

THE IMPORTANCE OF BIOLOGICAL FIXATION OF ATMOSPHERIC NITROGEN IN ECOLOGICAL AGRICULTURE

Summary

It has been estimated that annually over 100×10^6 tons of atmospheric nitrogen is introduced into the global nitrogen cycle as a result of biological nitrogen fixation (BNF). Until 90s BNF was the largest source of biologically available nitrogen in the biosphere. The assessments performed in the last decade of the XX century indicate that the amounts of anthropogenically fixed nitrogen exceed those of fixed by the biological process. Ability to fix atmospheric nitrogen is quite common in nature but it occurs only within prokaryotic microorganisms. Different physiological groups of bacteria are engaged in this process. From ecological point of view there are: free-living N_2 fixers (Azotobacter, Clostridium, Anabaena, Nostoc), bacteria (Azospirillum) that fix atmospheric N in close associations with roots of some plants and bacteria fixing N_2 in symbiotic systems with plants (Rhizobium - legumes or Frankia - alder symbioses). In this review different symbiotic systems have been characterised as well as their ecological and agronomic importance, particularly in organic (ecological) agriculture.

ZNACZENIE PROCESU BIOLOGICZNEGO WIĄZANIA AZOTU ATMOSFERYCZNEGO W ROLNICTWIE EKOLOGICZYM

Streszczenie

Zdolność do biologicznego wiązania azotu atmosferycznego (BWAA) jest dość szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, ale tylko wśród bakterii - mikroorganizmów prokariotycznych. Proces ten przeprowadzany jest przez różne grupy fizjologiczne bakterii. Pod względem ekologicznym wyróżniane są: wolno żyjące asymilatory N_2 występujące w glebie i zbiornikach wodnych (Azotobacter, Clostridium, Nostoc), bakterie wiążące azot w asocjacji z korzeniami roślin (Azospirillum) oraz bakterie wiążące N_2 w ścisłych układach symbiotycznych z roślinami (Rhizobium - rośliny motylkowate, Frankia - olsza). W referacie omówiono ww. systemy BWAA oraz ich przyrodnicze i gospodarcze znaczenie.

1. Wstęp

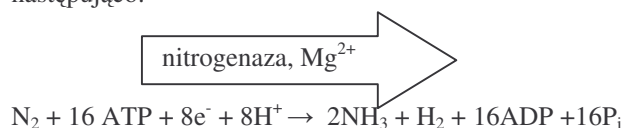
Ocenia się, że proces biologicznego wiązania azotu atmosferycznego dostarcza corocznie do globalnego cyklu obiegu N od około 100 do 172 milionów ton tego pierwiastka [6, 25]. Jeszcze do niedawna proces ten był największym źródłem biogenego N w biosferze, jednak począwszy od lat sześćdziesiątych nastąpił bardzo szybki wzrost produkcji antropogenicznego N i obecnie ta pula azotu jest najprawdopodobniej największym źródłem przyswajalnej formy azotu w biosferze. Pamiętając, że wzrostowi zużycia nawozów azotowych towarzyszył na ogół proporcjonalny wzrost plonów roślin uprawnych, a zwłaszcza zbóż, który przyczynił się do złagodzenia niedoborów żywności na świecie - trzeba też pamiętać o kosztach środowiskowych tego postępu. Koszty te to przede wszystkim zanieczyszczenia cieków i zbiorników wodnych rozpuszczalnymi formami nawozów azotowych i fosforowych (eutrofizacja) oraz emisja do atmosfery nadmiernych ilości tlenków azotu, zwłaszcza N_2O , oraz CO_2 i CH_4 , które są gazami w największym stopniu odpowiedzialnymi za efekt cieplarniany i globalne ocieplenie [27]. Zmniejszenie negatywnych skutków postępu jest jednym z najważniejszych celów w strategii zrównoważonego rozwoju gospodarczego na świecie, w tym także rozwoju zrównoważonej produkcji rolniczej. Cel ten w odniesieniu do środowiska w największym stopniu realizowany jest w systemie rolnictwa ekologicznego (organicznego), m.in. dlatego, że produkcja w tym systemie opiera się głównie na wykorzystywaniu procesów i nawozów pochodzenia biologicznego. Przykładem takiego

procesu jest biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego (BWAA), które w omawianym systemie dostarcza do środowiska glebowego najważniejszego pierwiastka plonotwórczego, jakim jest azot.

2. Proces biologicznego wiązania N_2

BWAA zachodzi w przyrodzie wyłącznie przy udziale drobnoustrojów (bakterii), czyli organizmów prokariotycznych. Grupa mikroorganizmów zdolnych do wiązania azotu atmosferycznego jest liczna i zróżnicowana, zarówno pod względem morfologicznym, fizjologicznym jak i złożoności systemu, w którym proces asymilacji N_2 jest przeprowadzany [1, 4, 15, 18].

Z chemicznego punktu widzenia proces ten jest konwersją bardzo mało reaktywnego i w związku z tym nieprzyswajalnego dla roślin i zwierząt azotu cząsteczkowego N_2 , do zredukowanej formy tego pierwiastka, czyli amoniaku, który może być dalej metabolizowany w komórkach żywych organizmów. Wszystkie mikroorganizmy zdolne redukować azot atmosferyczny przeprowadzają ten proces przy udziale złożonego układu enzymatycznego, w którym najważniejsza jest nitrogenaza – enzym katalizujący bezpośrednio redukcję cząsteczki azotu. Sumaryczne równanie biologicznego wiązania N_2 można przedstawić następująco:



Z równania tego wynika m.in., że biologiczna redukcja N₂ wymaga, oprócz nitrogenazy, także znacznych ilości energii w postaci ATP oraz siły redukcyjnej, czyli elektronów i protonów (H⁺).

Nitrogenaza jest kompleksem dwóch komponentów białkowych zawierających metale w swoich aktywnych centrach; białko-Fe (komponent II) oraz białko-MoFe (komponent I). Białko-Fe jest homodimerem (2 podobne podjednostki o całkowitej masie cząsteczkowej, Mc ≈ 64 kDa) zawierającym dwa miejsca przyłączające MgATP oraz jedno centrum [4Fe-4S] łączące podjednostki dimeru. Komponent I, czyli białko-MoFe jest heterotetramerem (Mc ≈ 240 kDa) zawierającym po dwie kopie dwóch centrów aktywnych zwanych: kofaktorem-FeMo oraz centrum-P. Kofaktor-FeMo składa się z 1Mo:7Fe:9S:1 homocytrynianu, natomiast centrum-P zawiera 8Fe:7S [22, 28]. Redukcja N₂ i innych substratów (acetylen, cyjanek) wymaga przejściowego połączenia białka-Fe z białkiem-MoFe. Elektrony z ferredoksyny lub flawodoksyny (silnie redukujące białka) przenoszone są do 4Fe-4S białka-Fe, które po skompleksowaniu z Mg-ATP redukują białko-FeMo. W tym białku elektrony poprzez centrum-P przechodzą do kofaktora-FeMo, w którym następuje wiązanie i redukcja cząsteczki azotu i H⁺. Warto dodać, że u wszystkich mikroorganizmów przeprowadzających proces BWAA nitrogenaza jest bardzo podobna, a nawet identyczna, zarówno pod względem strukturalnym jak i funkcjonalnym. Różnice mogą dotyczyć jedynie występowania u niektórych bakterii nitrogenazy zawierającej w kofektorze wanad (Va) zamiast molibdenu (Mo) lub nawet nitrogenazy zawierającej tylko Fe [21, 22, 26]. Inną ważną właściwością nitrogenazy jest to, że może być ona aktywna tylko w warunkach beztlenowych, lub w środowisku zawierającym bardzo niewielkie koncentracje O₂. Tlen w ilościach występujących np. w powietrzu trwale ją unieczynia. Z drugiej jednak strony asymilatory N₂, będące w znacznej większości drobnoustrojami tlenowymi, wymagają obecności tlenu cząsteczkowego, który jest im niezbędny w wielu procesach metabolicznych, m.in. jako akceptor elektronów i do wytwarzania ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Ten swoisty „paradoks tlenowy” u mikroorganizmów uzdolnionych do syntezy tego enzymu rozwiązywany jest w ciekawy i dość zróżnicowany sposób [5]. Omówione poniżej systemy BWAA różnią się m. in. właśnie pod względem mechanizmów ochrony nitrogenazy przed toksycznymi koncentracjami tlenu, ale przede wszystkim od względem efektywności w wiązaniu N₂ i wzbogacania środowiska w azot przyswajalny.

3. Wolno żyjące asymilatory N₂

Jest to liczna grupa drobnoustrojów zróżnicowana zarówno pod względem fizjologicznym jak i siedliskowym. Główne grupy tych mikroorganizmów to: heterotroficzne bakterie tlenowe z rodzajów *Azotobacter*, *Azotococcus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* i *Derxia*, obligatoryjnie beztlenowe *Clostridium*, fotosyntetyzujące bakterie purpurowe (*Rhodobacter*) i cyanobakterie (*Anabaena*, *Nostoc*). Bakterie te zasiedlają powszechnie gleby i zbiorniki wodne w różnych strefach klimatycznych, ale ich wymagania środowiskowe są bardzo zróżnicowane. Na przykład, *Azotobacter* jest wrażliwy na kwaśny odczyn gleby i rzadko występuje w glebach o pH poniżej 6 [16, 30]. Niedawne badania nad występowaniem bakterii z

rodzaju *Azotobacter* w 31 próbkach gleb pobranych z różnych rejonów Polski, wykazały obecność tych bakterii w 16 glebach, czyli tylko nieco więcej niż 50% naszych gleb zasiedlonych jest przez omawiane bakterie [16]. Bakterii tych nie stwierdzano na ogół w glebach kwaśnych, które dominują w naszym kraju, natomiast najliczniejszą populację tych bakterii zasiedlały gleby żyzne o dużej zawartości części spławialnych i odczynie zbliżonym do obojętnego.

Wolno żyjące asymilatory N₂, a zwłaszcza bakterie z rodzajów *Azotobacter* i *Klebsiella*, są przedmiotem licznych badań od dziesięcioleci. Można je uznać za modelowe mikroorganizmy w badaniach nad biochemizmem i regulacją genetyczną procesu wiązania N₂ [13, 21, 22]. Efektywność wiązania azotu atmosferycznego przez bakterie z rodzaju *Azotobacter* i inne niesymbiotyczne diazotrofy nie jest duża, m.in. dlatego, że omawiane bakterie przeprowadzają ten proces tylko w czasie wzrostu. Energia wydatkowana jest więc także na inne procesy metaboliczne związane z aktywnością życiową komórek. Inną, ważną dla środowiska konsekwencją tego faktu jest to, że *Azotobacter* asymiluje N₂ tylko na potrzeby metabolizmu komórki, a więc nie wydziela związanego N do środowiska. Azot ten wzbogaca środowisko glebowe dopiero po obumarciu komórek azotobaktera i prawdopodobnie także innych wolno żyjących asymilatorów N₂ [8, 9]. Tak więc wydaje się, że wolno żyjące bakterie wiążące azot cząsteczkowy wzbogacają gleby tylko w niewielkie ilości N przyswajalnego; najczęściej ilości te ocenia się na kilkanaście kg N/ha w ciągu roku [9, 15]. W systemie rolnictwa ekologicznego nawet tak stosunkowo niewielkie ilości zasymilowanego azotu są niewątpliwie cenne, zarówno z punktu widzenia metabolizmu glebowego jak i żyzności gleby. Dlatego też szczególnie w tym systemie wapnowanie gleb kwaśnych powinno być podstawowym i nieodzownym zabiegiem zapewniającym prawidłowe funkcjonowanie gleby i podnoszącym jej żyzność, m.in. poprzez stymulowanie aktywności mikrobiologicznej, w tym także rozwoju bakterii z rodzaju *Azotobacter* [18]. Wybrane wyniki badań, przedstawione w tabeli 1, nad populacjami mikroorganizmów glebowych w zależności od systemu wskazują wyraźnie, że w glebie pod roślinami uprawianymi w doświadczalnym systemie ekologicznym populacje bakterii *Azotobacter* oraz rizobiów są znacznie większe, m.in. właśnie z powodu korzystniejszego odczynu gleby, niż w systemie konwencjonalnym.

Tab. 1. Liczebności (w 1 g s.m. gleby) asymilatorów N₂ z rodzaju *Azotobacter*, oraz bakterii symbiotycznych roślin motylkowatych w glebie pod pszenicą ozimą uprawianą w różnych systemach gospodarowania [18]

Table 1. Numbers (in 1g soil d.m.) of N₂ fixing *Azotobacter* and symbiotic bacteria of leguminous plants in soil under winter wheat grown in various management systems [18]

System / termin	pH	<i>Azotobacter</i>	Bakterie symbiotyczne:		
			koniczynny	lucerny	grochu
Ekologiczny	6,6	120	1,7x10 ⁴	1,1x10 ²	1,7x10 ³
Konwencjonalny	5,6	0	5,8x10 ²	0	1,7x10 ²

Mała efektywność asymilacji N₂ przez omawianą grupę drobnoustrojów wynika głównie z niewielkiej dostępności, a często nawet z braku w glebie dostatecznych ilości

składników pokarmowych, zwłaszcza łatwo przyswajalnych źródeł węgla. Miejscem, gdzie ilość i dostępność składników pokarmowych dla drobnoustrojów może być znacznie większa jest ryzosfera roślin. Substancje zawarte w wydzielinach korzeniowych, jak również w obumierających komórkach tkanek korzeniowych stanowią bogate źródło składników pokarmowych i energetycznych dla różnych grup mikroorganizmów, w tym także dla asymilatorów N₂. Liczne badania wykazały, że ryzosfera traw i roślin zbożowych zasiedlana jest przez różne rodzaje drobnoustrojów uzdolnionych do asymilacji azotu cząsteczkowego. Niektóre z tych bakterii kolonizują nie tylko powierzchniowe warstwy korzeni, ale zasiedlają również wnętrza korzeni, tworząc specyficzne układy (asocjacje) symbiotyczne [6, 9].

4. Asocjacyjne wiązanie N₂

Bakterie z rodzaju *Azospirillum*, z najważniejszymi gatunkami *A. lipoferum* i *A. brasilense*, są najlepiej poznane z tej grupy asymilatorów N₂. Wymienione gatunki charakteryzują się m.in. dużą specyficznością w kolonizacji korzeni, mianowicie *A. lipoferum* tworzy asocjacje głównie z roślinami C₄ (kukurydza), natomiast *A. brasilense* z roślinami trawiastymi C₃ [1, 11]. Liczne doświadczenia vegetacyjne przeprowadzone w różnych strefach klimatycznych nad oddziaływaniem tych bakterii na wzrost i plonowanie traw i zbóż nie dały jednoznacznie pozytywnych rezultatów. Największe przyrosty plonów szczyptonych roślin, w tym także pszenicy, uzyskiwano w krajach o ciepłym lub gorącym klimacie (Brazylia, Izrael), czyli w regionach, w których naturalne asocjacje pomiędzy *Azospirillum* i korzeniami takich roślin jak trzcina cukrowa, sorgo czy kukurydza są dość powszechne [1, 9, 19]. W tych regionach populacje drobnoustrojów asocjacyjnych w glebach są również znacznie większe niż w glebach naszej strefy klimatycznej; także w glebach Polski [11]. Ponadto, nawet w doświadczeniach z wynikami pozytywnymi nie wykazano jednoznacznie, że przyrosty plonów roślin doświadczalnych były efektem lepszego ich zaopatrzenia w N związany przez drobnoustroje asocjacyjne [7], m.in. dlatego, że bakterie *Azospirillum*, podobnie jak inne wolno żyjące asymilatory azotu cząsteczkowego, nie wydzielają na zewnątrz zasymilowanego azotu amonowego, a więc nie przekazują go roślinom. Pozytywne efekty szczepienia roślin omawianymi bakteriami wynikają prawdopodobnie głównie ze zdolności tych bakterii do syntezy hormonów roślinnych stymulujących rozwój i funkcjonowanie systemu korzeniowego [6, 7, 19]. Przypuszcza się ponadto, że wzrost zawartości N w roślinach, stwierdzany w niektórych doświadczeniach, mógł być następstwem rozkładu komórek bakterii tworzących asocjacje z tymi roślinami [7]. Tak więc, ilości N związanego w systemach asocjacyjnych ocenia się tylko na 3 - 20 kg · ha⁻¹ · rok⁻¹ [3, 4, 6]. W naszych warunkach klimatycznych ilości te są prawdopodobnie jeszcze mniejsze, natomiast kukurydza w warunkach tropikalnych może wiązać do 90 kg azotu w ciągu sezonu vegetacyjnego [1].

5. Systemy symbiotyczne

Najważniejsze układy symbiotyczne, w których następuje przekazywanie zredukowanego N do partnera roślinnego to:

- bakterie brodawkowe (rizobia) - rośliny motylkowate,
- promieniowce z rodzaju *Frankia* - rośliny drzewiaste (olsza - *Alnus*) oraz
- symbiozy z cyjanobakteriami (*Anabaena* - *Azolla*, porosty).

Z szacunkowej ilości 139 do 170x10⁶ ton azotu dostającego się corocznie do globalnego cyklu N w wyniku procesu BWAA, N związany w systemach symbiotycznych stanowi około 70% do 80% [20]. Spośród wymienionych powyżej systemów symbiotycznych największe znaczenie, zwłaszcza w agroekosystemach, ma symbioza roślin motylkowatych z bakteriami brodawkowymi (rizobia). Werner [29] podaje, że światowy areal uprawy roślin strączkowych wynosił w latach 90. około 1,5 milionów km². Blisko połowa tego arealu przeznaczona była pod uprawę soi, a na 20% tej powierzchni uprawiano inne strączkowe subtropikalne, np. *Cicer*, *Cajanus*. Orzeszki ziemne uprawiane były na ~10% ogólnego arealu, czyli na pozostałe rośliny strączkowe takie jak fasola, groch czy bobik przypadało około 20% ogólnej powierzchni. Uprawy roślin motylkowatych przeznaczanych na paszę, łącznie z mieszkankami z trawami, zajmują na 5 kontynentach znacznie większą powierzchnię; około 30 milionów km² [29]. Jako ciekawostkę warto dodać, że rośliny motylkowate wiążą łącznie w przybliżeniu 90 milionów ton N₂ rocznie tylko dzięki kilku kilogramom nitrogenazy produkowanej przez ich symbiotycznych partnerów - rizobia [28]. Omawiając tę grupę bakterii warto dodać, że ich popularna nazwa "rizobia" wywodzi się od nazwy rodzajowej *Rhizobium*, która jeszcze do początku lat osiemdziesiątych obejmowała wszystkie bakterie brodawkowe (podzielone na 6 gatunków) wiążące N₂ w symbiozie z roślinami motylkowatymi. Nowy, filogenetyczny podział tej grupy bakterii, oparty m.in. na analizie sekwencyjnej genów 16S rRNA, jest bardziej zróżnicowany, a najważniejsze rodzaje i gatunki wraz z nazwami rodzajowymi roślin motylkowatych, z którymi tworzą one układy symbiotyczne podano w tabeli 2.

Tab. 2. Rodzaje oraz najważniejsze gatunki bakterii brodawkowych i rośliny, z którymi tworzą symbiozę
Table 2. Genera and main species of root-nodule bacteria and their hosts

Rodzaj/gatunek	Roślina-gospodarz
<i>Rhizobium</i>	
<i>R. leguminosarum</i>	<i>Pisum, Viciae, Lathyrus, Lens</i>
" <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
" <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i>
<i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Azorhizobium</i>	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lupinus</i>
<i>Allorhizobium</i>	
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia</i>

Rizobia wiążą N_2 w brodawkach, które są wytworem komórek wewnętrznych warstw kory pierwotnej korzeni roślin motylkowatych. Wyróżnia się na ogół dwie grupy brodawek różniących się kształtem, obecnością lub brakiem stożka merystematycznego oraz formą N transportowanego do rośliny. Pierwsza grupa to brodawki posiadające aktywność merystematyczną, czyli brodawki o wzroście ciągłym. Brodawki te mają zwykle kształt wydłużony, zbliżony do cylindrycznego i transportują związany N_2 w postaci związków amidowych, jak np. u lucerny, koniczyny czy grochu. Druga grupa to brodawki zwykle okrągłe, posiadające ograniczoną (czasową) aktywność merystematyczną i transportujące związany N_2 w formie ureidów, np. u soi czy fasoli [28]. W centralnej części brodawek znajdują się komórki roślinne upakowane licznymi symbiosomami, które powstają po otoczeniu komórek rizobów przez tzw. membranę peribakteroidalną pochodzenia roślinnego. W symbiosomach komórki rizobów przekształcają się w bakteroidy, czyli formę endosymbiotyczną wiążącą azot cząsteczkowy [4]. Transformacja normalnych komórek rizobów do bakteroidów przebiega w kilku etapach, w czasie których zachodzi wiele zmian zarówno w morfologii jak i fizjologii bakterii. W rezultacie tych przemian bakteroidy tracą m.in. zdolność do podziałów, zyskują natomiast najważniejszą cechę, czyli zdolność do wiązania N_2 , której nie mają na ogół rizobia żyjące w glebie.

Aby proces ten mógł przebiegać w sposób efektywny partner roślinny musi zapewnić bakteroidom odpowiednie warunki, tj. niskie stężenie tlenu (5-30 nM) optymalne dla aktywności nitrogenazy oraz stały dopływ asymilatów, czyli źródeł energii dla bakteroidów. Wykazano, że aktywność nitrogenazy w brodawkach ujawnia się dopiero po rozpoczęciu syntezy w komórkach roślinnych leghemoglobiny, białka o czerwonym zabarwieniu, którego zawartość w aktywnych brodawkach może stanowić do 30% wszystkich białek rozpuszczalnych. Rola leghemoglobiny jest dwójaka; wykazując silne powinowactwo do O_2 chroni nitrogenazę przed nadmiarem tlenu z zewnątrz, ale jednocześnie ułatwia ona stałą i efektywną dyfuzję tlenu do bakteroidów, który jest im niezbędny do produkcji energii w procesach oddechowych [5, 8]. W peryferyjnych częściach brodawek znajdują się wiązki przewodzące łączące się z centralnym systemem przewodzącym korzenia rośliny-gospodarza. Tą drogą roślina dostarcza do brodawek węglowodany, które są nie tylko źródłem energii dla bakteroidów, ale także podjednostkami węglowymi niezbędnymi w procesach asymilacji związanego amoniaku w komórkach roślinnych. Warto dodać, że w odróżnieniu od wolno żyjących asymilatorów N_2 , które wiążą ten pierwiastek tylko dla potrzeb ich metabolizmu w warunkach jego niedoboru, bakteroidy wiążą azot głównie dla rośliny rosnącej na glebie ubogiej w azot. Tak więc u rizobów musiał wykształcić się mechanizm uniezależnienia syntezy nitrogenazy od stanu zaopatrzenia komórek w N. Ponadto, bakteroidy wiążące N_2 praktycznie nie pobierają związanego azotu, stając się w praktyce „małymi fabryczkami” amoniaku permanentnie wypompowującymi ten związek do cytoplazmy komórek rośliny-gospodarza. W komórce roślinnej jon amonowy jest szybko wbudowywany do aminokwasów glutaminy lub glutaminianu i w wyniku dalszych przemian transportowany jest poza brodawki w postaci związków amidowych (np. asparagina, glutanina u

grochu, lucerny, koniczyny) lub związków ureidowych (np. alantoina u soi) [10].

Dane przedstawione w tab. 3 pochodzą głównie z prac przeglądowych [26, 28], a wartości podane w tej tabeli mają jedynie na celu pokazanie jak znaczne ilości azotu rośliny motylkowane mogą czerpać z symbiozy z bakteriami brodawkowymi. Zarówno ilości związanej symbiotycznie N_2 , jak i % N pochodzącego z symbiozy uzależniony jest od właściwości genetycznych rośliny motylkowej i jej symbionta oraz od wielu czynników środowiska i zabiegów agrotechnicznych.

Tab. 3. Zakresy oraz średnie ilości N_2 wiązanych przez wybrane rośliny motylkowane

Table 3. Ranges and average amounts of N_2 fixed by selected legumes

Roślina	%Ndfa*	N wiązany w cz. nadziemnych (kg/ha)	
Crop		Zakres	Średnia
Soja (<i>Glycine max</i>)	53	0 - 450	175
Groch (<i>Pisum sativum</i>)	68	4 - 244	150
Bobik (<i>Vicia faba</i>)	80	12 - 330	151
Fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	40	0 - 165	65
Łubin (<i>Lupinus angustifol.</i>)	65	19 - 327	165
Lucerna (<i>Medicago sativa</i>)	70	50 - 460	180

*% N pochodzącego z powietrza

Związany symbiotycznie N_2 ma nie tylko znaczenie plonotwórcze dla roślin motylkowatych, ale także dla roślin następczych, uprawianych po motylkowatych. Pomimo, że korzyści te, jak również pozytywny wpływ uprawy roślin motylkowatych na strukturę gleby i jej żyzność są dość dobrze i powszechnie znane, warto przytoczyć niektóre wyniki badań z naszej literatury naukowej. W tab. 4 przedstawiono wybrane wyniki badań nad produktywnymi i środowiskowymi skutkami uprawy roślin w różnych zmianowaniach, w zależności od zróżnicowanych dawek N i nawożenia obornikiem w wieloletnim doświadczeniu poletkowym, prowadzonym w Stacji Doświadczalnej Grabów, IUNG-PIB w Puławach [14, 17]. Dane przedstawione w tej tabeli dotyczą plonów roślin i niektórych właściwości gleby w obiektach bez nawożenia N, po 20 latach trwania doświadczenia (5 rotacji w latach 1980-2000). Sumaryczne plony roślin (wyrażone w jednostkach zbożowych) uzyskane w ostatnim 4-leciu wyniosły 132 jednostki w zmianowaniu A i aż 261 jednostek, czyli prawie dwa razy więcej, w zmianowaniu B (tab. 4). Znacznie lepsze plonowanie roślin w zmianowaniu B można przypisać głównie lepszemu zaopatrzeniu roślin w azot dzięki procesowi wiązania N przez rizobia w symbiozie z koniczyną. Oczywiście inne czynniki, takie jak większa aktywność mikrobiologiczna, czy większa zawartość próchnicy w glebie zmianowania B, również mogły w pewnym stopniu korzystnie wpływać na plonowanie roślin w tym obiekcie (tab. 4). Maćkowiak [14], główny autor ww. badań, dokonując bilansu azotu za 4 pierwsze rotacje (16 lat) wyliczył, że w tym okresie rośliny pobrały z gleby w obiekcie bez nawożenia azotowego łącznie 1317 kg N w zmianowaniu A i 2047 kg w zmianowaniu B. Różnica, czyli 730 kg N na korzyść zmianowania B, to głównie efekt symbiotycznego związanego azotu atmosferycznego w tym zmianowaniu.

Tab. 4. Porównanie plonowania roślin i niektórych właściwości gleby od wielu lat nienawożonej azotem, w zależności od udziału koniczyny w zmianowaniu

Table 4. Comparison of crop yields and selected properties of soil for many years not fertilized with nitrogen, as influenced by crop rotation with or without clover

Zmianowanie	Plon roślin (jednostki zbożowe)	C org. (%)	N całkowity (%)	Liczebność rizobiów koniczyny w 1 g gleby	Liczebność grzybów w 1g gleby ($\times 10^3$)
A*	132	0,62	0,046	639	30
B**	261	0,67	0,053	3330	69

* Ziemniak-pszenica ozima-jęczmień jary-kukurydza

** Ziemniak- pszenica ozima(gorczyca na przyoranie)-jęczmień z wsiewką-mieszanka koniczyny z trawami

Pomimo wielorakich korzyści wynikających z uprawy roślin motylkowatych, udział tych roślin w strukturze zasiewów w Polsce jest od wielu lat niewielki. Na przykład, w 2000 roku rolnicy uprawiali w naszym kraju około 122 tys. ha roślin strączkowych i 299 tys. ha motylkowatych wieloletnich, czyli odpowiednio 1,1% i 2,7% powierzchni zasiewów ogółem. Ograniczanie uprawy roślin motylkowatych, a tym samym roli BWAA w bilansie azotu glebowego, należy niestety uznać za jeden z symboli nowoczesnego, intensywnego rolnictwa bazującego m.in. na wysokim wykorzystywaniu mineralnych nawozów azotowych.

Niestety, także w gospodarstwach ekologicznych udział roślin motylkowatych w strukturze zasiewów nie jest korzystny. Jak wynika z najnowszych danych przedstawionych przez Kusia i Jonczyka [12], rośliny strączkowe uprawiane są w Polsce na około 1,1% gruntów ornych, a w przypadku gospodarstw ekologicznych udział ten jest niewiele wyższy i wynosi tylko 3,7% gruntów ornych. W niektórych rejonach rolnicy prowadzący gospodarstwa ekologiczne uprawiają jednak znacznie więcej omawianych roślin. Na przykład, Golimowska [2] podaje, że na Dolnym Śląsku udział roślin motylkowatych, głównie koniczyny, w strukturze zasiewów tych gospodarstw wynosi aż 33%.

Zagadnienia związane z prawidłowym, czyli efektywnym i bezpiecznym dla środowiska zarządzaniem pulą N w glebie, są jednym z ważniejszych aspektów tzw. rolnictwa zrównoważonego i ekologicznego. W tym kontekście należałoby dążyć do zwiększenia roli symbiotycznego wiązania N_2 , zwłaszcza jako bezpieczniejszego źródła N, a także jako czynnika sprzyjającego zachowaniu żyzności i zdrowotności gleb. Idea ta jest realizowana w warunkach rolnictwa ekologicznego (organicznego), oraz relatywnie w dużym stopniu także w rolnictwie konwencjonalnym w krajach strefy subtropikalnej i tropikalnej [3]. Nie tylko ze względu na charakter rolnictwa w tych strefach klimatycznych, często ekstensywnego, ale także dlatego, że oprócz liczniejszych systemów rizobia-rośliny motylkowate występują tam również inne, efektywne układy symbiotyczne, np. *Azolla-Anabena* (w uprawie ryżu) czy asocjacje, a nawet endosymbiozy bakterii diazotroficznych z trzciną cukrową, kukurydzą i trawami [6, 8]. Czy wzrastające zainteresowanie rolnictwem organicznym (ekologicznym) w Europie spowoduje istotną zmianę w wykorzystaniu BWAA, głównie poprzez wzrost uprawy roślin motylkowatych, okaże się w najbliższej przyszłości.

6. Podsumowanie

Szacuje się, że corocznie do globalnego cyklu biogenego N wprowadzane jest z atmosfery ponad 100×10^6 ton tego pierwiastka w wyniku jego biologicznej redukcji. Do początku lat 90. biologiczne wiązanie azotu atmosferycznego (BWAA) było największym źródłem związanego N w biosferze. Szacunki przeprowadzone w ostatnim dziesięcioleciu wskazują, że ilości N pochodzenia antropogenicznego przewyższają obecnie ilości N związanego naturalnie w procesie biologicznym.

Zdolność do biologicznego wiązania azotu jest dość szeroko rozpowszechniona w przyrodzie, ale tylko wśród różnych grup fizjologicznych bakterii. Pod względem ekologicznym wyróżniane są np. wolno żyjące asymilatory N_2 występujące w glebie i zbiornikach wodnych (*Azotobacter*, *Nostoc*), bakterie wiążące azot w asocjacjach z korzeniami roślin (*Azospirillum*) lub rozwijające się w wiązkach przewodzących niektórych roślin (*Azoarcus*) oraz bakterie wiążące N_2 w ścisłych układach symbiotycznych z roślinami (*Rhizobium* - rośliny motylkowate, *Frankia* - olsza). W rolnictwie ekologicznym największe znaczenie ma symbioza roślin motylkowatych z bakteriami brodawkowymi.

7. Literatura

- [1] Döbereiner J. 1983: Dinitrogen fixation in rhizosphere and phyllosphere association. In: Encyclop. Plant Physiol., New Series, Vol. 15A, Eds. A. Lauchli and R.L. Bielski. pp.332-350, Springer-Verlag, Berlin.
- [2] Golinowska M. 2007: Efektywność ekonomiczna gospodarstw ekologicznych na Dolnym Śląsku. W: Wybrane zagadnienia ekologiczne we współczesnym rolnictwie. Monografia pod red. Z. Zbytka, PIMR Poznań, s.79-89.
- [3] Graham P.H., Vance C.P. 2000: Nitrogen fixation in perspective: an overview of research an extension needs. Field Crop Res., 65:93-106.
- [4] Hadri A-E., Spaink H.P., Bisseling T., Brewin N.J. 1998: Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. W: The *Rhizobiaceae*, Eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., s. 347-360.
- [5] Hennecke H. 1997: Rhizobial respiration to support symbiotic nitrogen fixation. W: Biological nitrogen fixation for the 21st century, Eds: C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton., Kluwer Acad. Pub., s.429-434.
- [6] Ishizuka J. 1992: Trends in biological nitrogen fixation research and application. Plant and Soil, 141(1-2):197-209.
- [7] James E.K. 2000: Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. Field Crop Res., 65:197-209.
- [8] Kaminski P.A., Batut J., Boistard P. 1998: A survey of symbiotic nitrogen fixation by rhizobia. W: The *Rhizobiaceae*, Eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., s. 431-460.

- [9] Kennedy I.R., Tchan Y-T. 1992: Biological nitrogen fixation in ono-leguminous field crops: recent advances. *Plant and Soil*, 141(1-2):93-118.
- [10] Khan M.L., McDermott T.R., Udvardi M.K. 1998: Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. W: *The Rhizobiaceae*, Eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., s. 461-485.
- [11] Król M. 1999: *Azospirillum* - bakterie asocjacyjne w zrównoważonym rolnictwie. *Fol. Univ. Agric. Stetin.*, 201 *Agricultura* (78):93-102.
- [12] Kus J., Jonczyk K. 2007: Ocena organizacyjna gospodarstw ekologicznych w Polsce. *Journal of Research and Application in Agricultural Engineering*, 52(3): 95-100.
- [13] Lorkiewicz Z. 1981: Genetyczna kontrola biologicznego wiązania azotu. W: „Mikrobiologiczne przemiany związków azotowych w glebie w różnych warunkach ekologicznych”, IUNG, Puławy, s. 13-37.
- [14] Maćkowiak Cz. 2000: Wpływ doboru roślin w zmianowaniu, obornika i nawozów mineralnych na zawartość węgla organicznego w glebie i produktywność zmianowań. *Nawozy i Nawożenie*, 4(5): 102-108.
- [15] Martyniuk, S. 2002: Systemy biologicznego wiązania azotu. *Nawozy i Nawożenie* 1: 264-277.
- [16] Martyniuk, S., Martyniuk, M. 2002: Occurrence of *Azotobacter* spp. in some Polish soils. *Pol. J. Environ. Stud.* 12(3): 371-374.
- [17] Martyniuk, S., Oroń, J., Martyniuk, M. 2005: Diversity and numbers of root-nodule bacteria (rhizobia) in Polish soils. *Acta Soc. Bot. Pol.* 74(1): 83-86.
- [18] Martyniuk S., Księżniak A., Jończyk K., Kuś J. 2007: Charakterystyka mikrobiologiczna gleby pod pszenicą ozimą uprawianą w systemie ekologicznym i konwencjonalnym. *Journal of Research and Application in Agricultural Engineering*, 52(3): 113-116.
- [19] Okon Y., Itzigsohn R., Burdman R., Hampel M. 1995: Advances in agronomy and ecology of the *Azospirillum* - plant associations. W: *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*, Kluwer Acad. Pub., Eds: I.A. Tikhonovich i in., s. 635-639.
- [20] Peoples M.B., Craswell E.T. 1992: Biological nitrogen fixation: investments, expectations, and actual contributions to agriculture. *Plant and Soil*, 141(1-2):13-40.
- [21] Phillips D.A. 1980: Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 31:29-49.
- [22] Rees D.C. i in. 1997: Complex structures of nitrogenase. W: *Biological nitrogen fixation for the 21st century*, Eds: C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton., Kluwer Acad. Pub., s.11-16.
- [23] Richards R.L. 1997: Chemical models for the function of nitrogenase. W: *Biological nitrogen fixation for the 21st century*, Eds: C. Elmerich, A. Kondorosi, W.E. Newton., Kluwer Acad. Pub., s.12-22.
- [24] Sawicka A. 1981: Ekologiczne problemy wiązania azotu atmosferycznego. W: „Mikrobiologiczne przemiany związków azotowych w glebie w różnych warunkach ekologicznych”, IUNG, Puławy, s. 25-44.
- [25] Sawicka A. 1997: Czynniki ograniczające wiązanie azotu atmosferycznego u roślin motylkowatych i traw. *Biul. Oceny Odmian*, 29:53-58.
- [26] Unkovich M.J., Pate J.S. 2000: An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crop Res.*, 65:211-228.
- [27] Van Veen J.A. 2000: Nitrogen:recent developments in related microbial processes. W: *Biological resource management*, Eds: E. Balazs i in., INRA Editions, s.71-80.
- [28] Vance C.P. 1998: Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. W: *The Rhizobiaceae*, Eds: H.P. Spaink, A. Kondorosi, P.J.J. Hooykaas, Kluwer Acad. Pub., s. 509-530.
- [29] Werner D. 1995: Ecology and agricultural applications of nitrogen-fixing systems: crops and sciences involved. W: *Nitrogen fixation: fundamentals and applications*, Eds: I.A. Tikhonovich i in., Kluwer Acad. Pub., s. 621-622.
- [30] Ziemięcka J. 1923: Występowanie azotobaktera w glebach polskich. *Rocz. Nauk Rol.*, 10:1-78.