



## تثبیت بیولوژیکی نیتروژن

- تیمور رضوی پور کومله، عضو هیات علمی موسسه تحقیقات برنج و دانشجوی دکتری دانشگاه مشه
- علیرضا فرخ، دانشجوی دکتری آکادمی ملی علوم جمهوری آذربایجان
- آتوسا فرخ، دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

### چکیده

نیتروژن مولکولی (N<sub>2</sub>) از عناصر عمده تشکیل دهنده اتمسفر (تقریباً ۸۰٪) زمین است. عنصر نیتروژن از عناصر ضروری در بسیاری از ترکیبات شیمیایی، مثل پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک بوده که پایه حیات تمام موجودات زنده می‌باشد. اگر چه نیتروژن مولکولی مستقیماً برای ساخت مواد شیمیایی که مورد نیاز برای رشد و تولید است، وارد سیستم بیولوژیکی شود. قبل از ورود به سیستم موجودات زنده، نیتروژن مولکولی باید با عنصر هیدروژن مخلوط شود. این پروسه احیای ازت مولکولی بر می‌گردد به همان عمل تثبیت نیتروژن (N-fixation) که ممکن است بصورت شیمیایی یا بیولوژیکی انجام گیرد.

نیتروژن از جمله عناصری است که محدود کردن رشد گیاهان سبز را موجب می‌شود. این نتایج حاصل از کاهش دائمی نیتروژن از ترکیبات ذخیره‌ای و نیتروژن تثبیت شده که در خاک موجود است و قابل استفاده برای گیاه می‌باشد. در نتیجه پروسه دی‌نیتریفیکاسیون بیولوژیکی، فرسایش خاک، آبشویی، تصعید شیمیایی، و شاید از طریق خیلی مهم بازگشت محصولات محتوی نیتروژن از مزرعه، این ازت بطور پیوسته و دائمی تخلیه می‌شود. این نیتروژن ذخیره شده در خاکهای کشاورزی باید دوباره بطور دوره‌ای ذخیره شده تا سطح مناسبی از آن برای گیاه موجود باشد (محدود کننده رشد نشود). این نیتروژن خاک از طریق افزایش کود شیمیایی و یا از طریق تثبیت بوسیله فعالیت باکتریها (Nitrogen Fixation Bacteria (BNF) به خاک اضافه شده و در خاک تأمین می‌گردد. البته نمی‌توان بر اهمیت تثبیت بوسیله فعالیت باکتریها در بازگشت نیتروژن غیرقابل استفاده موجود در اتمسفر به شکل قابل استفاده در بیوسفر تأکید زیادی داشته و بر آن تکیه کرد.

### مکانیسم تثبیت نیتروژن:

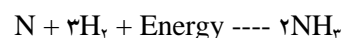
سوختهای فسیلی برای تأمین الکترون، اتم هیدروژن، و انرژی مورد نیاز در کاهش نیتروژن مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

#### انرژی استفاده شده در تثبیت نیتروژن:

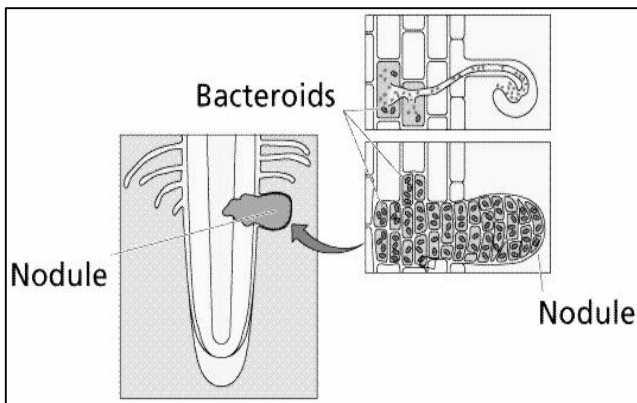
احیای نیتروژن یا از طریق شیمیایی و یا بیولوژیکی به انرژی بسیار زیادی نیاز دارد. در پروسه شیمیایی مقادیر متفاوتی از سوختهای فسیلی بعنوان منبع انرژی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

این مواد غیر قابل جایگزینی بوده و کامل کننده نهایی هستند. BNF انرژی مورد نیاز خود را در اثر سوختن کربوهیدارتها می‌گیرد که در اثر فعالیتهای فتوسنتزی در گیاهان ایجاد می‌شوند، بدست می‌آورند.

ازت اتمسفری (N) مولکولی است که از دو اتم نیتروژن بوسیله سه باند یا پیوند بسیار قوی وصل می‌شود. انرژی بسیار زیادی لازم است تا بتواند این پیوندها را شکسته و مولکول نیتروژن را بصورت غیرفعال در آورد. واکنش شیمیایی معمول برای تثبیت نیتروژن چه بصورت شیمیایی و چه بصورت بیولوژیکی بصورت زیر است:



پیوند سه باندهای نیتروژن باید شکسته شده و سه اتم هیدروژن باید با یک اتم نیتروژن ترکیب گردد. موجودات زنده از انرژی آزاد شده حاصل از اکسیداسیون یا سوختن کربوهیدارتها را برای تبدیل مولکول نیتروژن به آمونیاک مورد استفاده قرار می‌دهند. در پروسه تثبیت شیمیایی نیتروژن



نودلهای کوچک در ابتدا بر روی ریشه تشکیل شده و سپس با باکتریهای مناسب پر می شود (باکتریوئیدها) که مقادیر قابل توجهی نیتروژن را تثبیت می کنند.

تثبیت نیتروژن بوسیله باکتریهای همزیست به تنهایی حدود ۲۰ درصد نیتروژن تثبیت شده بیولوژیکی جهان را در سال می باشد. وجود گیاهان لگومینوز بعنوان یکی از منابع مهم تأمین کننده بشر بطور مستقیم و منبع ذخیره غذایی خوبی برای حیوانات بوده و بنابراین یکی از غذاهای مهم و بحرانی در بین گیاهان زراعی در جهان محسوب می شود.

خیلی مهم است که دانشمندان کشاورزی بخوبی دریابند که این رابطه همزیستی از لحاظ زراعی مورد بررسی قرار داده و از باکتریهای مخصوصی مناسب برای هر گیاه لگوم را انتخاب کنند تا بدینوسیله بتوانند از زمینهایی که حاصلخیزی مناسبی برای گیاهان خصوصا گیاهان غیرلگوم ندارند حداکثر استفاده را در تولید محصول بنمایند. مقادیر نیتروژن تثبیت شده از ۷۵ تا ۳۰۰ کیلوگرم N در هکتار در سال (۷۰ تا ۲۷۵ پوند N در ایکر در سال) بسته به ترکیبات مختلف متفاوت است.

در فلوریدا، رشد شیدر سفید همراه با گیاهان علوفه ای ممکن است تحت شرایط مناسب ۱۸۰ کیلوگرم N در هکتار در سال (۱۶۰ پوند بر ایکر در سال) نیتروژن را تثبیت نماید.

تعداد زیادی از آنژیوسپرمهای غیرلگومینوز مانند *Casuarina*, *Alnus*, *Myrica*, *Coriaria*، و غیره در برابر آلوده شدن به آکتینومیست *Frankia* تشکیل نودلهایی را بر روی ریشه خود می دهند.

چنین اجتماعی از اینگونه گیاهان با آکتینومیست *Frankia* ممکن است حتی بیش از ۱۰۰ کیلوگرم N در هکتار در سال نماید که می تواند بصورت افزایش سبزینه ای گیاه و یا افزایش گونه های پیشرو در محیطهای مختلف خاک ظاهر شود. بعضی از ژیموسپرمها مانند *Macrozamia*, *Cycas*، و *Podocarpus* نیز قادرند چنین اجتماعی از نودلهای تثبیت کننده نیتروژن را تشکیل دهند.

گزارش شده است که یک گیاه همزیست برای همکاری در تثبیت نیتروژن وجود دارد. مثلا باکتریوم *Kiebsiella* در نودلهای موجود در برگ *Psychotria*، و اجتماع سیانوباکتريا با قارچ (گلکسنگها)، گیاه *liverworts* (*Blasia*)، آنژیوسپرمها (*Gunnera*) و سرخس آبی آزولا.

افزایش معلومات در رابطه با خصوصیات ژنتیکی میکروارگانیسمهای مختلف که بتوانند قابلیت تثبیت نیتروژن بالایی را داشته باشند، در ایجاد موجودات زنده جدیدی که راندمان تثبیت نیتروژن را بالا ببرند کمک کرده و می تواند ارگانیسمهایی جدید با قابلیت بیشتر تثبیت نیتروژن را بوجود بیاورد.

انرژی برای فوتوسنتز از طریق نور خورشید بدست می آید. بنابراین انرژی برای BNF بطور غیرمستقیم از منابع تکمیلی قابل استفاده موجود بدست می آید. منبع مستقیم انرژی (کربوهیدرات) برای BNF در شرایطی که اجازه رشد به موجودات فوتوسنتز کننده داده می شود، بعنوان یک پتانسیل قابل دسترس می تواند باشد.

توانایی سیستم بیولوژیکی برای تثبیت نیتروژن بستگی به وجود آنزیمهای ویژه ای که نیتروژناز نامیده می شوند، دارد که نیتروژن مولکولی ( $N_2$ ) را به فرم احیاء شده آمونیاک ( $NH_3$ ) همراه با ترکیبات مواد آلی بخصوصی تبدیل می کند که می تواند برای رشد میکروارگانیسمها و موجودات بزرگتر استفاده شوند. سیستم نیتروژناز مرکب از دو مولکول مختلف پروتئین (آنزیمها) هست که باید در پروسه تثبیت نیتروژن با هم فعالیت نمایند.

یکی از این آنزیمها بنام آزوفردوکسین (*azoferredoxin*) آنزیمی است که دارای آهن می باشد. آنزیم دوم بنام مولیدوفردوکسین (*molybdoferredoxin*) دارای آهن و مولیدن می باشد. دو ترکیب با هم پیوسته و بعنوان یک سیستم واحد عمل می کنند.

ترکیبات سیستم نیتروژناز حاصل از موجودات مختلف با هم به شکل یک سیستم هیبرید فعال، همانند سیستم BNF از موجودات مختلف ناشی می شود. نیتروژناز به مقدار خیلی کم در میکروارگانیسمهای بخصوصی ظاهر می شود.

آمونیاک حاصل از تثبیت سریع با داخل بعضی از اسیدهای آمینه نظیر گلوتامین (*glutamine*) یا آلانین (*alanine*) می شود. سپس نیتروژن ممکن است به اسیدهای آمینه و ترکیبات نیتروژن دیگر در وارتهایی که انتقال آمونیاک در آنها انجام می شود، گردد.

### اهمیت BNF:

تخمین زده می شود که مقدار نیتروژن تولید شده از طریق BNF در جهان به ۱۷۵ میلیون تن در سال برسد. مقدار نیتروژن تثبیت شده در هر شرایطی بستگی به وضعیت محیطی و شرایط طبیعی بیولوژیکی سیستم دارد که قادر به تثبیت نیتروژن هستند. برای وضعیت خاص، مقادیر نیتروژن تثبیت شده توسط یک گیاه مثل جو ممکن است صدها کیلوگرم در هکتار با هم فرق داشته باشند. اختلاف در توزیع هر یک از سیستمهای BNF در ارزش نیتروژن اضافه شده به آن بستگی به فراهمی و جمعیت بیولوژیکی آن سیستم برای نیتروژن دارد.

### نوع سیستمهای BNF:

مشخص شده است که BNF به اندازه های مختلف در شرایط گوناگون مثل خاک، آبهای شیرین و شور و رسوبات، بر روی ریشه، ساقه، و برگهای گیاهان بخصوصی و بعضی حیوانات اتفاق می افتد. پتانسیل تثبیت نیتروژن بستگی به شرایطی دارد که می توانند رشد میکروارگانیسمها را باعث شوند. سیستم بیولوژیکی که قادر به تثبیت ازت هستند به دو گروه همزیست و غیرهمزیست تقسیم می شوند، که این امر بستگی دارد به اینکه چه نوع میکروارگانیسمی در این فعالیت شرکت داشته باشد.

### تثبیت همزیستی نیتروژن:

مهمترین سهم نیتروژن تثبیت شده از طریق همزیستی با میکروارگانیسمهای مخصوصی با ریشه گیاهان برگ بدست می آید. یک مثال کلاسیک در این مورد باکتریایی (ریزوبیومها) هستند که با ریشه گیاهان لگومینوز با درجه بالای اختصاصی بودن میزبان (مثلا لوبیا، سویا، شیدر و بادام زمینی) همزیستی می کنند.



ترکیبات آلی ساده مختلف را آزاد کرده که ممکن است بعنوان غذا توسط باکتریهای آزادزی خاک به مصرف برسد.

این ذخیره مستمر و پیوسته غذایی برای باکتریها باعث افزایش جمعیت اینگونه باکتریها در خاک می شود که این عمل در منطقه ریزوسفر ریشه بطور چشمگیر و سریع انجام می گیرد. شواهد دال بر آن است که باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن بومی خاک معمولا در ریزوسفر ریشه گیاهان وجود دارند که می توانند مقادیر زیادی از ازت را تثبیت کرده و به خاک اضافه نمایند.

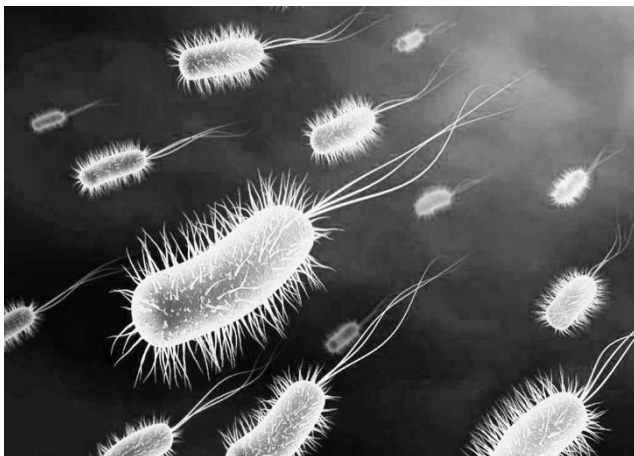
این اثر ممکن است بعلاوه نزدیکی جمعیت میکروارگانیسمها و ریشه انجام شود. مواد غذایی آزاد شده از ریشه به مقدار زیادی برای میکروارگانیسمهایی که در سطح ریشه بسر می برند قابل استفاده تر خواهند بود.

در تحت شرایط محیطی مناسب، سیانوباکتریهای هوازی ممکن است باعث فواید زیادی برای محیط آب شوند و کلاستریدیوم بی هوازی ممکن است نقش مهمی را در رسوب مواد در آبهای آزاد بازی کند. بیشتر نیتروژن تثبیت شده در محیطهای دریایی (حدود ۲۰ درصد از کل نیتروژن تثبیت شده بیولوژیکی) مربوط می شود به این سیانوباکتریها ولی انواع مختلف دیگر میکروارگانیسمها نیز ممکن است در چنین محیطهایی یافت شوند. سهم معنی دار میکروارگانیسمهای فتوسنتز کننده (سیانوباکتریها) و غیر فتوسنتز کننده (کلاستریدیومها) در تثبیت ازت در منطقه ریزوسفر ریشه برنج بخوبی شناخته شده است.

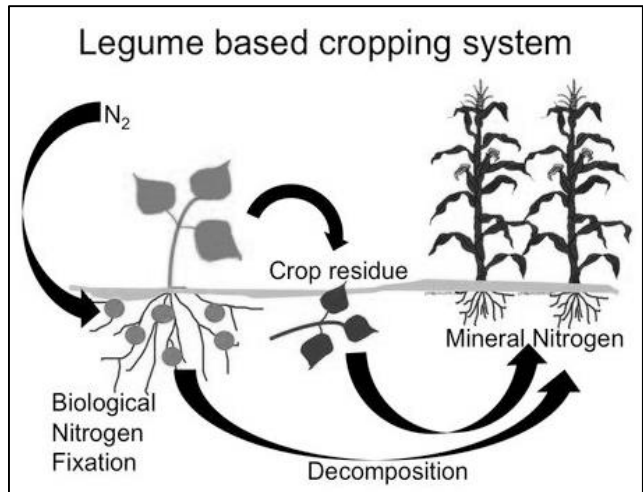
در مجموع، فعالیت آنزیم نیتروژناز در خاک اطراف چندین ریشه دارای میکوریزا و در ریزوسفر گیاهان دریایی (*Thalassia*) و گیاهان آب شیرین (*Glyceria*) این امر تصدیق می کنند.

سطح برگ یا فیلوسفر (*phyllosphere*) بعضی از گیاهان بخصوص در رژیمهای گرم، مرطوب مناطق استوایی (حاره) ممکن است شرایط اضافی مناسب محیطی را برای فعالیت باکتریهای آزادزی تثبیت کننده نیتروژن مثل ازوتوباکتر (*Azotobacter*)، بیجرینکیا (*Beijerinckia*)، و کیسیلا (*Kiebsiella*) فراهم نماید.

باکتریهای بی هوازی و آزادزی تثبیت کننده نیتروژن در روده بعضی از حیوانات علفخوار و همچنین انسان وجود داشته و می توانند نیتروژن را تثبیت کنند. فعالیت آنزیم نیتروژناز معمولا کم بوده و اختلاف آنها در مواد غذایی مورد نیاز میزبان مشکوک می باشد.



■ منابع در دفتر فصلنامه موجود می باشد



### تثبیت غیر همزیستی نیتروژن:

تنوع زیادی در میکروارگانیسمهای آزادی که قادرند نیتروژن هوا بصورت بیولوژیکی (BNF) تثبیت کنند، وجود دارد. این میکروارگانیسمها در حدود ۲۰ گونه باکتری غیر فتوسنتتیک هوازی مثل (ازوتوباکتر، بیجرینکیا) و غیرهوازی مثل (کلاستریدیوم) و حدود ۱۵ گونه سیانوباکتریهای فتوسنتتیک (جلبک سبز- آبی) مثل آناپانا و نوستوک را شامل می شوند. باکتریهای آزادی غیر فتوسنتتیک وابسته مواد آلی خاک بعنوان یک منبع غذایی می باشند در صورتیکه باکتریهای فتوسنتتیک ممکن است غذای خود را از طریق فتوسنتز تولید نمایند.

فعالیت تثبیت نیتروژن باکتریهای آزادی، غیر فتوسنتتیک، هوازی بستگی زیادی به رطوبت، اکسیژن و منابع غذایی آلی مناسب موجود در محیط دارد. باکتریهای غیرهوازی (کلاستریدیومها) در مناطق علفزار و خاکهای غرقاب و خاکهایی که با رطوبت و مواد آلی زیاد هستند، غالب بوده ولی اکسیژن برای باکتریها تقریبا محدود و کم می باشد.

مقدار نیتروژن تثبیت شده بوسیله باکتریهای آزادی غیر فتوسنتز کننده در خاک ممکن است حداکثر به ۱۵ کیلوگرم در هکتار در سال برسد. این برآورد نسبتا کم بر حسب محدود بودن منابع آلی مناسب (بعنوان منبع انرژی) و جمعیت کم باکتریها در محیط خاک انجام شده است. تثبیت نیتروژن در خاکهای مناطق تروپیکال و حاره ای یعنی جایی که رطوبت و درجه حرارت و فاکتورهای ضروری دیگر برای باکتریها مناسب تر است، بطور بارزی بیشتر می باشد.

اصلاح و بهبود خاک با استفاده از مواد آلی بعنوان بستری برای فعالیت جمعیت باکتریها بطور حتم باعث افزایش تثبیت نیتروژن خواهد شد. افزایش ازت تثبیت شده بدون اصلاح خاک با افزودن مواد آلی و در نتیجه بالا بردن جمعیت باکتریها تقریبا غیر قابل قبول است. افزایش جمعیت باکتریها تثبیت کننده نیتروژن از طریق تلقیح آنها به خاک موقتی بوده و سریعا از بین خواهند رفت و در نتیجه شرایط به همان حالت خاک بدون اصلاح بر می گردد که شرایطی را که برای فعالیت باکتریها مناسب نیست، فراهم خواهد آورد.

اطلاعات بسیار کمی در باره امکان تولید اقتصادی نیتروژن توسط سیانوباکتریهای فتوسنتز کننده آزادی وجود دارد ولی می توانند حداکثر حدود ۵۰ کیلوگرم N را در هکتار در سال به خاک اضافه نمایند. تثبیت نیتروژن بوسیله این موجودات بستگی بسیار زیادی به وجود نور خورشید و رطوبت مناسب محیطی دارد. ریشه گیاهان زنده به اندازه بسیار زیادی این