АММОНИФИКАЦИЯ

Процесс разложения органических азотистых соединений (растительных и животных остатков, а также гумуса) гетеротрофными микроорганизмами и превращение их в минеральную форму азота (NH_4) называется аммонификацией.

Бактерии-аммонификаторы используют в качестве источника углерода и энергии аминокислоты, что требует от них соответствующего набора ферментов, катализирующих протеолиз белков и пептидов и дезаминирование всего набора аминокислот.

В эту группу микроорганизмов входят представители родов *Bacillus, Pseudomonas, Micrococcus, Arthrobacter, Mycobacterium, Proteus*. Следует отметить, что аммонификаторы способны использовать широкий набор органических соединений, в том числе сахаров и органических кислот, которые они, как правило, предпочитают белкам.

НИТРИФИКАЦИЯ

Нитрифицирующие бактерии получают энергию за счет окисления восстановленных форм азота (аммиак, азотистая кислота). Впервые определил хемолитоавтотрофную природу этих бактерий и получил их чистые культуры в 1892 г. С. Н. Виноградский. Процесс нитрификации идет в два этапа и осуществляется двумя группами микроорганизмов. Бактерии родов *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosolobus, Nitrosospira* и *Nitrosovibrio* окисляют аммиак до азотистой кислоты:

$$2NH_3^+ + 3O_2 \rightarrow 2HNO_2 + 2H_2O$$

а затем уже бактерии родов *Nitrobacter, Nitrospina* и *Nitrococcus* окисляют нитрит до нитрата:

$$2HNO_2 + O_2 \rightarrow 2HNO_3$$

Нитрит обычно в почве не накапливается, поскольку обе группы микроорганизмов функционируют последовательно. Именно благодаря деятельности этих бактерий в Чили появились огромные запасы натриевой селитры ($NaNO_3$). Следует отметить также, что нитрификаторы окисляют и аммонийный азот удобрений, переводя его в нитратную форму.

ДЕНИТРИФИКАЦИЯ

Содержание доступного растениям азота в почве определяется не только процессами аммонификации, нитрификации, азотфиксации и вымыванием его из почвы, но и потерями его в ходе процесса денитрификации.

Процесс денитрификации осуществляется анаэробными прокариотами, которые способны восстанавливать NO_3 до NO_2 и газообразных форм азота (N O_2, N_2). В наибольшей степени способность к денитрификации распространена у бактерий родов Bacillus и Pseudomonas.

Физиологическое значение этого процесса — способность генерировать АТФ в анаэробных условиях, используя в качестве конечного акцептора электронов в дыхательной цепи не кислород, а нитрат (нитратное дыхание) или нитрит.

Наиболее распространенными формами денитрификаторов являются те, которые способны восстанавливать NO_3 или NO_2 до N_2. Все денитрифицирующие бактерии — факультативные анаэробы, переключающиеся на денитрификацию только в отсутствие O_2.

Поэтому этот процесс особенно активно идет на влажных затопляемых слабоаэрируемых почвах. Потери азотных удобрений в результате денитрификации могут достигать до 80%. Во избежание этих потерь применяют рыхление почвы или различные ингибиторы денитрификации.

АЗОТФИКСАЦИЯ

Способностью к фиксации молекулярного азота обладают исключительно прокариоты. Основная масса азота, содержащегося в живых организмах, своим происхождением обязана деятельности уникальной группы микроорганизмов, которые ассимилируют молекулярный азот атмосферы, восстанавливая его до аммиака.

Микроорганизмы, осуществляющие процесс фиксации молекулярного азота, делятся на свободноживущих азотфиксаторов и живущих в симбиозе с растениями.

Впервые свободноживущие бактерии, способные к азотфиксации в анаэробных условиях, были выделены С. Н. Виноградским в 1893 г. и названы *Clostridium pasteurianum* в честь Луи Пастера (L. Pasteur). Позднее в 1901 г. Мартин Бейеринк (M. Beyerinck) открыл свободноживущие аэробные азотфиксирующие бактерии рода *Azotobacter*. Группа свободноживущих азотфиксаторов включает бактерии родов *Azotobacter, Azospirillum, Beijerinckia, Derxia, Bacillus, Klebsiella*, некоторые штаммы *Clostridium*, цианобактерии родов *Anabaena, Calothrix, Gloeotrichia, Nostoc*, фотосинтезирующие бактерии родов *Chromatium и Rhodospirillum*, археи *Methanococcus*.

КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ

К группе симбиотических азотфиксаторов относятся бактерии родов *Azorhizobium, Bradyrhizobium, Photorhizobium, Rhizobium* и *Sinorhizobium*, образующие клубеньки на корнях бобовых растений, а также некоторые актиномицеты (актинобактерии) и цианобактерии.

Насчитывается более 200 видов небобовых растений, относящихся к родам *Alnus, Coriaria, Myrica, Casuarina, Elaeagnus, Hippophaea, Shepherdia, Ceanothus, Discaria,* которые способны в симбиозе с микроорганизмами фиксировать молекулярный азот. Эти растения представлены главным образом древесными формами (ольха, восковница, лох, облепиха и др.).

Клубеньки, формирующиеся на корнях ольхи и некоторых других небобовых растений, заселены актиномицетами (актинобактериями) рода *Frankia*. Этот тип растительно-бактериального симбиоза, называемый актиноризой, выявлен более чем у 20 родов покрытосеменных растений.

У травянистых растений рода *Gunnera* клубеньки образуются на стеблях цианобак териями рода *Nostoc*. Фиксирующие азот цианобактерии рода *Anabaena* поселяются в полостях листьев водного папоротника *Azoll*а.

КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ

Nod-факторы. Процесс симбиотической азотфиксации идет в клубеньках — специализированных органах растения-хозяина (рис. 6.5).

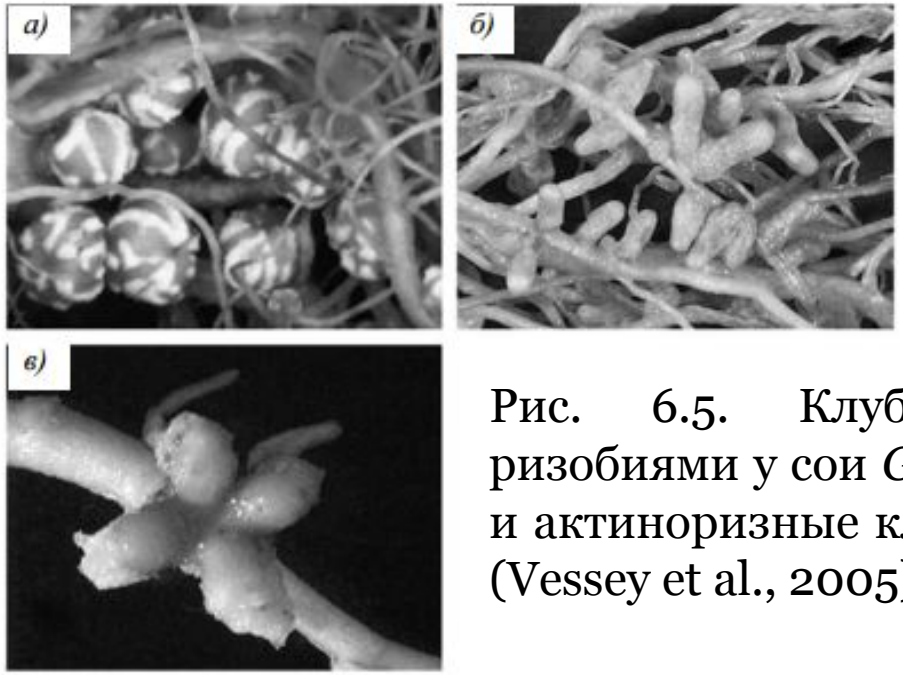


Рис. 6.5. Клубеньки, вызванные инфицированием ризобиями у сои *Glycine max* (а) и гороха *Pisum sativum* (б) и актиноризные клубеньки (в) у датиски *Datisca glomerata* (Vessey et al., 2005)

Формирование клубеньков инициируется сигнальными молекулами липо-олигосахаридной природы — Nod-факторами. Жирные кислоты, входящие в состав Nod-факторов, содержат 16—20 атомов углерода, а количество молекул ацетилглюкозамина составляет 3—5 (рис. 6.6).

КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ

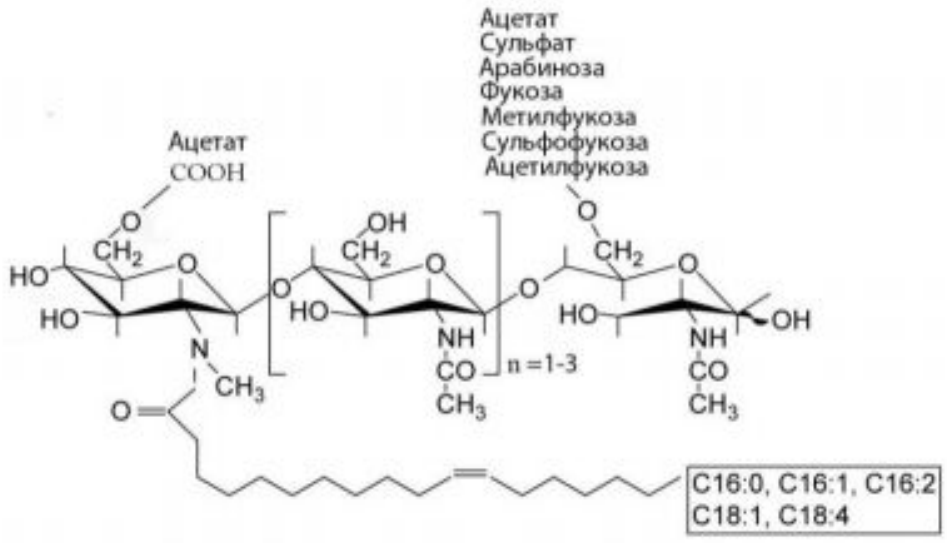


Рис. 6.6. Строение Nod-фактора

Nod-факторы синтезируются клубеньковыми бактериями (ризобиями) в ответ на оп- ределенные виды флавоноидных соединений, выделяемых семена- ми и корнями бобовых растений. Флавоноиды активируют у ризобий гены вирулент- ности, которые называются nod-генами (nodulation — клубенькообразование).

КЛУБЕНЬКОВЫЕ БАКТЕРИИ

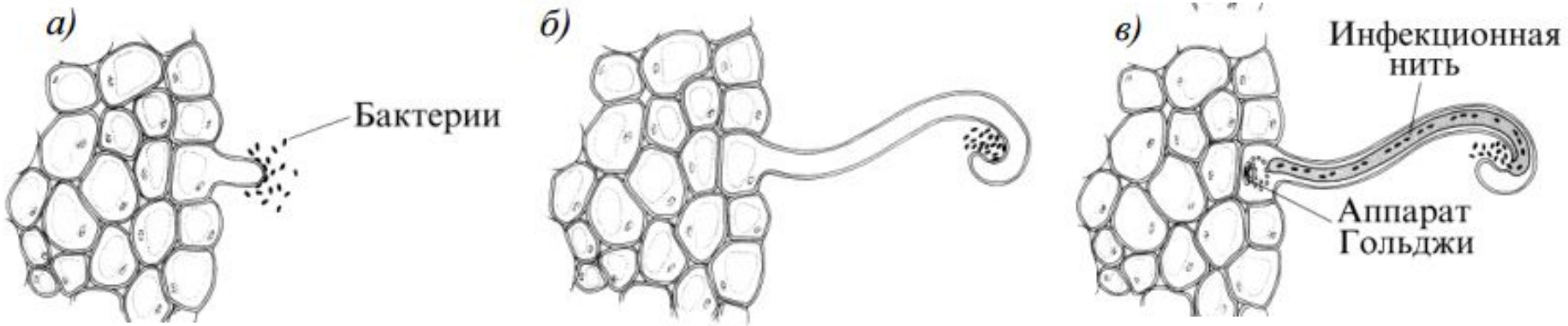
Найдено около 50 nod-генов, мутации в которых нарушают способность ризобий к формированию клубеньков. Большинство nod-генов кодирует синтез ферментов, участвующих в синтезе Nod-факторов. Гены, общие для всех ризобий (nodA, nodB, nodC), кодируют образование ферментов, необходимых для формирования основной структуры (остова) Nod-фактора. Его специфичность определяется строением жирно-кислотной цепи или рядом других замещений, катализируемых ферментами, которые кодируются уже другими генами. Строение Nod-фактора определяет специфичность и характер взаимодействия бактерий с корневой системой растения.

Рецептором Nod-фактора является локализованная в плазмалемме клеток эпидермиса корня рецепторная киназа LysM-RLK (lysin motif receptor-like kinase). После взаимодействия Nod-фактора с рецептором индуцируются два типа процессов:

- инфицирование ризобиями клеток эпидермиса;
- формирование клубеньков в клетках коры корня.

ФОРМИРОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

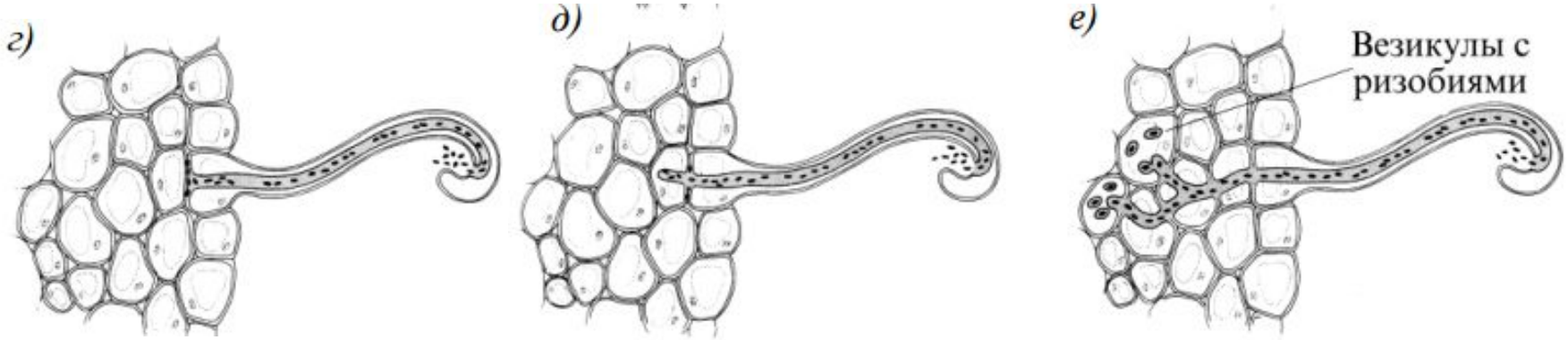
Nod-фактор способствует связыванию ризобий с клетками корневых волосков (рис. 6.7, а), вызывает их искривление (рис. 6.7, б) и локальное разрушение клеточной стенки в месте изгиба (рис. 6.7, в).



В процессе разрушения клеточной стенки участвуют гидролитические ферменты обоих партнеров формирующегося симбиоза. Затем происходит впячивание плазмалеммы в цитоплазму, и бактерии попадают внутрь корневого волоска. Вокруг бактерий за счет секреции пузырьков аппарата Голджи начинает формироваться особая полость, которая называется инфекционной нитью.

Инфекционная нить растет, ветвится, достигает клеток коры корня и вызывает их дедифференцировку (рис. 6.7, г, д). Клетки начинают делиться, формировать ограниченную зону внутри коры, называемую клубеньковым примордием, из которого затем образуется клубенек.

Этот процесс контролируется цитокининами и ауксинами. В этот же период бактерии из инфекционной нити путем эндоцитоза переходят в другие клетки растения-хозяина (рис. 6.7, е). При этом бактерии окружаются так называемой перибактероидной мембраной и превращаются в особые симбиотические формы — бактероиды. Последние имеют другую форму и бо́льшие (в 3— 5 раз) размеры, чем свободноживущие ризобии. Именно в них идет процесс симбиотической азотфиксации. Бактероиды, окруженные перибактероидной мембраной, иногда называют симбиосомами.



ФОРМИРОВАНИЕ КЛУБЕНЬКОВ

По мере развития в клубеньке формируется собственная сосудистая система и очень плотный, "кожистый" слой клеток, который отделяет его от клеток коры корня и обеспечивает внутри него анаэробные условия. Основными структурами клубенька являются: ткани, в клетках которых идет фиксация молекулярного азота бактероидами; проводящие ткани, по которым осуществляется снабжение клубенька фотоассимилятами и отток азотистых соединений; клетки меристемы, обеспечивающие рост клубенька.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Молекула азота N2 (N ≡ N) чрезвычайно прочна и химически инертна. Тем не менее большая группа микроорганизмов обладает способностью ассимилировать молекулярный азот путем восстановления его до аммиака с помощью фермента нитрогеназы. Процесс редукции N2 до NH3 нитрогеназой, осуществляемый за счет переноса 6 электро- нов, сопряжен с восстановлением H до H2 . Суммарно эти реакции можно запи- сать следующим образом:

$$N_2 + 8e^- + 8H^+ + 16\text{Mg-АТФ} \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16\text{Mg-АДФ} + 16Ф_н$$

В состав нитрогеназного комплекса входят два компонента — Fe-белок и Mo-Fe-белок. Азотфиксирующей способностью обладает только комплекс обоих компонентов (рис. 6.8). Fe-белок состоит из двух субъединиц, каждая из которых (в зависимости от организма-азотфиксатора) имеет молекулярную массу от 30 до 72 кДа. Fe-белок содержит один железосерный кластер (Fe4S4), который очень чувствителен к кислороду. Mo-Fe-белок имеет 4 субъединицы общей молекулярной массой от 180 до 235 кДа. Два атома молибдена связаны в двух Mo-Fe-S-кластерах. Этот белок так- же содержит несколько железосерных кластеров и инактивируется кислородом.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

В реакциях, связанных с восстановлением азота, принимают участие ферредоксин и флаводоксин, которые служат донором электронов в процессе восстановления Fe-белка нитрогеназы (рис. 6.8). На следующем этапе с Fe-белком связывается АТФ. Далее происходит гидролиз АТФ, инициирующий конформационные изменения Fe-белка, который приобретает способность восстанавливать Mo-Fe-белок. На заключительном этапе электроны через Mo-Fe-S-кластеры поступают на N2 и восстанавливают его до NH3 .

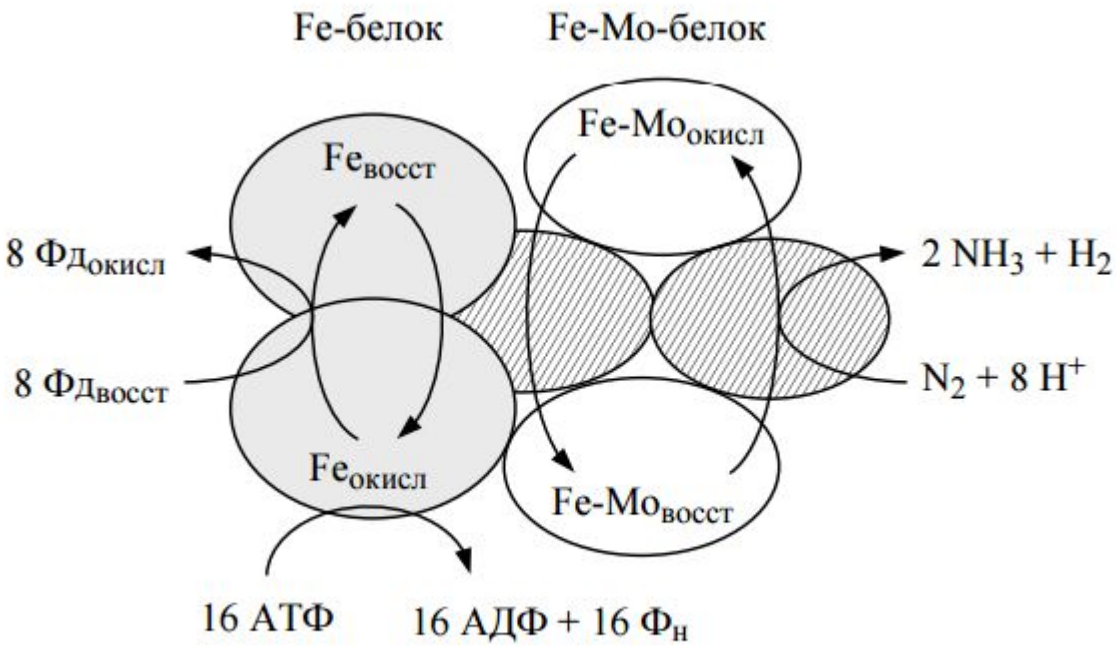


Рис. 6.8. Схематическое строение и процессы, катализируемые нитрогеназой

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Поскольку нитрогеназа разрушается в присутствии кислорода, у азотфиксирующих микроорганизмов имеется ряд механизмов ее защиты. У ризобий эту функцию вы- полняет кислородсвязывающий гемопротеид леггемоглобин (легоглобин), придаю-щий клубенькам розовую окраску. Леггемоглобин присутствует в цитоплазме кле- ток клубенька в очень высокой концентрации (0,7 мМ в клубеньках сои). Белок глобин синтезируется в клетках растения-хозяина, а гем — в клетках, содержащих бактероиды.

Леггемоглобин обладает очень высоким сродством к кислороду, его полунасыще- ние наступает уже при 10—20 нМ O_2 , в то время как у гемоглобина крови оно на- блюдается при 126 нМ O_2 . Этот белок обеспечивает транспорт O_2 к бактероидам и защищает таким образом нитрогеназу от разрушения.

В бактероидах функционирует цикл Кребса, который не только снабжает (через ферредоксин) нитрогеназу электронами, но также поставляет дыхательные суб- страты для синтеза АТФ и снабжает бактероиды кетокислотами (2-оксоглутаровой и др.), которые взаимодействуют с аммиаком и образуют аминокислоты, транспор- тируемые в надземную часть растения. Основными транспортными формами азота у большинства бобовых растений являются глутамин, аспарагин и уреиды — аллантоин, аллантоиновая кислота и цитруллин.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Расчеты показывают, что на связывание 1 г молекулярного азота растение затрачивает до 12 г углерода органических соединений. При этом необходимо учитывать, что эффективность азотфиксации снижается за счет того, что до 30—60% энергии может расходоваться (и теряться) на процесс восстановления H до H_2, поскольку протоны конкурируют с молекулярным азотом за электроны, поступающие в каталитический центр фермента.

Однако некоторые ризобии имеют фермент гидро- геназу, который, расщепляя H_2, может поставлять электроны для редукции мо- лекулярного азота. Эффективность использования энергетических субстратов у азотфиксаторов-симбионтов выше, чем у свободноживущих микроорганизмов, поскольку, например, Azotobacter для восстановления 1 г N_2 использует до 28— 40 г углерода органических соединений.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Нитрат, попадая в растение, восстанавливается до аммония, который затем включается в аминокислоты. Процесс редукции нитрата в растениях осуществляется в два этапа. На первом этапе происходит восстановление нитрата до нитрита, со- пряженное с переносом двух электронов и катализируемое ферментом нитратредуктазой:

$$NO_3^- + НАД(Ф)H + H^+ \xrightarrow{2e^-} NO_2^- + НАД(Ф)^+ + H_2O$$

Нитратредуктаза высших растений является димером, который состоит из двух идентичных субъединиц с молекулярной массой 100 кДа. Каждая белковая субъединица включает молибденовый кофактор (МоСо), молекулы гема и ФАД (рис. 6.9).

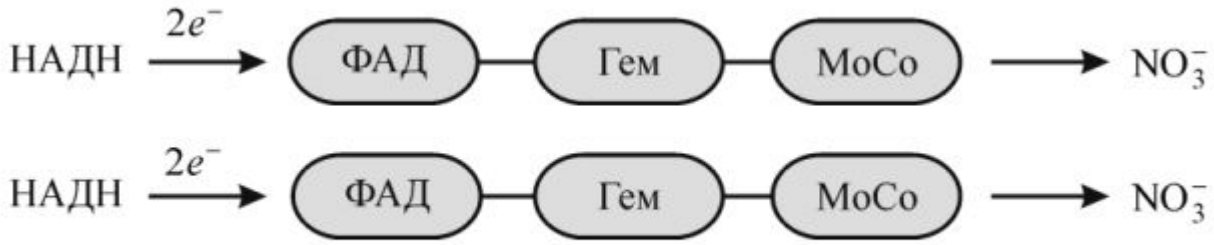


Рис. 6.9. Димер нитратредуктазы

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Молибден включается в фермент в виде комплекса (хелата) с соединением, называемым птерином (см. рис. 6.4). В процессе восстановления нитрата электроны от НАДФ передаются на ФАД-содержащий домен, а затем через гем-содержащий домен поступают на молибденовый комплекс фермента и далее на нитрат. В каждой из субъединиц имеет место двухэлектронный перенос.

Редукция нитрата непосред- ственно идет на Мо-содержащем комплексе фермента. Нитрит — очень активный и токсичный ион, поэтому в растениях он быстро вос- станавливается до аммония нитритредуктазой. Нитритредуктаза состоит (рис. 6.10) из полипептида с молекулярной массой 63 кДа и включает три домена: ферредоксин-связывающий, содержащий железосерный кластер (Fe S4 4) и сирогем (рис. 6.11).

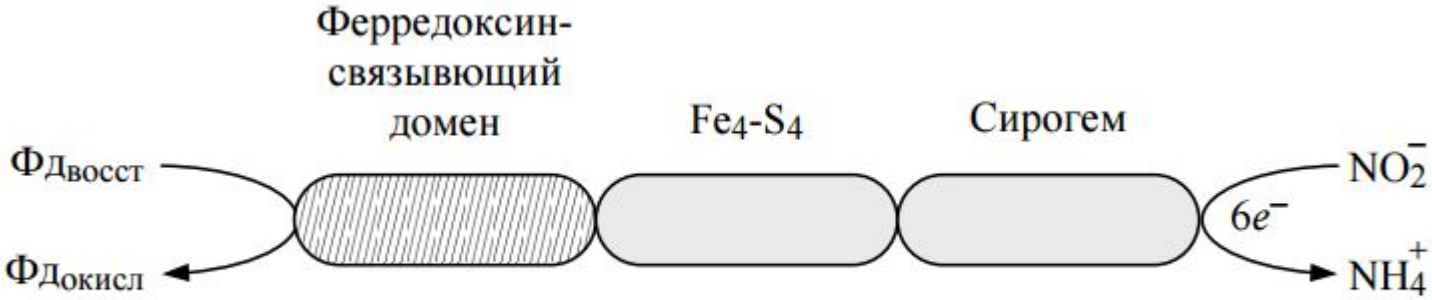


Рис. 6.10. Нитратредуктаза

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

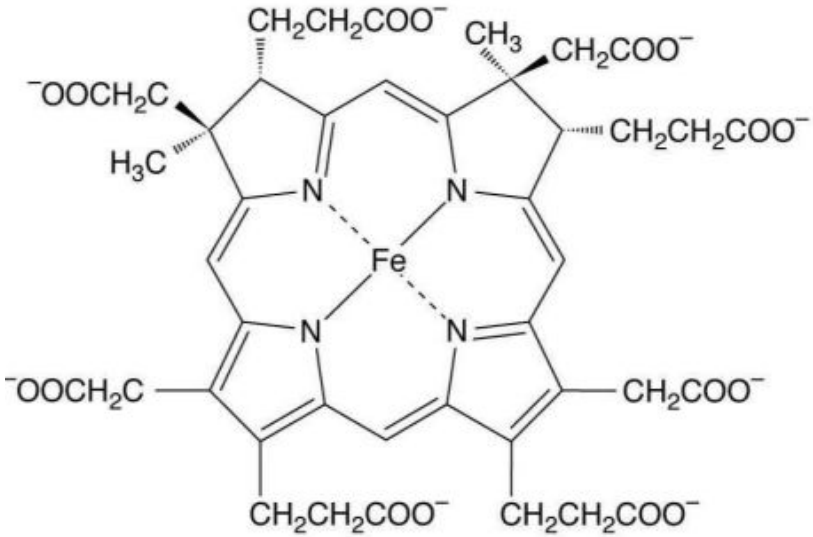


Рис. 6.11. Сирогем

Следует отметить, что железосерный кластер (Fe4S4) нитритредуктазы принимает участие не только в восстановлении нитрита, но и в процессе редукции сульфата. Несмотря на то, что листья и корни содержат разные формы этого фермента, процесс редукции нитрита в них идет однотипно согласно уравнению:

$$NO_2^- + 6Ф\text{д}_{восст} + 8H^+ \xrightarrow{6e^-} NH_4^+ + 6Ф\text{д}_{окисл} + 2H_2O$$

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ МЕХАНИЗМ АЗОТФИКСАЦИИ

Нитритредуктаза осуществляет перенос шести электронов от 6 молекул восстановленной формы ферредоксина (Фдвосст) на нитрит с образованием аммиака. Восста- новление ферредоксина в листьях происходит за счет фотосинтетического транс- порта электронов, а в гетеротрофных тканях — за счет окисления НАДФН, синтезируемого в пентозофосфатном пути окисления глюкозы. Анализ кинетики процесса восстановления нитрита показывает, что пара переносчиков электронов Fe_4S_4 гем (работающая в сопряженном режиме) связывает нит-рит на ферменте и восстанавливает его сразу до аммония. Поэтому превращение NO_2 NH_4 происходит без образования (накопления) каких-либо промежуточ- ных продуктов во внешней среде.

Нитритредуктаза листьев кодируется ядерным геномом, синтезируется в цитоплазме, транспортируется в хлоропласт, где осуществляется окончательная сборка фермента. Нитрат, свет и сахароза активируют процесс транскрипции нитритредуктазных мРНК, а аспарагин и глутамин подавляют этот процесс.

Следует отметить, что ассимиляция нитрата может успешно идти как в побегах, так и в корнях растения. Если нитрата мало, он ассимилируется в корнях. Когда ионов NO_3 много, они поступают в листья, где восстанавливаются до аммония.