

УДК 58:51

## Подходы к описанию симбиотической азотфиксации Часть 1. Анализ и выделение перечня факторов с оценкой их приоритетности\*

*Л.А. Хворова<sup>1</sup>, А.Г. Топаж<sup>2</sup>, А.В. Абрамова<sup>1</sup>, К.Г. Неупокоева<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

<sup>2</sup> Агрофизический научно-исследовательский институт (Санкт-Петербург, Россия)

## Approaches to Description of a Symbiotic Nitrogen Fixation Part 1. Analysis and Identification of Factors With Their Priority Assessment

*L.A. Khvorova<sup>1</sup>, A.G. Topaj<sup>2</sup>, A.V. Abramova<sup>1</sup>, K.G. Neupokoeva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Altai State University (Barnaul, Russia)

<sup>2</sup> Agrophysical Research Institute (Saint-Petersburg, Russia)

Возрастающий спрос на сельскохозяйственную продукцию обычно приводит к все большему применению удобрений. Азот, содержащийся в удобрениях и не усвоенный сельскохозяйственными культурами, может поступать в атмосферу в виде парниковых газов либо попадать в почвенные воды, приводя к экологическим последствиям. Наряду с применением азотных удобрений необходимы альтернативные источники азота для создания более устойчивых систем в сельском хозяйстве. Бобовые культуры обладают потенциалом для реализации такой потребности благодаря своей уникальной биологической способности фиксировать азот из атмосферы, что благоприятно воздействует не только на сами бобовые, но и на культуры в севообороте.

Исследуются и сравниваются факторы окружающей среды, влияющие на сложный процесс биологической азотфиксации бобовых культур: температуру, содержание влаги, концентрацию азота, pH в корнеобитаемом слое почвы, питание растений, включая субстраты углерода (C) и азота (N) в корнях, и генетическую вариацию потенциальной способности бобовых культур к азотфиксации.

Конечная цель исследования – разработка модели симбиотической азотфиксации бобовыми культурами. Задача же данного раздела сфокусирована на том, как азотфиксация бобовых культур реагирует на условия окружающей среды и на содержание субстратов углерода и азота в растениях.

**Ключевые слова:** азотфиксация, минеральный азот почвы, бобовые культуры, условия окружающей среды, моделирование.

DOI 10.14258/izvasu(2015)1.1-33

Increasing demand for agricultural production typically results in greater fertilizer application. Nitrogen (N) in fertilizers or manures which is not taken up by crops can be released into the atmosphere as nitrogenous greenhouse gases or leached into ground water, with resulting environmental implications. Rather than relying purely on application of N fertilizer, alternative N sources are needed to help develop more sustainable farming systems. Legumes have the potential to fulfil this requirement due to their unique ability to fix N biologically from the atmosphere, benefiting not only the legumes themselves, but also the intercropped or subsequent crops.

In this paper, we explore and compare the environmental conditions influencing complex process of legume biological nitrogen fixation such as temperature, water content, N concentration, root zone pH, plant nutrient status including C and N substrates in roots, and a genetic variation in potential N fixation capacity.

The ultimate goal of the research is to develop a model of legume biological nitrogen fixation. In this section, we focus only on how legume biological nitrogen fixation responds to environmental conditions and plant C and N substrates.

**Key words:** nitrogen fixation, soil mineral nitrogen, legumes, environmental conditions, simulation.

\* Работа выполнена при поддержке благотворительного фонда В.В. Потанина и Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта № 14-31-50324.

**Введение.** Работа выполнена в рамках научного сотрудничества коллективов Агрофизического института (Санкт-Петербург) и Алтайского государственного университета. Результатом совместного проекта является разработка структуры и функционального содержания аналитической компартментальной модели симбиотической азотфиксации, практическая реализация предметно-ориентированной модели в специализированной среде имитационного моделирования AnyLogic с использованием методов системной динамики и агентного подхода. Реализация подмодели симбиотической азотфиксации бобовых культур предполагается также в форме объектно-процедурных модулей комплексной модели производственного процесса AGROTOOL.

Базовая модель AGROTOOL выступит в качестве полигона или «внешней информационной среды» для модели симбиотической азотфиксации на этапе ее разработки в форме изолированного расчетного модуля. В конечном счете разработанная модель симбиотической азотфиксации будет инкорпорирована в общую комплексную модель, став завершающим «кирпичиком» компьютерной системы нового поколения для расчета и анализа производственного процесса растений в многолетнем севообороте.

Бобовые культуры обладают уникальной способностью фиксировать азот (N) из атмосферы. Этот факт может благоприятно воздействовать не только на сами бобовые культуры, но и на культуры севооборота, таким образом сокращая либо сводя на нет необходимость применения азотных удобрений. Разработанная методика количественной оценки биологической азотфиксации бобовых культур смогла бы обеспечить сельхозпроизводителей инструментом регулирования содержания азота в почве с целью повышения урожайности и сокращения вредных воздействий на окружающую среду.

Существующие способы непосредственной количественной оценки биологической азотфиксации бобовых культур в полевых условиях являются трудоемкими и дорогостоящими. Кроме того, получаемые данные непосредственно привязаны к конкретному времени и месту измерения. Другой способ количественной оценки азотфиксации бобовых культур связан с использованием эмпирических моделей либо с помощью динамического моделирования механизма биологической азотфиксации, позволяющего спрогнозировать реакцию азотфиксации на широкий диапазон параметров окружающей среды и условия роста и развития бобовых культур.

### **1. Симбиотические системы – ассоциации микроорганизмов и растений**

В отечественной и зарубежной литературе накоплен большой фактический материал по исследованию отдельных сторон симбиотической фиксации азота клубеньковыми тканями корней бобовых. Но он

отражает только отдельные аспекты этого процесса и часто носит противоречивый характер. Наличие экспериментального материала только по отдельным сторонам азотфиксации объясняется трудоемкостью постановки и проведения опытов в полевых условиях. Лишь немногие исследователи получают и накапливают данные, объем и качество которых соответствует поставленной задаче. Практически отсутствуют опыты, в которых производятся комплексные измерения, позволяющие оценить все факторы, влияющие на процесс азотфиксации, да и сама методика полевого опыта несовершенна.

Поэтому для задачи моделирования было важно синтезировать имеющийся экспериментальный материал, найти взаимосвязи между всеми разрозненными фактами, устранить противоречивость анализом имеющихся данных, выявить основные факторы, наиболее важные для процесса моделирования.

Впервые экспериментальный материал синтезирован и систематизирован в [1]. Он охватывает все аспекты процесса симбиотической фиксации азота и включает в себя анализ имеющегося многочисленного экспериментального материала. В работе [1] приведен достаточно полный список литературы, на основе анализа которой установлены связи симбиотической фиксации азота не только с почвенными факторами и физиологическими особенностями бобовых, но и выявлено обратное действие процесса азотфиксации на физиологию культур, плодородие почвы, определена роль азотфиксации в азотном питании сельскохозяйственных культур.

Наиболее продуктивным с сельскохозяйственной точки зрения является симбиоз клубеньковых бактерий *Rhizobium* с бобовыми растениями. Оба компонента симбиотической системы, хотя и дистанционно, снабжают друг друга материалами и энергией в формах, необходимых для каждого из них, и в целом составляют единую систему углеродного и азотного питания растений. Бактерии получают от бобовых образованные ими в процессе фотосинтеза углеводы и другие соединения и в свою очередь снабжают растение азотом, в основном в виде аммония [2, 3], фиксированным ими из воздуха. Азот, фиксируемый в клубеньках, поступает в ткани растения-хозяина и остается в составе его биомассы. Хотя часть азота, образованного в результате фиксации, и используется микросимбионтом для роста и поддержания его клеток, большая часть азота экспортируется в клетки хозяина [4–8] и может, таким образом, быть использована для поддержания его ростовых процессов.

Такой симбиоз начинается при инфицировании корней бобового растения микоризой (*Rhizobium*) с образованием корневых клубеньков, где и происходит азотфиксация. Процессу азотфиксации требуется нитрогеназный фермент в качестве катализатора

для реакции расщепления молекулы азота и превращения ее в аммоний.

**Факторы, влияющие на процесс симбиотической азотфиксации**

***Кислотность почвы***

Прежде всего следует отметить существенную роль реакции почвы [9], которая оказывает большое влияние на жизнедеятельность клубеньковых бактерий и образование клубеньков. Амплитуда рН для разных видов и даже штаммов клубеньковых бактерий несколько различна [10]. Так, клубеньковые бактерии клевера более устойчивы к низким значениям рН, чем клубеньковые бактерии люцерны. Очевидно, здесь сказывается адаптация микроорганизмов к среде их обитания (клевер растет на более кислых почвах, чем люцерна).

Границы рН для роста бобовых растений обычно бывают шире, чем зона рН для образования клубеньков и азотфиксации. Лучше всего клубеньки образуются при реакции среды, близкой к нейтральной, и развитие их в среднем происходит в пределах 4,9–11,0 с оптимумом рН около 7.

***Влажность почвы***

Важнейшим фактором, определяющим не только наличие и количество клубеньковых бактерий, но и определяющим взаимоотношения клубеньковых бактерий с бобовыми растениями и активность процесса азотфиксации, является влажность почвы.

По данным ряда авторов [11], клубеньковые бактерии более влаголюбивы, чем другие почвенные бактерии. Известно, что если при низкой влажности почвы (в пределах 10–12% ПВ – полной влагоемкости почвы) корневая система отдельных видов бобовых растений еще может проявлять способность к росту, то клубеньковые бактерии в таких условиях вообще не размножаются, хотя и остаются жизнеспособными. Именно влагой определяется движение клубеньковых бактерий в почве, и оно прекращается, когда водная пленка, выстилающая почвенные поры, становится прерывистой.

Обобщая результаты ряда опытов [10, 11], можно сделать предположение, что сравнительно нормальная жизнедеятельность клубеньковых бактерий начинает проявляться при влажности почвы не ниже 15–20% ПВ. Наиболее благоприятные условия увлажнения почвы, в равной мере отвечающие требованиям большинства бобовых растений и сопутствующих им клубеньковых бактерий, лежат в пределах 40–80% от ее ПВ, а оптимальный уровень влажности не выходит за рамки 60–80% ПВ [12]. При таком режиме влажности наблюдается почти полное совпадение между количеством клубеньков и продуктивностью растений: азотфиксирующая способность клубеньков и продуктивность растений в целом выражается наибольшими величинами.

Недостаток влаги в почве в начале вегетации задерживает образование клубеньков, а снижение влаж-

ности почвы в последующие периоды вызывает их отмирание. В засушливые годы клубеньки не образуются или формируются мелкие и неактивные [12]. Но если клубеньки сформировались, то избыточная влажность не подавляет их нормального функционирования. Более того, полив инокулированных бобовых растений усиливает процесс азотнакопления.

***Температура почвы***

Температура – третий важный показатель, определяющий взаимоотношения бобовых растений и клубеньковых бактерий [13, 14]. Наиболее активная азотфиксация происходит лишь в зоне определенных температур. Энергия этого процесса резко снижается при понижении и повышении температуры почвы. По данным [13], понижение температуры ниже оптимума менее подавляет азотфиксацию, чем равнозначное повышение температуры.

Следует отметить, что оптимальные температуры развития бобовых растений, образования клубеньков и азотфиксации не совпадают. Образование клубеньков в природных условиях может наблюдаться при температурах, несколько более высоких, чем 0°C. Азотусвоения в таких условиях не происходит. Обычно этот процесс проявляется явно лишь при температуре около 10°C и выше. У люцерны максимальная азотфиксация наблюдается при температуре около 24°C и снижается при ее отклонении в любую сторону. Многие виды бобовых растений при температуре около 30°C совсем слабо связывают молекулярный азот, хотя их бактерии-симбионты могут активно размножаться в этих условиях. Клубеньки при этом образуются, но азотнакопления не происходит.

***Содержание азота в корнеобитаемом слое почвы***

Образование клубеньков и азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий находятся в большой зависимости от условий азотного питания бобовых растений. При достаточном снабжении корневой системы растения связанным азотом в ней создаются особые условия, препятствующие образованию клубеньков и усвоению атмосферного азота клубеньковыми бактериями [15]. Интенсивное поступление в растение минерального азота вызывает депрессию процессов азотфиксации, которая тем сильнее, чем выше содержание азота в почве [15, 16].

Если в оценке характера влияния минерального азота на развитие симбиотических отношений с клубеньковыми бактериями больше единодушия, то рекомендации о целесообразности внесения под бобовые культуры минерального азота и о его дозах очень противоречивы. Одни авторы считают необходимым применение больших доз минерального азота для получения высоких урожаев независимо от характера его влияния на симбиотический аппарат [17]. При этом утверждается, что минеральный азот в повышенных дозах не снижает активность клубеньковых бактерий и интенсивность азотфиксации. Другие считают це-

лесообразным внесение небольших доз минерального азота (20–30 кг/га), необходимого для первых этапов развития бобового растения до начала азотфиксации [18]. Третьи полностью исключают внесение минерального азота, полагая, что при инокуляции семян высокоактивными штаммами клубеньковых бактерий и создании оптимальных условий для бобовых культур и бактерий растение будет полностью обеспечено симбиотически усвоенным азотом. Противоречивость подобных утверждений является следствием широкого варьирования почвенно-климатических условий при постановке опытов, биологическими особенностями бобовых культур, использованием неодинаковых методов учета продуктивности азотфиксации.

Однако анализ данных многих авторов и исследований указывает на то, что для хорошего первичного развития бобовых культур в питательной среде необходимо наличие небольшого количества стартового минерального азота [1], который не столько влияет на увеличение урожая бобовых растений, сколько способствует формированию фотосинтетического аппарата, корневой системы и симбиотически активных клубеньков.

#### **Фотосинтез и азотфиксация**

Для бобовых растений, способных использовать азот из двух источников – атмосферный молекулярный азот (в результате симбиоза с азотфиксирующими бактериями) и минеральный азот почвы, – вопрос о взаимодействии фотосинтеза с усвоением азота является особенно существенным и издавна служит предметом специальных исследований [19–21].

Фотосинтетические процессы, благодаря которым синтезируются углеводы, служат основным источником для сложных нитрогеназных реакций восстановления  $N_2$  до аммиака и оказывают значительное воздействие на ход и активность симбиотической фиксации азота. Известно, что фиксация молекулярного азота – весьма энергоемкий процесс. Клетка микроорганизма-азотфиксатора должна затратить 25–30 мо-

лей АТФ на каждый моль образованного аммиака [4]. Кроме того, углеродные соединения нужны для связывания образующегося аммиака в процессе фиксации молекулярного азота и его дальнейшего транспорта в органы высшего растения. Доказана тесная зависимость интенсивности азотфиксации клубеньками бобовых от условий обеспечения фотоассимилятами. Имеются данные [1], показывающие, что именно снабжение клубеньков фотоассимилятами является главным фактором, лимитирующим процесс азотфиксации в бобовом растении.

**Заключение.** Бобовые культуры в сельскохозяйственном производстве используются и как ресурсосберегающие системы для создания азотного фонда почвы и повышения ее плодородия. Следовательно, количественная оценка биологической азотфиксации бобовых культур очень важна. Вследствие этого возникает потребность в методах количественного прогнозирования азотфиксации бобовых культур для принятия решений относительно разработки ресурсосберегающих систем сельского хозяйства и управления ими. Моделирование потенциально является лучшим инструментом для понимания и количественной оценки биологической азотфиксации, так как в его основе лежит знание механизмов процесса, климатических условий и управления. С помощью моделирования можно достаточно точно определить вариации биологической азотфиксации бобовых культур в различных ситуациях.

В следующей статье мы проанализируем и сравним методы моделирования, представленные в литературе [1, 22], которые касаются количественной оценки биологической азотфиксации бобовых культур, сопоставим различные схемы и функции, которые используются для моделирования реакции азотфиксации на биотические и абиотические факторы, проанализируем их относительно сильные и слабые стороны, определим расхождения в существующих моделях.

## **Библиографический список**

1. Хворова Л.А. Моделирование влияния азотного питания на продукционный процесс посева люцерны : дис. ... канд. техн. наук. – СПб., 1992.
2. Howard J.B., Rees D.C. Structural bases of biological nitrogen fixation // Chem. Rev. – 1996. – №96.
3. Пошон Ж., Баржак Г. де. Почвенная микробиология. – М., 1960.
4. Кретович В.Л., Романов В.И. Фотоассимиляты и азотфиксация в клубеньках бобовых растений // Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. – М., 1985.
5. Месяц И.И. Новые исследования по биологической фиксации азота // Достиж. с.-х. науки и практики. Сер. 1. Земледелие и растениеводство. – 1980. – № 12.
6. Хайлова Г.Ф., Жизневская Г.Я. Симбиотическая азотфиксирующая система бобовых растений // Агрохимия. – 1980. – №12.
7. Pate J.S., Atkins C.A. Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related process in nodules of legumes // 4-th Intern. symp.  $N_2$ -fixation. Canberra, 1980.
8. Patterson Rue N. How much nitrogen do legumes fix? 1. Effect of photosynthetic source – sink manipulations // Advances in agronomy. – 1980. – Vol. 34.
9. Натмен П.С. Клубеньковые бактерии в почве // Почвенная микробиология. – М., 1979.
10. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. – М., 1973.

11. Воробьев В.А., Пигарева Т.И. О роли температуры и влажности почвы в усвоении азота бобовыми растениями и формировании урожая // Физиология устойчивости растений к низким температурам к заморозкам. – Иркутск, 1980.
12. Посыпанов Г.С., Храмой В.К. Формирование симбиотического аппарата вики посевной при разных условиях выращивания // Изв. ТСХА. – 1983. – Вып. 4.
13. Гукова М.М. Зависимость симбиотического усвоения азота бобовыми растениями от температуры // Изв. АН СССР. – 1962. – Вып. 6.
14. Whitehead D.C. Glassland Nitrogen. – Wallingford, 1995.
15. Хворова Л.А. Моделирование продукционного процесса люцерны // Математическое и программное обеспечение задач управления агросистемами: сб. науч. тр. – Л., 1990.
16. Хворова Л.А., Полуэктов Р.А. Моделирование азотного цикла в системе «почва – бобовые растения» // Почва и растение – процессы и модели : сб. науч. тр. – Л., 1992.
17. Калниньш А.Д. Влияние минерального азота на эффективность симбиоза клубеньковых бактерий с бобовыми растениями // Роль микроорганизмов в питании растений и повышении эффективности удобрений. – Л., 1965.
18. Доросинский Л.М. Использование люпином и люцерной атмосферного азота при наличии в субстрате минерального азота // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1967. – № 6.
19. Нгуен Тхи Чи, Андреева Т.Ф., Строганова Л.Е. Фотосинтез и фиксация атмосферного азота растениями сои // Физиология растений. – Т. 30, №4.
20. Minchin F.R., Summerfield R.J. et al. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes // Plant Cell Environ. – №4.
21. Layzell D.B., Pate J.S. et al. Partitioning of carbon and nitrogen and the nutrition of root and shoot apex in a nodulated legume // Plant Physiol. – №67.
22. Liu Y., Wu L. et al. Models of biological nitrogen fixation of legumes // Agronomy for Sustainable Development, Springer Verlag (Germany). – 2011. – №31(1).