

Фиксация молекулярного азота (азотфиксация, диязотрофия) микроорганизмами

Фиксация молекулярного азота (N_2) – это биологический восстановительный процесс. Первым его продуктом является аммиак, который затем включается в азотистые соединения, доступные для использования другими организмами.

Азотфиксация играет большую роль в круговороте азота в природе, в обогащении почвы и водоемов связанным азотом.

Единственными организмами, способными осуществлять этот процесс, являются бактерии, которые называются *азотфиксирующими*, или *дiazотрофами*, так как они могут использовать как N_2 , так и связанные формы азота.

Азотфиксация обнаружена у представителей разных групп бактерий, включая аэробные, анаэробные и фототрофные бактерии.



Азотфиксирующие бактерии подразделяют на три группы: симбиотические, свободноживущие и ассоциативные.

Симбиотические азотфиксаторы усваивают молекулярный азот, только находясь в симбиозе с растением.

Особо важное значение имеет симбиоз между клубеньковыми бактериями рода *Rhizobium* и бобовыми растениями.

К симбиотическим азотфиксаторам относятся также бактерии рода *Bradyrhizobium* (симбиоз с люпином, соей, вигной, машем, арахисом и т. д.), бактерии рода *Azorhizobium* (симбиоз с бобовыми растениями).

Бактерии родов *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* и *Azorhizobium* входят в α -подгруппу протеобактерий и формируют корневые и стеблевые (*Azorhizobium*) клубеньки у бобовых растений.



Актиномицеты рода *Frankia* также обитают в качестве эндосимбионтов в клубеньках, которые образуются на корнях небобовых растений, как древесных и кустарниковых, так и травянистых, среди которых ольха, облепиха, стланик, казуарина, восковница, лох, шефердия, куропаточья трава и др.

Некоторые симбиотические азотфиксаторы, относящиеся к роду *Klebsiella*, образуют клубеньки на листьях кустарников *Pavetta* и *Psychotria*.

Цианобактерии *Anabaena azollae* образуют симбиотическую ассоциацию с водным папоротником *Azolla* (цианобактерии находятся в листовых полостях папоротника), внося большой вклад в азотфиксацию на рисовых плантациях, где этот папоротник растет на поверхности покрывающей почву воды.



Цианобактерии рода *Nostoc* вступают в симбиоз с мхами-печеночниками и тропическим растением *Gunnera macrophylla*.

Симбиотические цианобактерии присутствуют в лишайниках, представляющих собой ассоциацию этих прокариот с грибами.

Благодаря тому, что цианобактерии осуществляют азотфиксацию и имеют фотоавтотрофный тип метаболизма, нуждаясь для роста только в CO_2 , N_2 и минеральных солях, лишайники первыми заселяют неорганические среды, создавая условия для развития других организмов.



К свободноживущим азотфиксаторам относятся

- некоторые виды бактерий рода *Clostridium* (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutyricum*, *C. felsineum*, *C. pectovororum* и др.),
- бактерии родов *Azotobacter*, *Azomonas*, *Beijerinckia*, *Derxia*,
- большинство аноксигенных фототрофных бактерий,
- многие цианобактерии,
- факультативные анаэробы (*Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa*),
- хемолитоавтотрофные бактерии (*Xanthobacter autotrophicus*, *Alcaligenes latus*),
- метилотрофные (бактерии родов *Methylomonas*, *Methylobacterium* и *Methylococcus*),
- сульфатредуцирующие (бактерии родов *Desulfotomaculum* и *Desulfovibrio*) и метаногенные бактерии.



Ассоциативные азотфиксаторы – бактерии, обитающие в ризоплане (на поверхности корней), ризосфере (в почве, окружающей корни) и филлосфере (на листьях, стеблях) растений, т. е. живущие в ассоциации с высшими растениями.

К активным азотфиксаторам, развивающимся в ризосфере и ризоплане различных растений, относятся бактерии азоспириллы (*Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans* и др.), *Klebsiella planticola*, *Herbaspirillum seropedicae*, представители рода *Pseudomonas* и др.

Бактерии, обитающие в филлосфере, называются **эпифитными**, среди которых имеются азотфиксаторы, например *Pantoea agglomerans*.



Реакцию восстановления молекулярного азота до аммиака катализирует фермент **нитрогеназа**.

Синтез нитрогеназы детерминируют *nif*-гены (от англ. **nitrogen fixation**), которые находятся в хромосоме (*Klebsiella*, *Bradyrhizobium*) или мегаплазмиде (*Rhizobium*).

Кроме *nif*-генов в азотфиксации участвуют продукты *fix*-генов.

Известны три типа ферментов нитрогеназ. Наиболее распространенный тип содержит молибден, в других типах этого фермента вместо молибдена присутствует ванадий или железо.

Некоторые азотфиксирующие бактерии в зависимости от наличия в среде молибдена или ванадия способны синтезировать два или даже три (*Azotobacter spp.*) типа нитрогеназ.

Все типы нитрогеназ состоят из двух белковых компонентов.



Компонент 1 – это собственно нитрогеназа, или MoFe-белок (динитрогеназа, или молибдоферредоксин); компонент 2 – это редуктаза динитрогеназы, или Fe-белок (FeS-белок, или азоферредоксин).

MoFe-белок (мол. масса примерно 240 кДа) состоит из четырех субъединиц двух типов, т.е. представляет собой $\alpha_2\beta_2$ -тетрамер.

Этот тетрамерный белок связан с MoFe-кофактором, выполняющим роль каталитического сайта восстановления N_2 .

Fe-белок – гомодимер, состоящий из двух идентичных субъединиц, α_2 – димер (мол. масса примерно 60 кДа), соединенных через $[Fe_4S_4]$ -центр. Fe-белок принимает электроны от восстановленного ферредоксина или флаводоксина и передает их на MoFe-белок в АТФ-зависимой реакции.



Фермент нитрогеназа высокочувствителен к молекулярному кислороду – он инактивируется на воздухе и в аэробных условиях его синтез прекращается.

Таким образом, фиксация азота представляет собой строго анаэробный процесс.

Поэтому чувствительность нитрогеназы к O_2 не затрудняет осуществление азотфиксации у строгих анаэробов, но является лимитирующим фактором в случае аэробов и факультативных анаэробов. Тем не менее эти бактерии способны осуществлять азотфиксацию при низком содержании молекулярного кислорода в среде благодаря наличию у них специальных защитных механизмов.



У некоторых аэробных почвенных бактерий, таких как бактерии рода *Azotobacter*, защитный в отношении нитрогеназы эффект оказывает потребление ими с высокой скоростью молекулярного кислорода из среды, т.е. действует так называемая **дыхательная защита**, которая обеспечивается высокоактивной и разветвленной дыхательной цепью.

При фиксации азота у этих бактерий действуют те ветви этой цепи, которые имеют только один участок сопряжения с фосфорилированием, но при этом эффективно восстанавливают O_2 до воды.



У азотфиксирующих бактерий рода *Azotobacter* при высокой концентрации кислорода индуцируется синтез терминальной цитохром- α -оксидазы, которая обладает низким сродством к O_2 , но высокой скоростью его потребления.

Благодаря высокой скорости переноса в этой цепи электронов на кислород происходит его быстрое удаление из среды, предотвращающее инактивацию нитрогеназы. В других условиях (в среде присутствует связанный азот) эти бактерии используют альтернативную ветвь дыхательной цепи, три участка сопряжения с фосфорилированием.



У факультативных фототрофов защиту нитрогеназы при низкой концентрации O_2 обеспечивает особый белок. Предполагают, что он связывается с нитрогеназой, и это вызывает изменение ее конформации, сопровождаемое потерей активности, но вместе с тем приобретением устойчивости к кислороду, – эффект, названный *конформационной защитой*. Это связывание носит обратимый характер, и при исчерпании молекулярного кислорода нитрогеназа возвращается в активное состояние.



У некоторых бактерий защиту нитрогеназы от молекулярного кислорода обеспечивает *морфологическая адаптация*. Типичным примером ее является образование у нитчатых цианобактерий специализированных клеток *гетероцист*, основная функция которых состоит в фиксации молекулярного азота. Гетероцисты образуются при недостатке в среде связанного азота. Зрелые гетероцисты крупнее вегетативных клеток, поверх клеточной стенки вегетативной клетки они окружены тремя дополнительными утолщенными покровами: внутренний пластинчатый гликолипидный слой, гомогенный промежуточный полисахаридный слой и наружный волокнистый полисахаридный слой.



Другой механизм морфологической адаптации, препятствующий доступу молекулярного кислорода к клеткам, – это продукция большого количества слизи (например, у бактерий рода *Azotobacter*). У симбиотических азотфиксирующих бактерий морфологическая адаптация реализуется путем образования корневых или стеблевых клубеньков у растений. В этих образованиях находятся азотфиксирующие бактерии в виде бактериоидов (разветвленных, булабовидных клеток). Для защиты нитрогеназы от молекулярного кислорода в клубеньках синтезируется пигмент *леггемоглобин*, который обладает высоким сродством к кислороду. Благодаря связыванию избытка кислорода леггемоглобином бактериоиды снабжаются им в количестве, достаточном для роста клеток и получения энергии, не препятствуя при этом фиксации азота.



Рассмотрим на примере клубеньковых бактерий.

Видовое название клубеньковых бактерий обычно соответствует латинскому названию того растения, из клубеньков которого выделены бактерии. Например, *Rhizobium trifolii* – растение-хозяин клевер, *Rhizobium phaseoli* – растение-хозяин фасоль, *Rhizobium leguminosarum* – растение-хозяин горох, кормовые бобы, вика, чина и т. д.

Клубеньковые бактерии – это грамотрицательные подвижные палочки. Они относятся к микроаэрофильным микроорганизмам, способным развиваться при низком парциальном давлении кислорода в среде. Оптимальная для роста клубеньковых бактерий температура 24–26 °С.



Клубеньковые бактерии хемогетеротрофы, т. е. в качестве источника углерода и энергии используют органические вещества, часто нуждаются в некоторых витаминах – тиамине, пантотеновой кислоте, биотине. Они обычно существуют свободно в почве, их количество зависит от характера почвы и ее предшествующей сельскохозяйственной обработки. При свободном существовании в почве используют связанный азот, т.е. утрачивают способность фиксировать азот атмосферы.

Клубеньковые бактерии обладают выраженной специфичностью в отношении бобовых растений: каждый их вид вызывает образование клубеньков на корнях одного или группы близких видов бобовых.



В основе специфичности такого симбиоза лежит способность бобовых растений синтезировать лектины – гликопротеины, обладающие свойством обратимо и избирательно связывать углеводы и углеводные детерминанты биополимеров без образования ковалентной связи и изменения их структуры. Лектины находятся на наружной поверхности корневых волосков. Видоспецифичные же углеводы входят в состав наружной мембраны клеточной стенки клубеньковых бактерий. Взаимодействие поверхностных лектинов корневого волоска с углеводами мембраны бактерий рода *Rhizobium* определяет процесс дальнейшего инфицирования корневого волоска, т.е. будет ли инфицировано растение данными клубеньковыми бактериями или нет.



Симбиоз устанавливается при прорастании семян бобовых растений. При их развитии корни выделяют органические питательные вещества, которые стимулируют размножение ризосферных микроорганизмов, в том числе и клубеньковых бактерий. Из почвы клубеньковые бактерии проникают через корневые волоски в корень. Процесс инфицирования начинается с адгезии клеток бактерий на поверхности корневых волосков. В клетках корневых волосков бобовых синтезируются особые вещества – хемоаттрактанты для бактерий. К таким соединениям, в частности, относятся флавоноиды и изофлавоноиды.



В процессе распознавания принимают также участие уже упоминаемые лектины, способствующие прикреплению бактерий к корневым волоскам. Флавоноиды и изофлавоноиды индуцируют экспрессию бактериальных *nod*-генов, которые отвечают за синтез Nod-факторов (белков-нодулинов), обеспечивающих межвидовое взаимодействие.

В корневой волосок проникает сразу несколько клеток клубеньковых бактерий. Проникновение сопровождается инвагинацией мембраны корневого волоска, образуется трубка, выстланная целлюлозой, вырабатываемой клетками хозяина. В этой трубке, называемой инфекционной нитью, находятся интенсивно размножающиеся бактерии.



Инфекционная нить проникает в кору корня, проходя прямо через ее клетки, а не между ними. Развитие собственно клубенька начинается, когда инфекционная нить достигает тетраплоидной клетки ткани коры. При этом происходит усиленная пролиферация как самой тетраплоидной клетки, так и соседних диплоидных клеток. Индуцирует пролиферацию индолилуксусная кислота – растительный гормон, который синтезируют клубеньковые бактерии.



В молодых клубеньках большинство бактерий представляет собой палочковидные клетки, однако в дальнейшем они приобретают неправильную форму и становятся разветвленными, булавовидными или сферическими и называются *бактероидами*. На стадии бактериоидов происходит фиксация молекулярного азота. В конце периода роста растения бактерии часто полностью исчезают из клубеньков; они отмирают, а вещества клеток поглощает растение-хозяин.

У клубеньковых бактерий за фиксацию атмосферного азота ответственен *nif*-оперон, который локализован в *Sym*-плазмидах (от англ. *sym-biosis inducing*). Гены *nif*-оперона детерминируют синтез *нитрогеназы* – основного фермента, участвующего в фиксации молекулярного азота.



Нитрогеназа очень чувствительна к наличию молекулярного кислорода и инактивируется им, поэтому в клубеньках бобовых растений синтезируется защитное вещество – пигмент *леггемоглобин*, обладающий высоким сродством к кислороду. Образование леггемоглобина – это специфический результат симбиоза: простетическая группа (протогем) синтезируется бактероидами, а белковый компонент – при участии растения. Благодаря связыванию избытка кислорода леггемоглобином бактериоды снабжаются им в количестве, достаточном для роста клеток и получения энергии, не препятствуя при этом фиксации азота.

Клубеньки с леггемоглобином имеют розовый цвет и способны фиксировать молекулярный азот. При разрушении леггемоглобина образуются зеленые пигменты биливердины, а клубеньки, содержащие такие пигменты, молекулярный азот не фиксируют.



Значение клубеньковых бактерий в сельском хозяйстве очень велико. За вегетационный период на 1 га поля, засеянного многолетними бобовыми растениями (клевер, люцерна), связывается 150–220 кг атмосферного азота, однолетними бобовыми (фасоль, соя, бобы, горох, чечевица) – 40–110 кг. Часть его выделяется из клубеньков во время вегетации, в основном в виде аминокислот. Остающиеся после уборки урожая корни, особенно у многолетних бобовых, содержат также много азота. Эти остатки подвергаются аммонификации, благодаря чему происходит обогащение почвы доступными для растений соединениями азота.



Для обогащения почвы клубеньковыми бактериями в промышленных масштабах производятся препараты нитрагин, ризоторфин, сапронин, ризофос и СояРиз, которые используются для предпосевной обработки семян бобовых. Эти удобрения содержат естественные почвенные бактерии и позволяют увеличить накопление биомассы высшими растениями. Перспективность такой технологии состоит в том, что она позволяет частично заменить минеральные удобрения, и таким образом снизить уровень загрязнения, вызванный их интенсивным использованием.



Новые перспективы для увеличения эффективности азотфиксации и улучшения азотного питания растений открывает использование достижений генной инженерии. В настоящее время практически решена проблема увеличения дозы *nif*-генов у клубеньковых бактерий рода *Rhizobium*. Выполнены работы по переносу *nif*-генов в другие организмы, так как они локализуются на плазмидах.



Кроме перечисленных механизмов защиты от молекулярного кислорода у многих азотфиксирующих бактерий имеется *поведенческая адаптация*. Примером такой адаптации является агрегация клеток бактерий или образование тесных ассоциаций азотфиксаторов с аэробными гетеротрофами. Для подвижных азотфиксаторов эффективным способом защиты служит *отрицательный аэротаксис*, позволяющий бактериям избегать области среды с повышенным содержанием кислорода.



Биохимия азотфиксации

Для фиксации молекулярного азота необходимы восстановительная сила и энергия.

Энергия затрачивается на преодоление высокого активационного барьера для разрыва первой из трех чрезвычайно устойчивых при нормальной температуре связей в молекуле $N\equiv N$. В условиях промышленного синтеза NH_3 из H_2 и N_2 (реакция Харбера-Боша) этот барьер преодолевается под действием высокой температуры и высокого давления в присутствии металлсодержащих катализаторов. Затраты АТФ и восстановителя при биологической фиксации азота настолько велики, что скорость роста бактерий и экономический коэффициент с использованием N_2 в качестве источника азота значительно ниже, чем в присутствии NH_3 .



Восстановитель и молекулы АТФ синтезируются в процессе брожения, дыхания или фотосинтеза.

Восстановителем в нитрогеназной реакции служит восстановленный ферредоксин (в условиях дефицита железа он заменяется флаводоксином).

Восстановление ферредоксина может происходить различными путями.

У оксигенных фототрофных цианобактерий ферредоксин восстанавливается фотосистемой I на свету и пируват: ферредоксин-оксидоредуктазой в темноте.



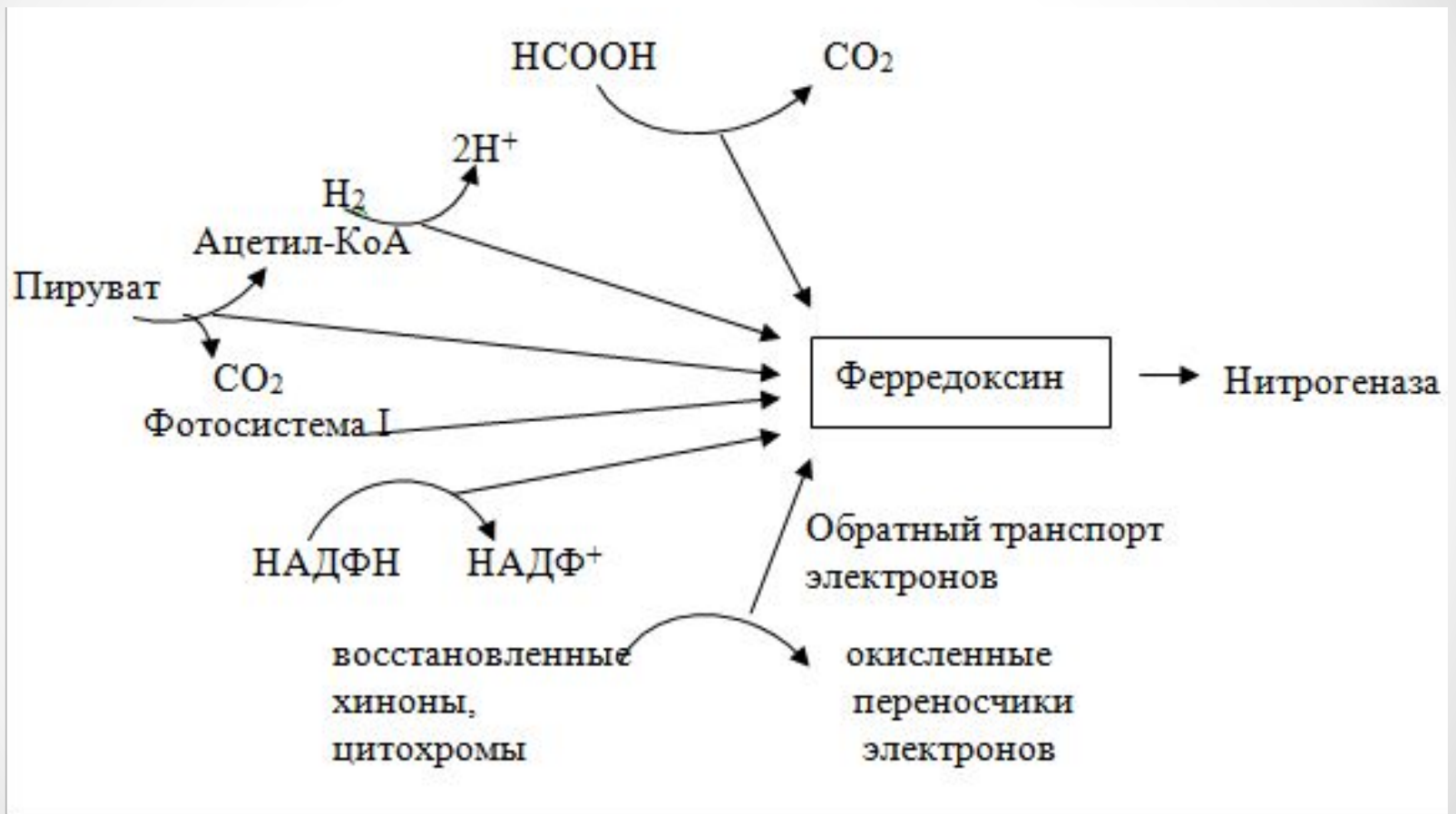
У анаэробных хемотрофов он восстанавливается ферредоксин-зависимыми оксидоредуктазами, такими как пируват: ферредоксин-оксидоредуктаза, гидрогеназа и формиатдегидрогеназа.

У аэробных хемотрофов и аноксигенных фототрофов восстановление ферредоксина происходит при участии НАДФН и ферредоксин: НАДФ⁺-оксидоредуктаз.

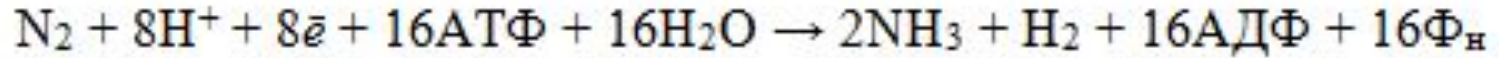
У аэробных хемолитоавтотрофов ферредоксин восстанавливается путем энергозависимого обратного переноса на него электронов от НАДФН.



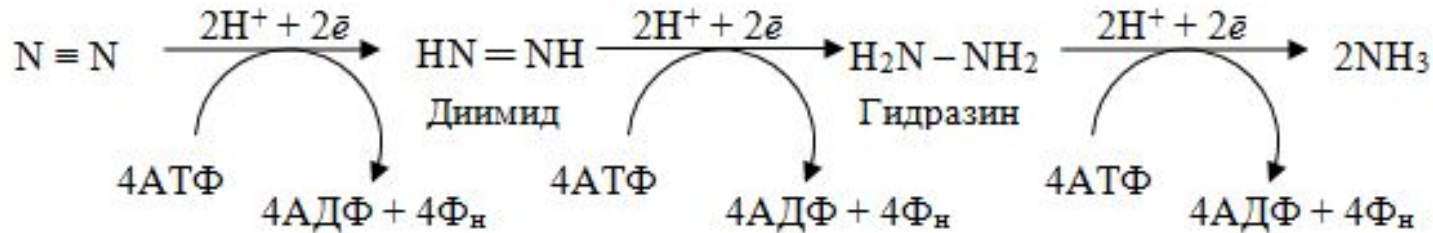
Реакции восстановления ферредоксина как источника водорода для нитрогеназной реакции



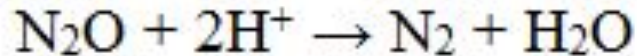
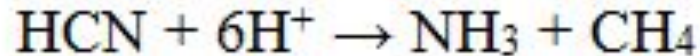
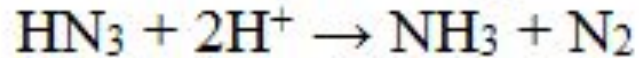
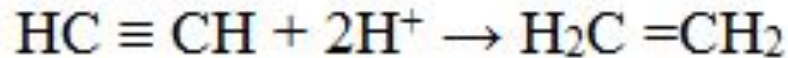
Восстановление одной молекулы N_2 до двух молекул NH_3 описывается следующим уравнением:



Данный процесс осуществляется в три последовательные стадии. Вначале N_2 превращается в диимид ($HN = NH$), затем в гидразин ($H_2N - NH_2$) и, наконец, в NH_3 :



Нитрогеназная система катализирует АТФ-зависимое восстановление не только молекулярного азота, но и ацетилена ($\text{HC} \equiv \text{CH}$), азиды, закиси азота, цианидов, нитритов, изонитрилов и протонов.



Общая схема фиксации азота

