрупват се в различно количество и на определени места на корена. Например грудките при соята са разположени по целия корен, докато тези на лупината са съсредоточени само в началните разклонения на корена. След влизането на бактерията в кореновата клетка тя живее като паразит, получава от растителната клетка необходими за растежа хранителни вещества – главно захари и аминокиселини. Бактериите в клетките на грудките претърпяват редица морфологични и биохимични процеси, в резултат на което се образува бактериоид, който придобива функцията да фиксира N₂ от въздуха, но не и в присъствие на NH₃. Същевременно с навлизането на бактериите в корена, те предизвикват разрастване на неговите тъкани, което води до

образуване на грудките. При пълното развитие на последните, растението престава да черпи азот от почвата, поради азотфиксацията на бактериите. От казаното до тук се вижда, че в началото бактериите живеят паразитно, но по-късно паразит става самото растение хазяин, като паразитира за сметка на фиксирания азот от бактериоидите и накрая растението при умираването си ги разрушава. В промеждутъчната фаза двата организма живеят в типични симбионтни отношения – бактерията намира място за живеене и получава от клетката – хазяин енергия и съединения на въглерода, растението използва съединенията на азота, образувани от бактерията. Поотделно нито бактерията, нито бобовото растение имат способност да фиксират N_2 . Също не се наблюдава асимилиране на азот, когато върху корен от небобово растение се присади бобово растение.

Понастоящем широко се прилагат азотните торове, произведени по промишлен начин, но има и недостатъци при този вид торене, състоящи се в това, че азотните торове лесно се измиват от водата (50%) и замърсяват водоемите и реките. За това решаваща роля в кръговрата на азота в почвата все още играят растенията, които свързват молекулярния азот от атмосферата, напр. бобовите растения и др. Огромно значение за снабдяване с азот на всички растения, което ще се равнява на революция в биологията, ако и останалите растения (небобови – пшеница, ръж, царевица и др.) придобият способност да фиксират молекуларен азот. По принцип възможността за пренасяне на свойства и признаци чрез пренасяне на генетична информация, т. е. чрез пренасяне на ДНК е вече доказана през 1944 г. Пренасянето на гени или съответни части на ДНК на живи същества от различни видове може да бъде успешно само в случаи, когато организмът, който приема гена, няма ензими за разрушаване или промяна на чуждата ДНК. Английските учени Диксън и Постген в 1972 г. първи са осъществили пренос на гени, отговорни за фиксацията на азот от бактерията *Klebsiella*, върху един щам *Escherichia coli*

. Гените, отговорни за фиксацията на азот, обозначени като nif (азотфиксация), са причината за синтеза на ензима нитрогеназа, което е било направено чрез редукция на ацетилен. Тези гени, които присъстват в *Escherichia coli*

, се предполага, че са във вид на пръстеновиден участък на ДНК, която не се среща в хромозомите на ядрото. Свойствата обаче на образуваната в *Escherichia coli*

нитрогеназа все още не са известни. Възможността да се пренесе nif -генът от бактерия на висши растения се увеличава и от това, че бактериалната ДНК има същата пръстенообразна форма, каквато е тази на хлоропластите. Хибридизацията на ДНК или на техните части ще бъде много по-успешна, отколкото е хибридизацията на бактериална ДНК (прокариоти) с тези на растителна клетка, която коренно се различава от ДНК на бактерията, т.е. от ДНК на еукариотите.

VII. Биохимизъм на азотфиксацията

В резултат на упорит и многогодишен труд учените са успели да отделят във високоочистен вид ензимна система нитрогеназа, осъществяваща свързването и редуцирането на молекулярния азот. Установено е също, че за редукция на азота се изразходва голямо количество енергия, за която цел се използва енергията на АТФ. Също така е открит и редукторът ферредуксин с редокс-потенциал 0,420 В. Ензимът нитрогеназа се състои от два белтъчни компонента, единият от които съдържа желязо, а другият – желязо и молибден. Желязото подобно на ферредуксина се намира в нехемна форма. Нитрогеназата е способна да редуцира не само азот, но и ацетилен, която реакция се използва за практическото определяне на активността ѝ. За редукцията на молекулярния азот е необходимо пренасяне на електрони от редуцирания ферредуксин на нитрогеназата с участие на АТФ. От една молекула азот се образуват две молекули амоняк, който веднага се включва в синтеза на аминокиселини. По мнение на Кретович (1972г.) има два пътя на фиксиране на азота – редукционен и окислителен. Промеждутъчен продукт и при двете реакции е хидроксиламинът (NH_2OH). Последният с органичните киселини образува съответни оксими, които са много по-малко токсични в сравнение с хидроксиламина. Като траен продукт на асимилацията на азота е амонякът, който взаимодейства с кетокиселини и дава аминокиселини. Това показва, че в клетките на грудките освен нитрогеназа трябва да има още дехидрогенази, които да катализират реакциите на редукционно аминирание. Според Бергерсен (1965г.) във фиксацията на азота участва и ензимът хидрогеназа, а също и легхемоглобин, като азотът се свързва само чрез редукционни реакции. Нитрогеназата се активира при добавяне на Мо и АТФ.

Бедни на грудкови бактерии почви се наторяват с бактериален тор, наречен нитрагин, за да могат семената да се инокулират с бактерии. Това мероприятие увеличава с 20% добива и обогатява почвата с азот.

Процесът на азотфиксация се инхибира от O_2 , който вероятно блокира желязото, намиращо се в нитрогеназата. Това се потвърждава и от факта, че азотфиксацията се подтиска от СО-инхибитор на действието.