

Фиксация молекулярного азота

Чтобы разорвать прочную тройную связь в молекуле N_2 , нужны либо высокие давление и температура, либо невероятно эффективный катализатор. По первому пути пошла химическая промышленность, производящая аммиак из азота воздуха при помощи чрезвычайно энергоемкого процесса Габера — Боша (при температуре 400— 500 °С и давлении 200—1000 атм).

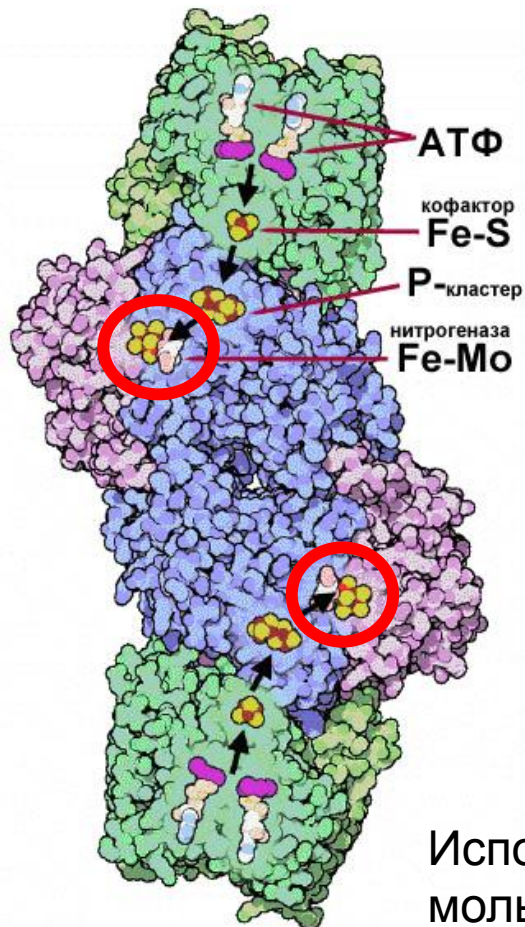


По имеющимся оценкам, сегодня около половины всего азота, входящего в состав человеческих тел, — это азот, зафиксированный при помощи процесса Габера-Боша (и попавший сначала в азотные удобрения, синтезируемые из аммиака, а затем в культурные растения).

Клетки прокариот проводят процесс азотфиксации в обычных условиях.

Фиксацию молекулярного азота осуществляют некоторые виды цианобактерий, способные синтезировать ферментный комплекс нитрогеназу (Nif гены)

Комплекс состоит из двух ферментов: собственно нитрогеназы (называемой также Mo-Fe-белком или динитрогеназой) и дегидрогеназы (ди)нитрогеназы (Fe-белок).



Железо-молибденовый кофактор (сокращенно FeMoco) — самый большой и сложный из известных на сегодняшний день биологических катализаторов на основе металлов.

Этот шедевр биологических нанотехнологий изготавливается специальными ферментами (Nif гены) и прикрепляется к белковой основе нитрогеназы.

Именно железо-молибденовый кофактор играет ключевую роль в процессе азотфиксации: к нему присоединяется молекула азота, и здесь же происходит ее расщепление

Используется энергия АТФ (12 – 15 молекул АТФ на моль фиксированного азота)

Нитрогеназа (по структуре – консервативный фермент) крайне чувствительна к молекулярному O_2 , и даже малые количества O_2 подавляют активность фермента.

Ранее считалось, что чувствительность нитрогеназного комплекса к кислороду обусловлена тем, что он возник до кислородного фотосинтеза

Новые данные (на основе молекулярно-генетических методов):

Процесс азотфиксации «стартовал» по крайней мере 3–3,5 млрд лет назад, но эффективная система, основанная на работе железо-молибденового каталитического комплекса, образовалась существенно позже — 1,5–2,2 млрд лет назад, то есть после оксигенизации планетарной среды.

Это событие изначально произошло в группе гидрогенотрофных метаногенов (архебактерий), обитавших в особых бескислородных нишах на большой глубине

У современных азотфиксирующих фотоавтотрофных цианобактерий кислородный (с выделением кислорода) фотосинтез и азотфиксация возможны только в случае **пространственного** и/или **временного разделения** этих двух процессов.

Пространственное разделение.

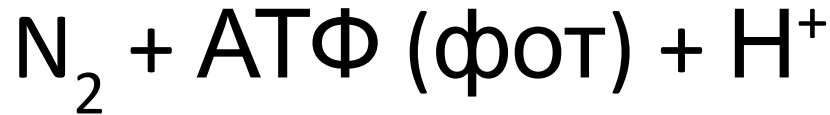
У большинства пресноводных цианобактерий, образующих гетероцисты.

В колонии гетероцисты располагаются между вегетативными клетками.

Гетероцисты – результат клеточной дифференциации.
Деактивация ФС2: хл-белковые комплексы и компоненты ФС2 разрушаются (активность ФС1 сохраняется);
экспрессия генов, кодирующих нитрогеназный комплекс;

Улавливание световой энергии ФС1 → циклический поток электронов вокруг ФС1 → образование АТФ → расходование АТФ на азотфиксацию.

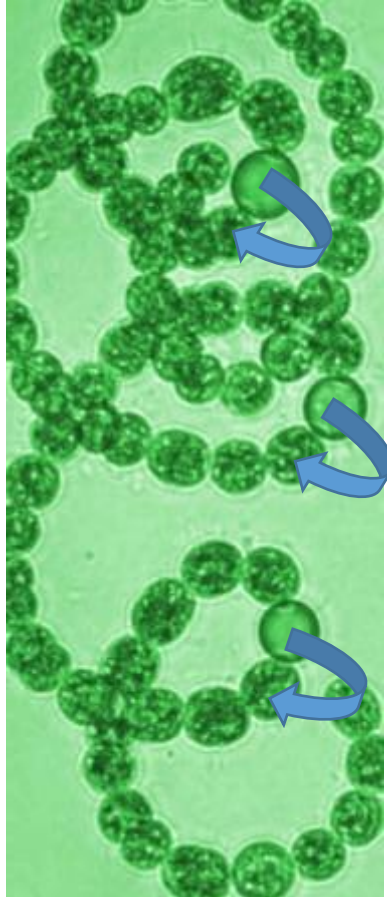
Нитрогеназа использует энергию **фотосинтетически генерированной АТФ**



(ферредоксин) + углеродный скелет

→ **глутамат**

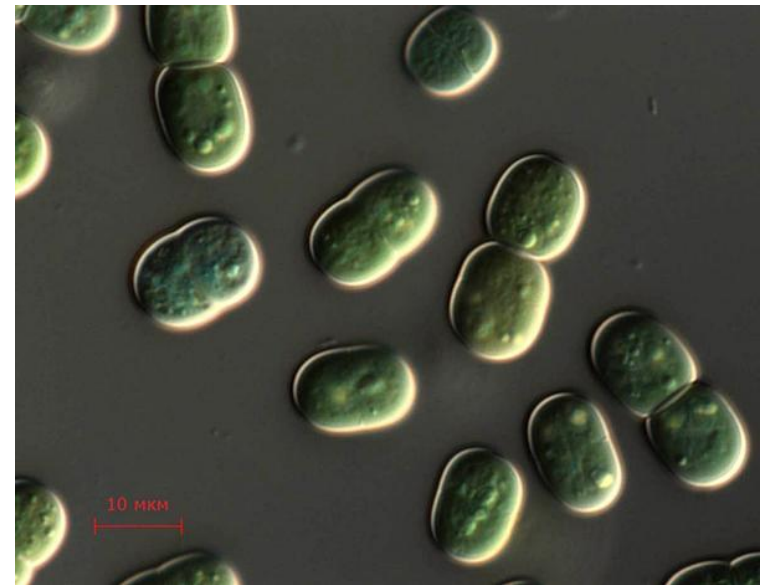
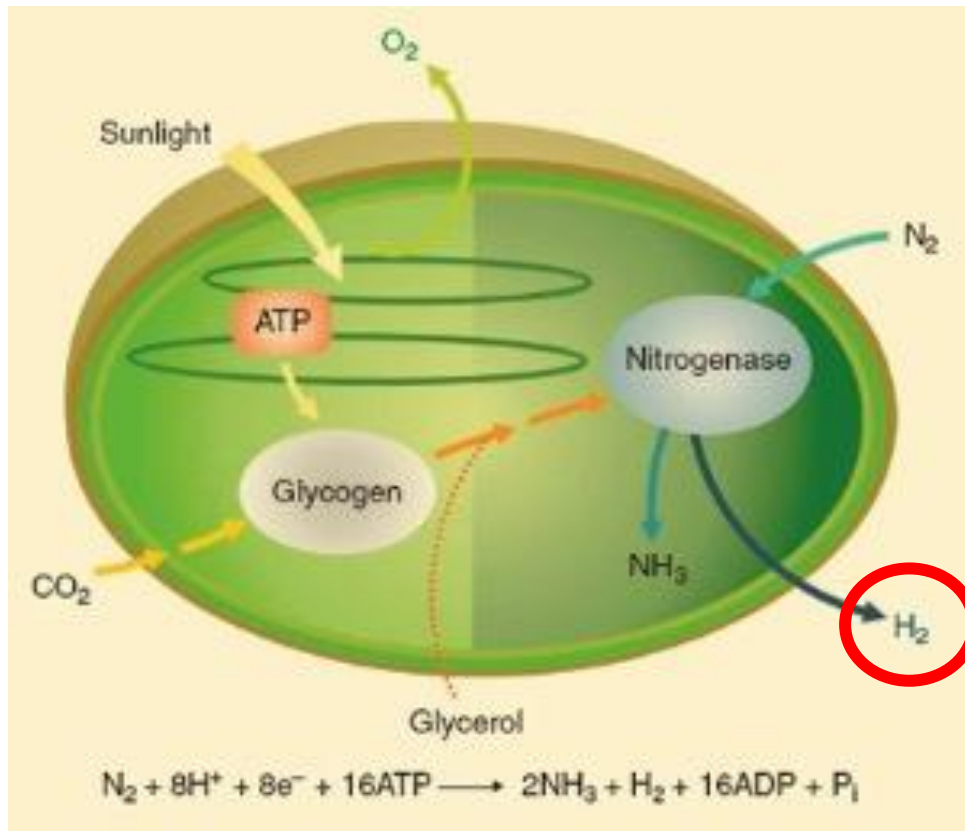
Глутамат поступает в соседние фотосинтетические клетки и используется для синтеза других аминокислот



Временное разделение. У ряда цианобактерий, не образующих гетероцисты, фотосинтез протекает в присутствии света (днем), азотфиксация – в отсутствие света (ночью).

Нитрогеназа работает за счет энергии АТФ, образованной в дыхательной элетронтранспортной цепи. Катаболизму подвергаются продукты фотосинтеза.

«Соблюдение режима дня»



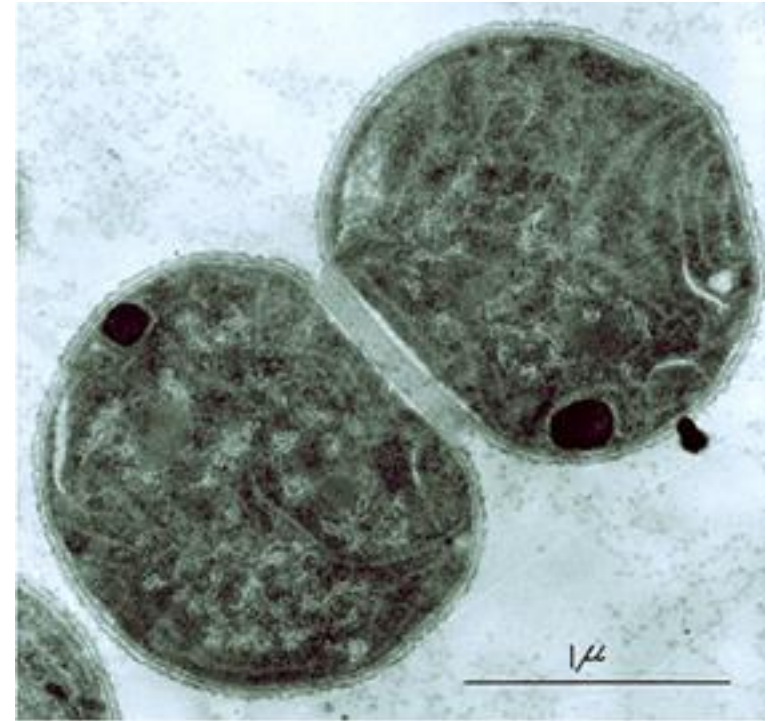
Cyanosphaera 51142

«Знаменита» тем, что выделяет большое количество водорода

Crocosphaera watsonii

Фиксирует азот
НОЧЬЮ.

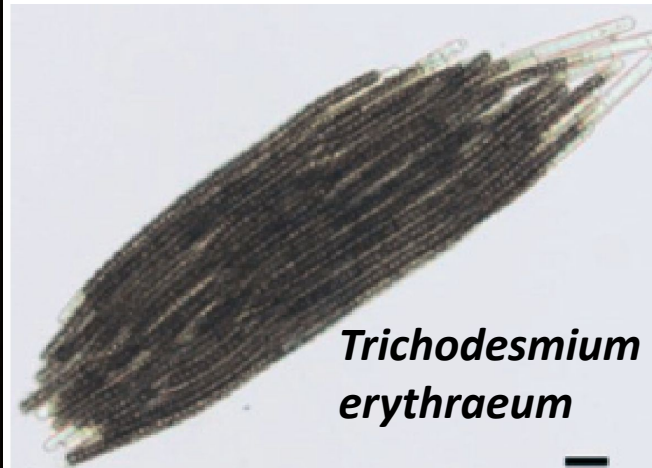
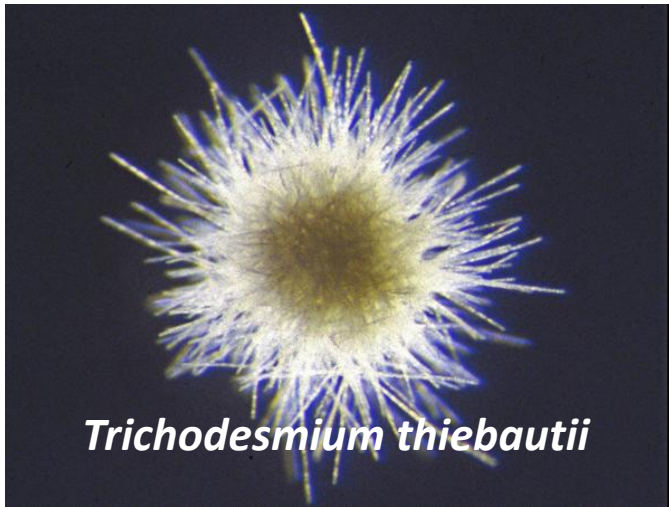
Диаметр клетки 2.5-6 мкм.
Вегетирует в теплых водах (> 24 °C). В олиготрофных водах тропической зоны Атлантического и Тихого океанов в фотической зоне достигает численности порядка 1 млн кл/мл. Высокая скорость роста.



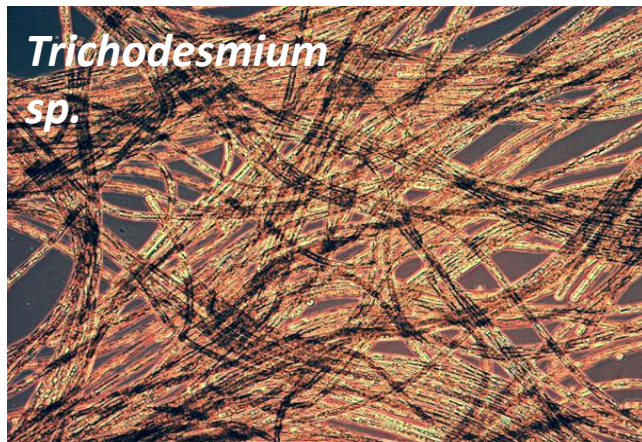
Crocosphaera дает значительный вклад в бюджет азота в тропических водах

Trichodesmium spp.

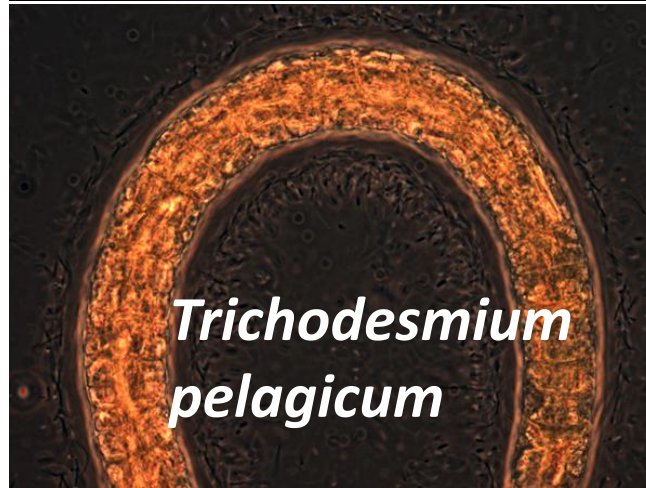
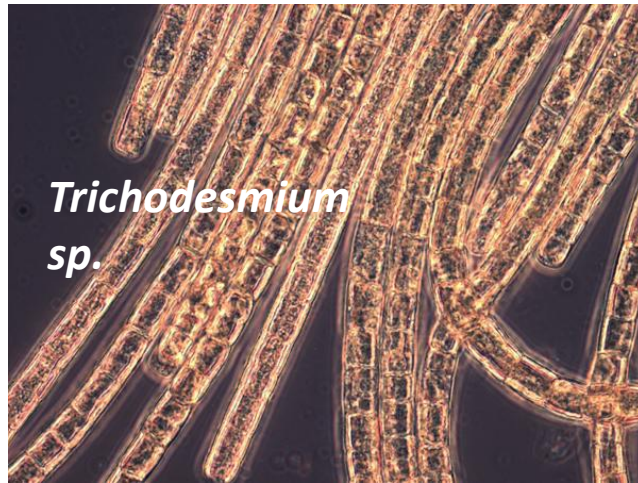
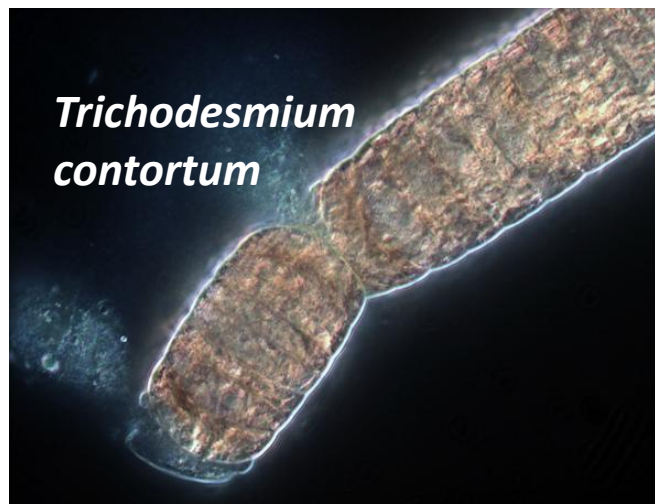
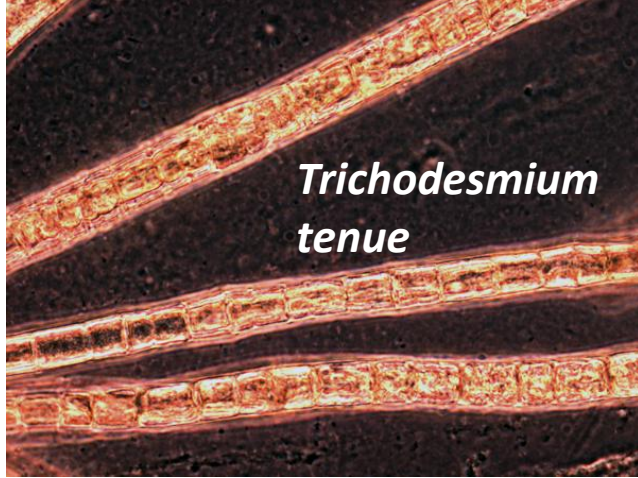
Цианобактерии *Trichodesmium* фиксируют азот **ТОЛЬКО** на свету и при этом у них **НЕТ** гетероцист



Trichodesmium – наиболее распространенная азотфиксирующая цианобактерия в морских экосистемах, часто формирует цветения



Колонии – сферические, «сноповидные», встречаются и одиночные трихомы. В колонии 200 и более трихомов.



До 80 % клеточного
объема могут занимать
газовые вакуоли.



Как экспрессия Nif генов, так и активность нитрогеназного комплекса у блокируются

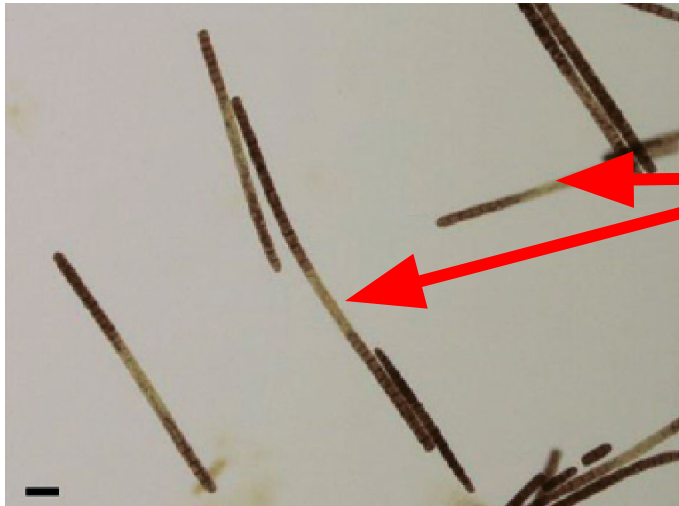
кислородом. Как же обустраивается защита нитрогеназ от фотосинтетически выделяемого кислорода у *Trichodesmium*?

??

По сути, у *Trichodesmium* есть и пространственное, и временное разделение процессов фиксации азота и фотосинтеза

в фотосинтеза «светлых» участков, состоящих из клеток (2 – 30 клеток), практически не содержащих гранул (более прозрачных – «светлых»).

На трихом – 1-4 «светлые» зоны. «Светлые» клетки названы **диазоцитами**



диазоциты

Низкое число и меньший размер клеточных структур, таких как цианофициевые гранулы, газовые вакуоли, полифосфатные гранулы (из-за этого и большая прозрачность диазоцит)

Трихомы, фиксированные р-ром Люголя

Разделение азотфиксации и фотосинтеза в пространстве у *Trichodesmium*

Фиксация азота идет
ТОЛЬКО в диазоцитах

Число диазоцитов отрицательно коррелирует с присутствием связанного азота (минерального и органического). В отсутствие связанного азота диазоциты формируются в течение 8 – 27 час.

Формирование диазоцитов начинается с трансформации клеточных структур, только потом происходит экспрессия нитрогеназного комплекса

Фиксированный азот быстро распространяется по «обычным» клеткам трихома (результаты экспериментов с меченым азотом).

Расчеты на модели предсказывают, что при пространственном разделении процессов фиксации азота и фотосинтеза продукция выше, чем при разделении во времени



Окраска специфическим красителем Nif белков

Разделение азотфиксации и фотосинтеза во времени у *Trichodesmium*

Суточный ритм регулирует транскрипцию *nif* генов, синтез *de novo* одних субъединиц нитрогеназного комплекса, пост-трансляционную модификацию других белков, а также фотосинтез для обеспечения энергией и восстановителем, необходимых для азотфиксации

Число диазоцитов мало на рассвете и увеличивается к полудню

Азотфиксация идет во время полуденной депрессии фотосинтеза, когда фотосинтетическое выделение кислорода крайне низкое (фотоингибирование) и возрастает интенсивность кислород потребляющих процессов – дыхания и реакции Мелера

Реакция Мелера - восстановленный ферредоксин может окисляться не НАДФ⁺, а кислородом. Такой нециклический транспорт электронов от молекулы воды на O₂ называют псевдоциклическим транспортом. Псевдоциклический транспорт электронов приводит к восстановлению кислорода (образованного при окислении воды) с образованием перекиси водорода H₂O₂. При этом идет образование АТФ

Также происходит изменение равновесного состояния –
(псевдоциклическое фотофосфорилирование)
передача энергии возбуждения фикобилисомами на ФС1

За счет изменения равновесного состояния с типа 1 на тип 2 переключение с фотосинтетического статуса клеток на азотфиксирующий статус происходит очень быстро, что является преимуществом при жизни в водной среде (перемешивание, изменение светового режима)

Способность к фиксации CO_2 также снижается в диазоцитах *Trichodesmium* во время полуденной депрессии, при этом возрастает деградация клеточных запасов углеводов (гликогена)

В целом метаболизм диазоцитов переключается на катаболические реакции: повышается активность ферментов катаболизма, снижается активность ферментов синтеза углеводов, белков, жиров

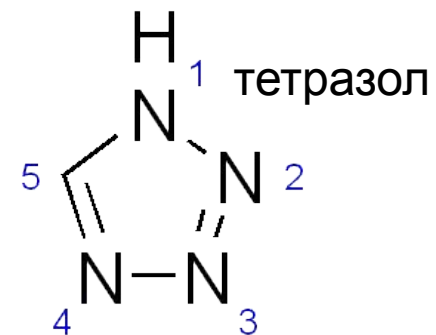
Повышается содержание ферментов, участвующих в образовании восстановителя в пентозофосфатном шунте

Все это ведет к снижению содержания кислорода, т.е. к «микро» кислородным условиям в диазоцитах во время полуденной депрессии

Клеточное деление и формирование диазоцитов приурочено к темновому периоду (ночь)

Механизмы предотвращения блокировки нитрогеназ фотосинтетически выделяемым кислородом, ПРЕДПОЛОЖИТЕЛЬНО, также включают:

Формирование в диазоцитах восстановленных зон за счет скопления солей тетразола



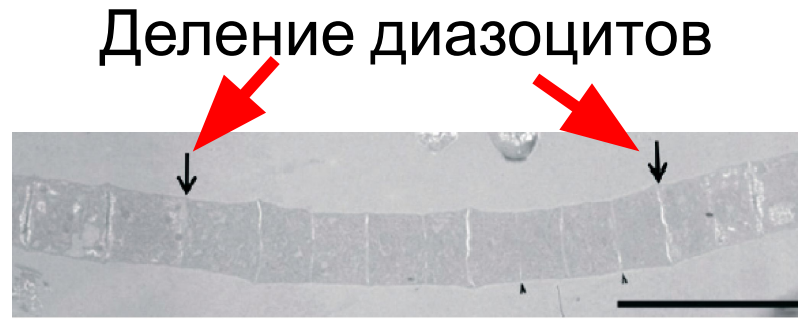
Наличие в диазоцитах особых каротиноидов, обладающих сильной антиокислительной способностью



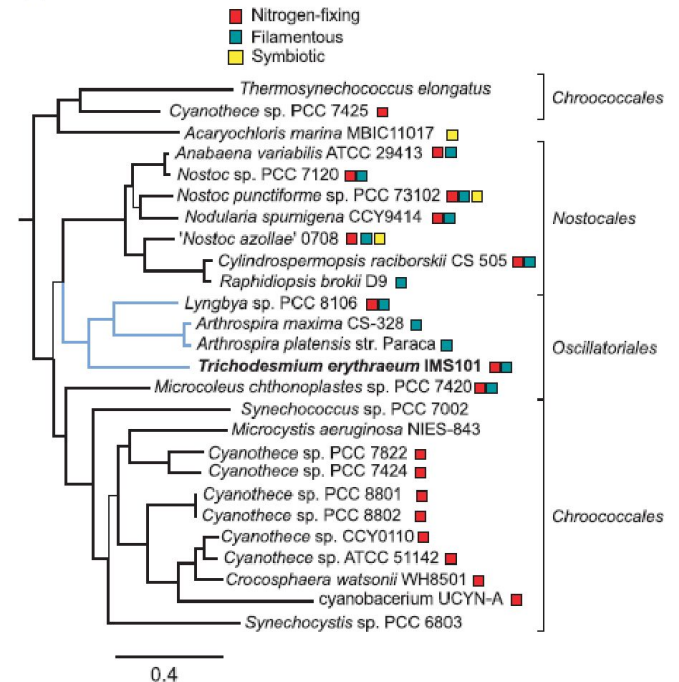
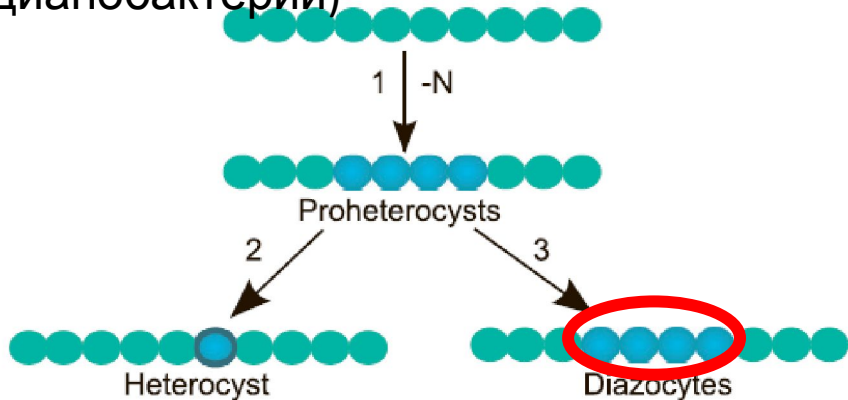
Диазоцит

Диазоциты НЕ являются полностью дифференцированными клетками (в отличие от гетероцист).

У них сохраняется способность к делению. Это также является преимуществом при жизни в водной среде (перемещение, изменение светового режима, содержание связанного азота в среде), поскольку дает возможность более быстро и «легко» приспосабливаться к изменениям условий среды.



Гипотетический сценарий эволюционного образования диазоцитов (предложен на основе результатов расшифровки геномов цианобактерий)



Дальнейшая ассимиляция глутамата, образованного при азотфиксации, происходит в глутаминсинтетазо - глутамин оксоглутарат аминотрансферазном (ГС-ГОГАТ) метаболитном цикле

Наличие внешних источников азота снижает экспрессию *nif* генов, синтез компонентов нитрогеназного комплекса, активность нитрогеназного комплекса и количество diazocytov в трихомах

Trichodesmium

Но в отличие от многих азотфиксирующих цианобактерий, полного подавления активности нитрогеназного комплекса НЕ происходит.

Trichodesmium способен фиксировать молекулярный азот в присутствии низкой концентрации растворенного органического и неорганического азота.

Эта способность еще раз свидетельствует о высокой «гибкости» и приспособляемости метаболизма *Trichodesmium*

Основными биогенными элементами, ограничивающими рост и азотфиксацию у *Trichodesmium*, являются фосфор и железо

Для потребления фосфатов колонии *Trichodesmium* мигрируют – опускаются ниже пикноклина (зарегистрированы вертикальные миграции до глубины 100 – 200 м).

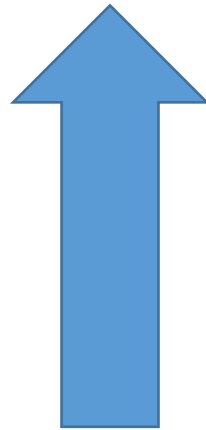


Поверхностный слой: азотфиксация и фотосинтез, запасание углеводов (гликоген) и азота (цианофициевые гранулы) → накопление «балласта»

При
фосфорном
лимитировани
и



Потребление фосфатов. Для жизнедеятельности - использование запасных веществ «балласта»



Когда весь «балласт» метаболизируется, легкие колонии поднимаются в верхние слои для фотосинтеза и азотфиксации

Цианофициевые??
гранулы

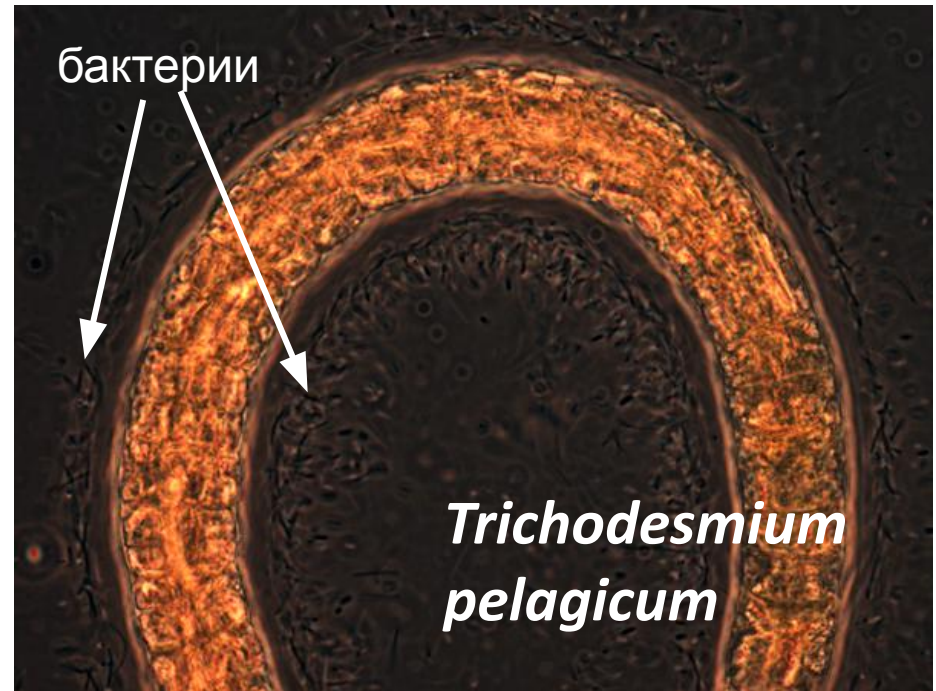
состоят из полипептида, содержащего аргинин и аспарагиновую кислоту в эквимольных количествах, служат резервом азота

Дополнительные механизмы покрытия потребностей в фосфоре при фосфорном лимитировании у *Trichodesmium*

Мембраны - замена фосфолипидов на мембранные белки, НЕ содержащие фосфор

Ассимиляция органического фосфора – за счет щелочных фосфатаз (у *Trichodesmium thiebautii* ген, кодирующий щелочную фосфатазу НЕ найден)

Выработка фосфатаз колонией *Trichodesmium* в целом может быть усилена сигналом (биологически активные вещества лактоны) «чувство кворума» (Quorum sensing), вырабатываемых ассоциированными с колониями микроорганизмами



Потребление фосфатов идет как во время фотосинтеза и азотфиксации, так и в их отсутствие (на глубине)

Потребленный фосфор может запасаться в виде полифосфатных гранул

Обеспечение потребностей в железе у *Trichodesmium*

В клетках *Trichodesmium* высокое содержание Fe. Учитывая, что массовое развитие наблюдается в олиготрофных водах с низкой концентрацией железа, предполагают высокую способность *Trichodesmium* к потреблению и клеточному «удержанию» этого биогенного элемента

Но! В настоящее время гены, кодирующие сидерофоры, у *Trichodesmium* НЕ обнаружены. Однако выявлены гены, кодирующие транспортные белки, вводящие в клетку связанное сидерофорами железо, а также ферменты, участвующие в процессах запасания железа в клетках

Полагают, что сидерофоры синтезируются ассоциированными бактериями, что способствует потреблению железа *Trichodesmium*. С другой стороны показано, что железо, связанное сидерофорами бактерий, самими же бактериями и утилизируется

Возможно, сам колониальный образ жизни *Trichodesmium* способствует его обеспечению железом. В скоплении трихомов задерживается и накапливается «грязь» (dust), богатая железом

Сидерофоры - выделяемые микроорганизмами вещества, переводящие железо в растворимую форму и связывающие его для дальнейшего переноса внутрь клетки



Лимитирование недостатком железа ведет к снижению числа диазоцитов и скорости азотфиксации

А вот фотосинтетическая активность продолжает сохраняться!

Замена ферредоксина на флаводоксин, не содержащий железа (предложено использовать флаводоксин в качестве маркера недостатка железа)

Но это под вопросом, поскольку экспрессия гена, кодирующего флаводоксин, регулируется также степенью обеспеченности азотом

Экосистемная роль *Trichodesmium*

Пределы температурной толерантности для роста и азотфиксации у *Trichodesmium*: 20 – 34 °C, оптимальная температура 24 – 30 °C, в зависимости от вида

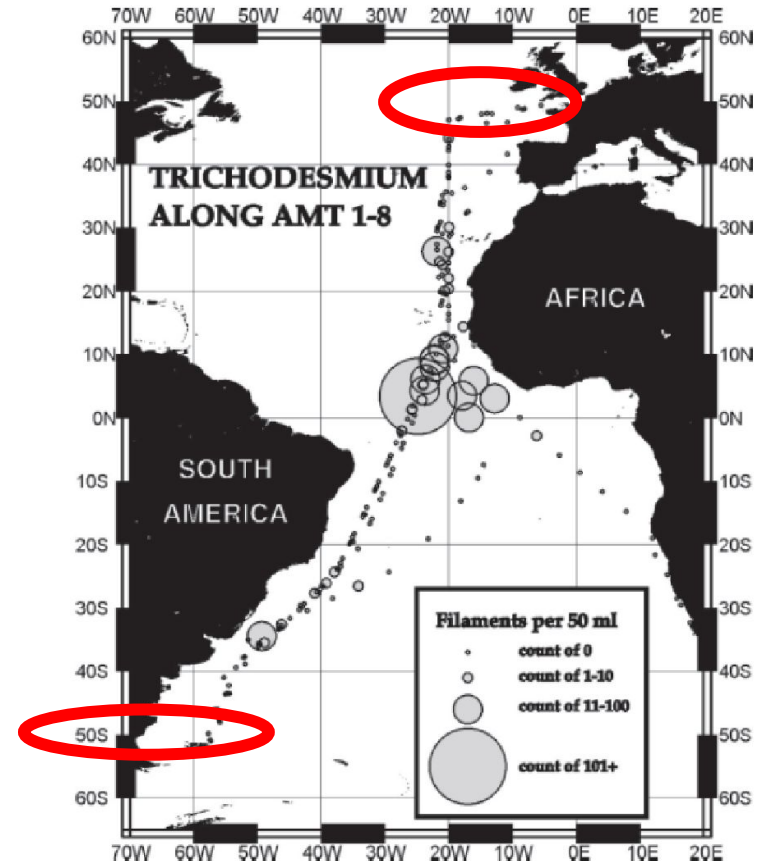
НО! *Trichodesmium*-подобные цианобактерии (nif гены) недавно обнаружены в Арктике – более широкие пределы толерантности?

Trichodesmium также способен выживать при длительном периоде отсутствия света

Согласно спутниковым и экспедиционным данным распределение ограничено приблизительно:

50°S и 50°N в Атлантическом и Индийском океанах
и 20°S и 20°N в западной части Тихого океана

В этих районах *Trichodesmium* формирует мощные цветения



Цветение *Trichodesmium*.
Большой барьерный риф
побережья Австралии.
Снимок NASA



Массовое развитие в
олиготрофных теплых водах
Атлантического, Тихого и
Индийского океанов

Протяженность акватории, охваченной
цветением *Trichodesmium*, может достигать
100 000 км² (отмечено в Аравийском море)

Число колоний при цветении может
достигать 11 000/м³ с числом трихомов до
200 в одной колонии

Цветение *Trichodesmium*.
Красное море
Снимок NASA



Рекорд: Индийский океан, поверхность - 17
000 трихомов в 1 л объема колонии

Экосистемная роль *Trichodesmium*

Скорость азотфиксации примерно 1,1 пМ азота/(трихом ч)

Масштаб поступления азота в воды Мирового океана в результате азотфиксации *Trichodesmium* оценивается для Мирового океана в **60-80 $\cdot 10^{12}$ г N/год** (суммарно азотфиксация в водных экосистемах оценивается в 100 – 200 $\cdot 10^{12}$ г N/год).

Для цветений *Trichodesmium* характерно как **прижизненное** выделение значительного количества органического вещества, так и при отмирании клеток (окончание цветения)

По невыясненным до сих пор причинам (поражение вирусами??), цветения подвержены внезапному отмиранию *Trichodesmium*. Мертвые клетки разрушаются, обогащая воду органическим веществом, азотом и другими биогенными элементами.

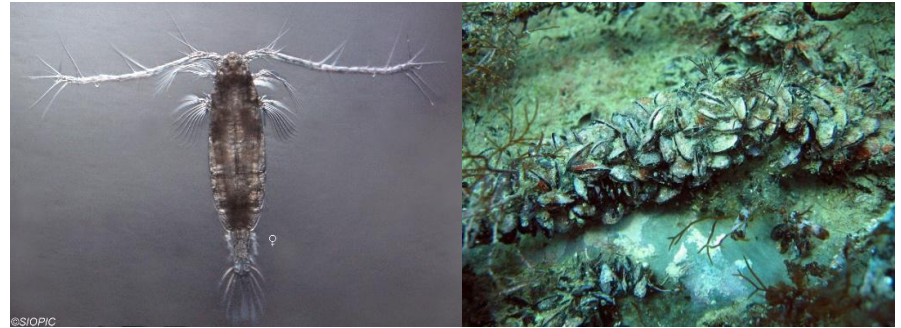
Такое «отмирающее цветение» действует как «сброс удобрений», стимулируя развитие водорослей, неспособных к азотфиксации, а также гетеротрофной биоты

Помимо этого, азот, фиксированный *Trichodesmium*, может поступать в пищевую цепь в результате выедания *Trichodesmium* оболочниками, копеподами и рыбами.

Согласно данным изотопного анализа, азот, фиксированный в процессе азотфиксации водорослями, является основным источником азота для зоопланктона в Северной Атлантике

Это довольно НЕОЖИДАННЫЙ результат, поскольку *Trichodesmium* синтезирует токсины, вызывающие гибель копепод, таких как *Acartia tonsa*, а также устриц и некоторых видов рыб (сельдь, анчоусы)

Накопленные в устрицах и рыбах токсины могут вызывать паралитические поражения у человека



Прогнозы динамики *Trichodesmium* при наблюдаемом климатическом тренде

Есть все основания полагать, что повышение температуры и концентрации CO_2 , а также возрастание стратификации приведут к возрастанию масштабов цветения *Trichodesmium*

Возрастанию масштабов цветения *Trichodesmium* способствует также антропогенная эвтрофикация (использование удобрений, сброс сточных вод, марикультура)

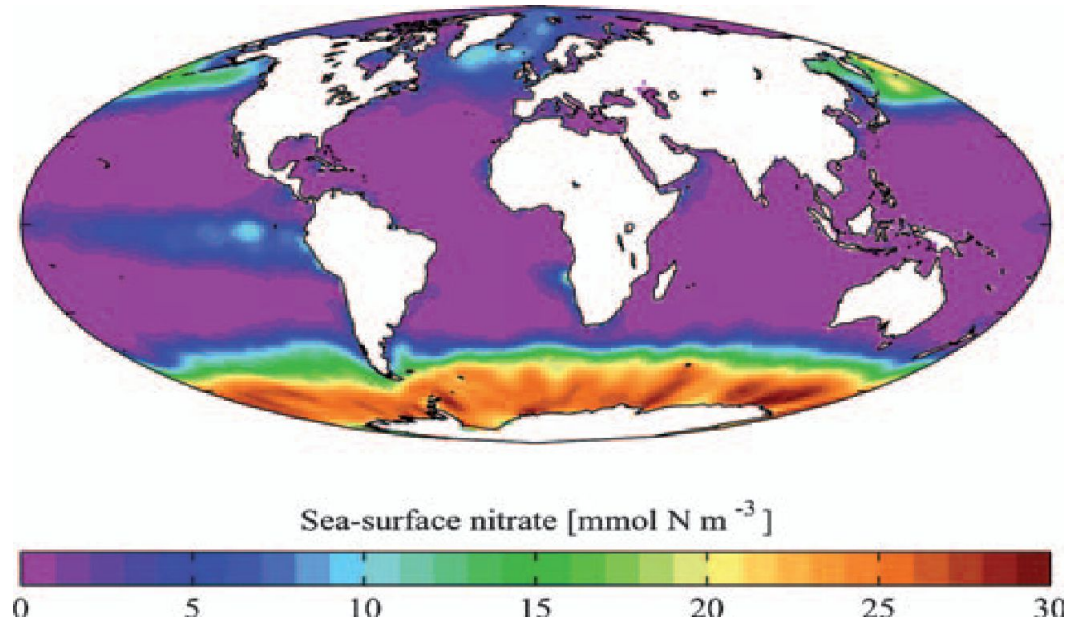
С другой стороны, такие механизмы, как **колимитирование** несколькими биогенными элементами может предотвратить возрастание масштабов цветения *Trichodesmium*

КОЛИМИТИРОВАНИЕ

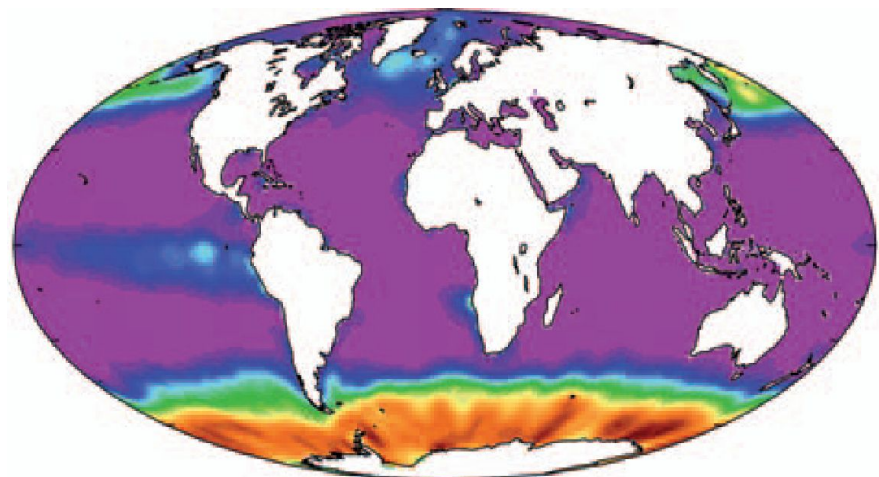
Длительное время основной парадигмой в экологии фитопланктона было утверждение, что только один ресурс лимитирует рост водорослей в конкретный момент времени (закон Либиха, сформулированный при изучении высшей растительности).

Лимитирующий элемент в водных экосистемах:

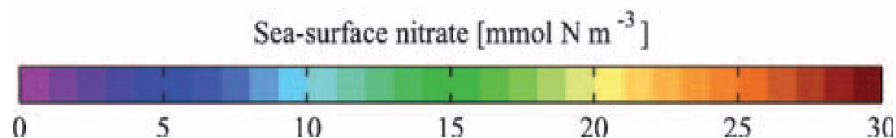
1. На большей части акватории Мирового океана фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **азота**.



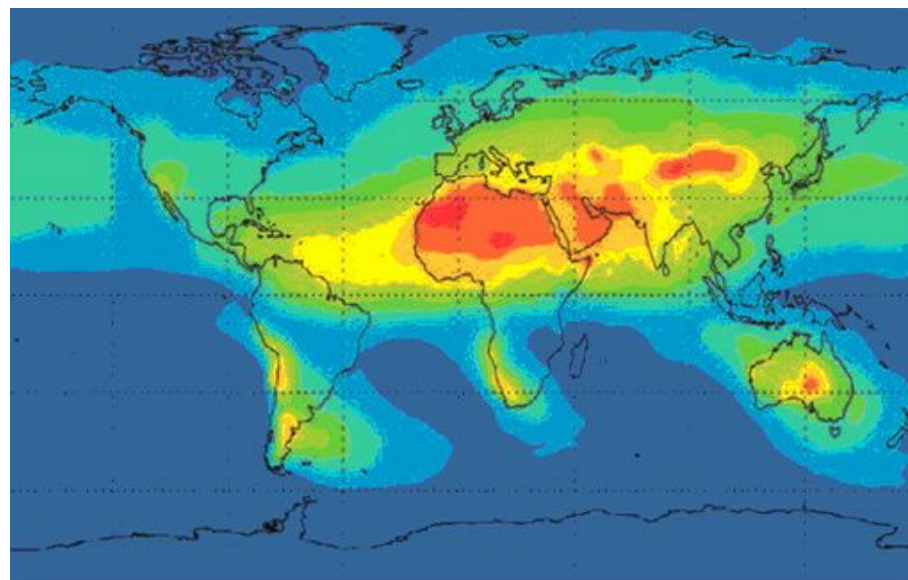
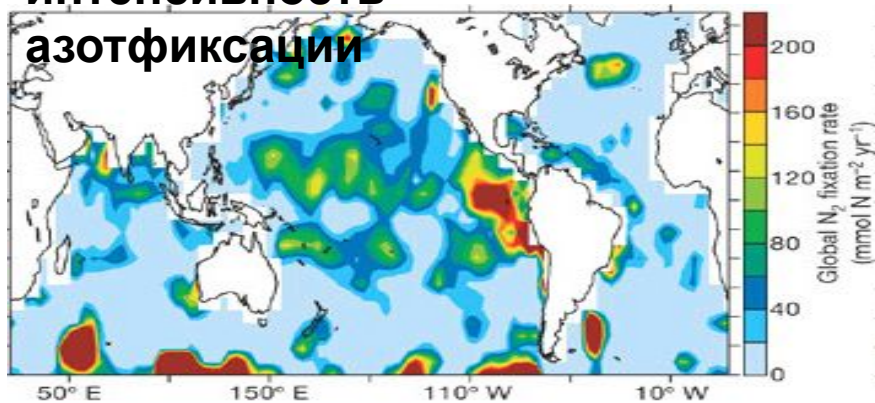
2. В так называемых «районах высокой концентрации биогенных элементов и низкой концентрации хлорофилла» фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **железа**.



Распределение пыли (г/м^2 в год), приносимой ветрами



**ИНТЕНСИВНОСТЬ
азотфиксации**



3. В ряде районов Мирового океана (Северная Атлантика, Средиземное море, Бискайский залив, норвежские фиорды, Белое море) на определенных стадиях сезонного развития фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток фосфора.

4. В **пресных** водах в большинстве случаев фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **фосфора**. В настоящее время накапливается все больше свидетельств, что фотосинтез и рост водорослей может быть лимитирован более чем одним ресурсом –

ко-лимитирование

Регистрация ко-лимитирования:

- Повышение фотосинтетической активности и роста при добавлении сразу двух ресурсов **A** и **B**.
- Повышение фотосинтетической активности и роста при добавлении как ресурса **A**, так и ресурса **B**.

Колимитирование проявляется (регистрируется) как на клеточном уровне, так и на уровне сообщества: мультиресурсное колимитирование, биохимическое колимитирование, колимитирование на уровне сообщества.

Мультиресурсное ко-лимитирование.

Два ресурса в такой низкой концентрации (ниже порогового уровня), что их потребление уже невозможно.

Например: лимитирующий ресурс – азот, а азот фиксаторы (их рост не лимитирован азотом) снижают концентрацию фосфора ниже критического уровня.

→ Добавки двух ресурсов необходимы для роста фитопланктона.
Показано для:

- вод Балтийского моря (азот и фосфор),
- для эстуария реки Перл в Южно-Китайском море (кремний и фосфор),
- для азотфиксаторов в тропических районах Северной Атлантики (фосфор и железо).

Биохимическое колимитирование. Проявляется на **клеточном уровне.**

Хотя два ресурса лимитируют рост и фотосинтез, добавка только одного уже ведет к активации роста.

Обусловлено тем, что добавка одного ресурса (например, **A**) ведет к повышению **эффективности потребления** другого (ресурса **B**).

Например, азот (железо) и свет лимитируют рост и фотосинтез.

Добавка азота (железа) ведет к повышению улавливающей способности антенн, и свет становится нелимитирующим ресурсом. В свою очередь, повышение интенсивности света повышает эффективность потребления азота (железа) – снижение K_s , и уже азот (железо) становится нелимитирующим ресурсом.

Колимитирование на уровне сообщества. Добавка ресурса **A** стимулирует рост одной популяции, добавка ресурса **B** стимулирует другую. В итоге при добавке каждого ресурса активируется рост сообщества.

Примеры: олиготрофные воды, в которых достаточно высокое содержание железа. Добавка нитратов стимулирует водоросли, не являющиеся азотфиксаторами, но способными к утилизации органического фосфора. А добавка фосфора стимулирует азотфиксатора *Trichodesmium*

При колимитировании на уровне сообщества одна (или несколько) популяций сообщества могут находиться в состоянии биохимического колимитирования, а развитие других лимитировано одним ресурсом.

Например: в тропических районах Северной Атлантики для активации азотфиксаторов необходима одновременная добавка фосфора и железа, а добавка одного нитратного азота стимулирует рост пикоцианобактерий *Prochlorococcus* и *Synechococcus*, обладающих более высокой эффективностью использования органического фосфора и железа.

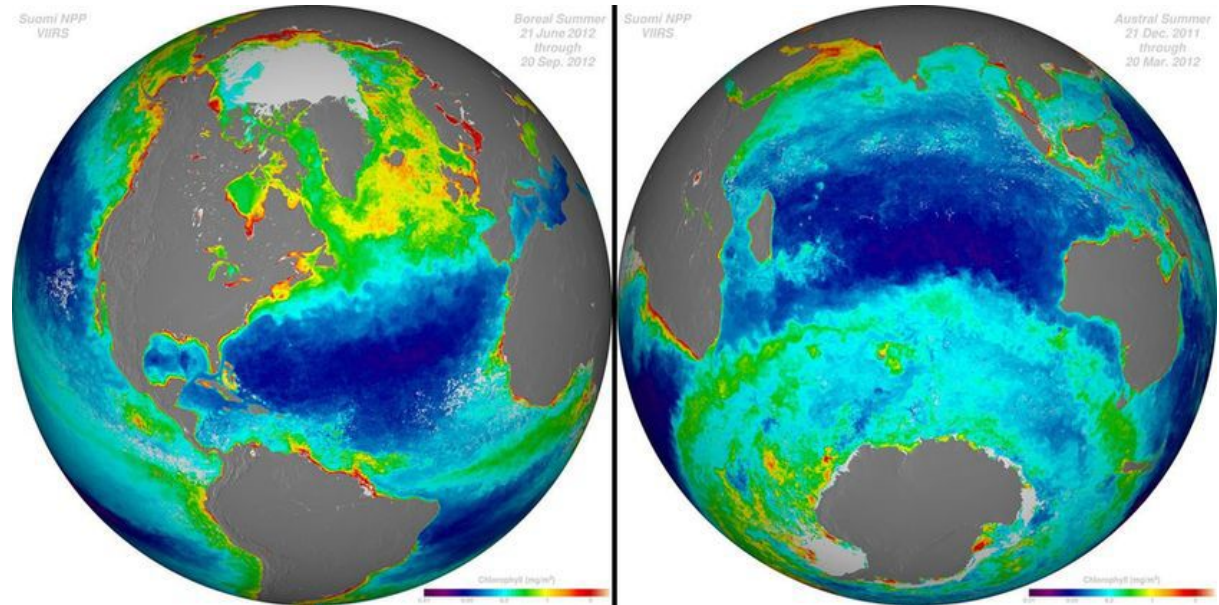
Схема колимитирования



Вопросы?

На следующей лекции:

Пространственно-временная изменчивость первичной продукции в Мировом океане



Вопросы экзамена

(бакалавриат)

8. Основные биогенные элементы и формы их присутствия в водной среде. Биогенные элементы, лимитирующие рост фитопланктона.

Потребление биогенных элементов водорослями. Модели минерального питания фитопланктона. Зависимость скорости роста водорослей от концентрации биогенных элементов в среде.

9. Зависимость фотосинтеза от интенсивности света и концентрации биогенных элементов. Прижизненное выделение водорослями экзометаболитов. Дыхание фитопланктона. Чистый и валовый фотосинтез.