

# 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).

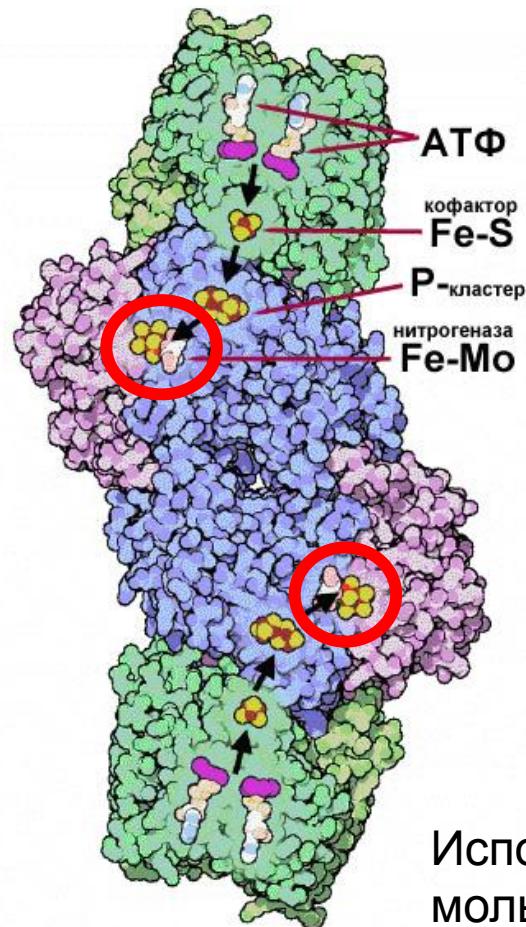
По имеющимся оценкам, сегодня около половины всего азота, входящего в состав человеческих тел, — это азот, зафиксированный при помощи процесса Габера-Боша (и попавший сначала в азотные удобрения, синтезируемые из аммиака, а затем в культурные растения).

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 оксигенного 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 оксигенный (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.

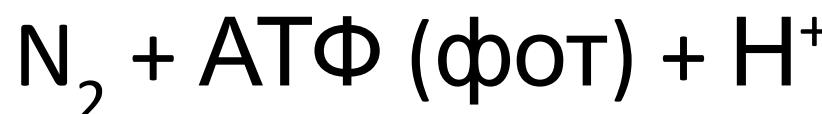
В колонии гетероцисты располагаются между вегетативными клетками.

Гетероцисты – результат клеточной дифференциации.

Дезактивация 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.

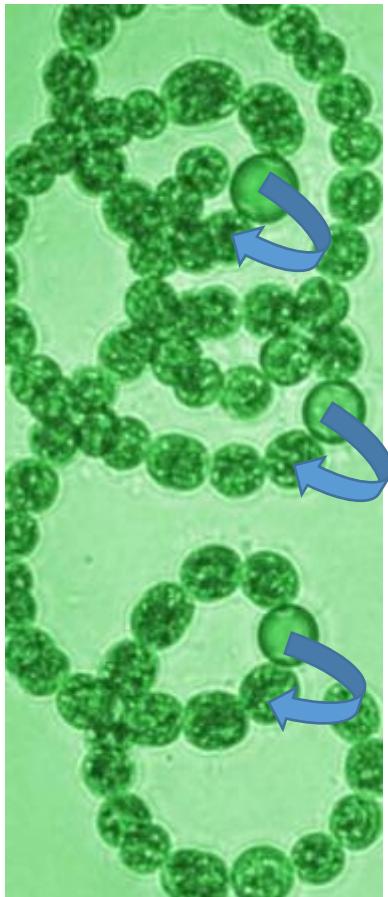
Нитрогеназа использует энергию **фотосинтетически генерированной** АТФ



(ферредоксин) + углеродный скелет

→ **глутамат**

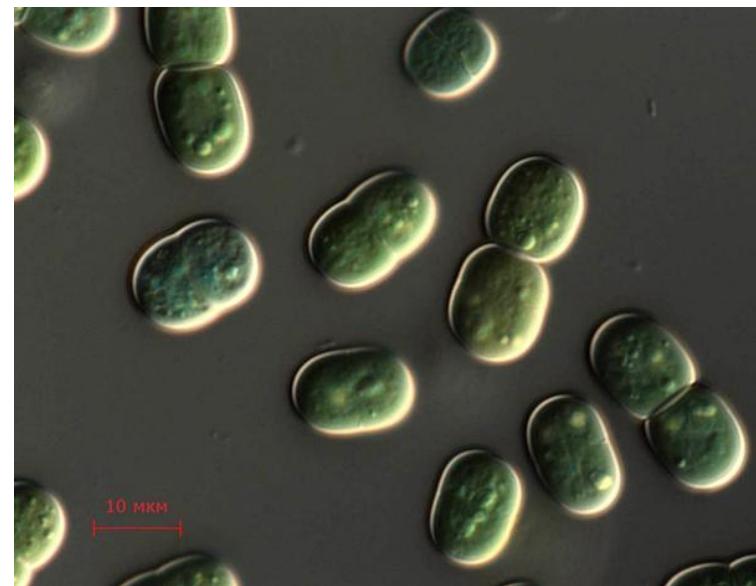
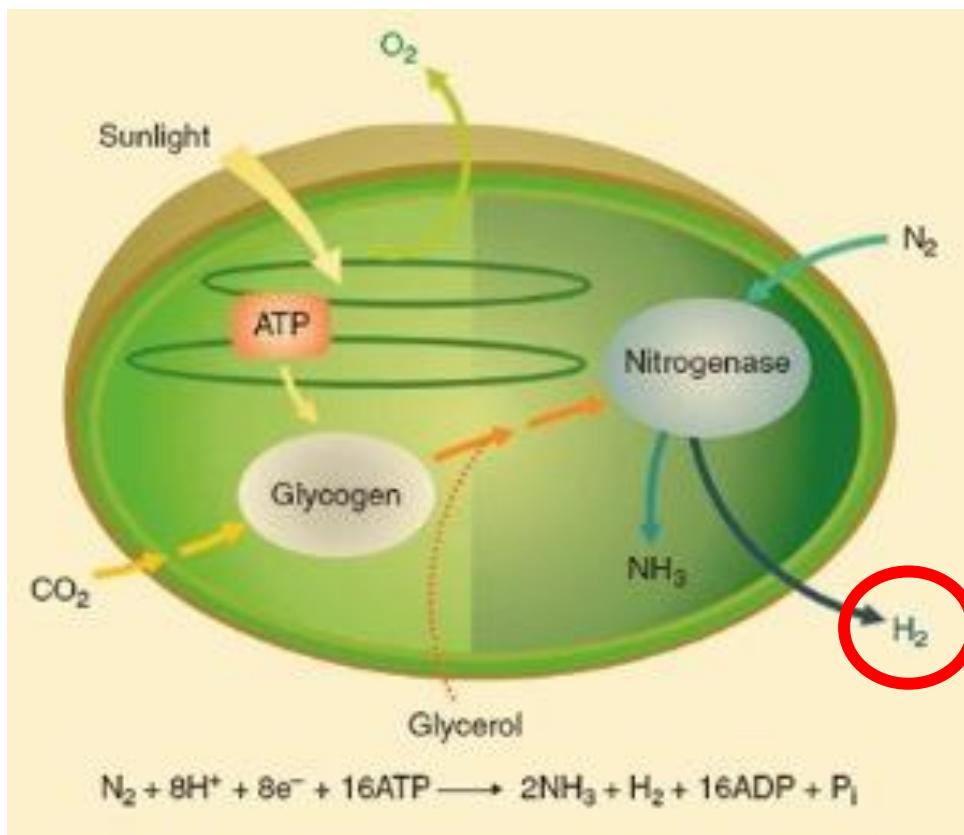
Глутамат поступает в соседние фотосинтетические клетки и используется для синтеза других аминокислот



**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 электронтранспортной цепи. Катаболизму подвергаются продукты фотосинтеза.

## «Соблюдение режима дня»



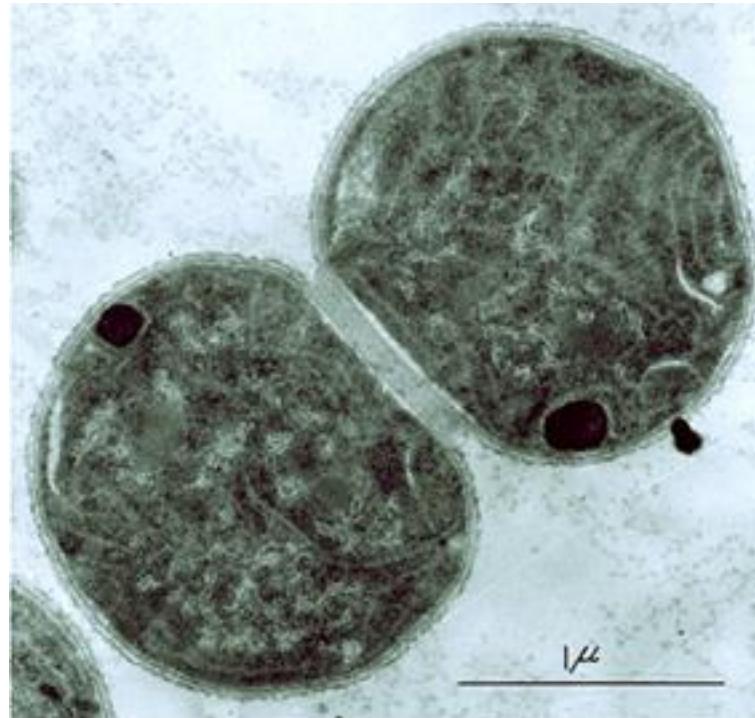
Cyanotheces 51142

«Знаменита» тем, что выделяет большое количество водорода

# *Crocospaera watsonii*

Фиксирует азот  
ночью.

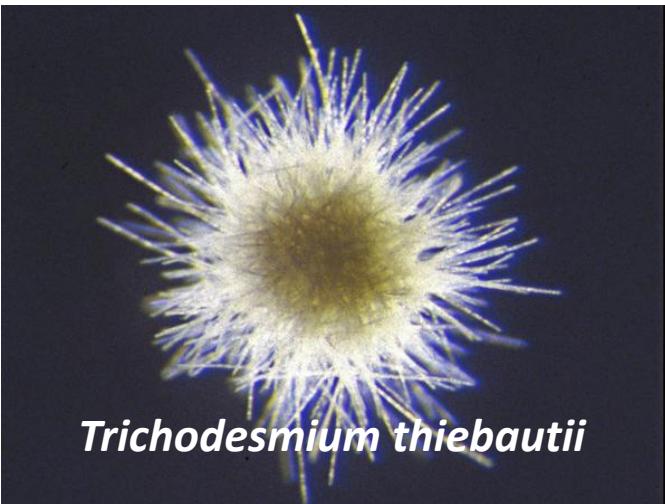
Диаметр клетки 2.5-6 мкм.  
Вегетирует в теплых водах (> 24 °C). В олиготрофных водах тропической зоны Атлантического и Тихого океанов в фотической зоне достигает численности порядка 1 млн кл/мл. Высокая скорость роста.



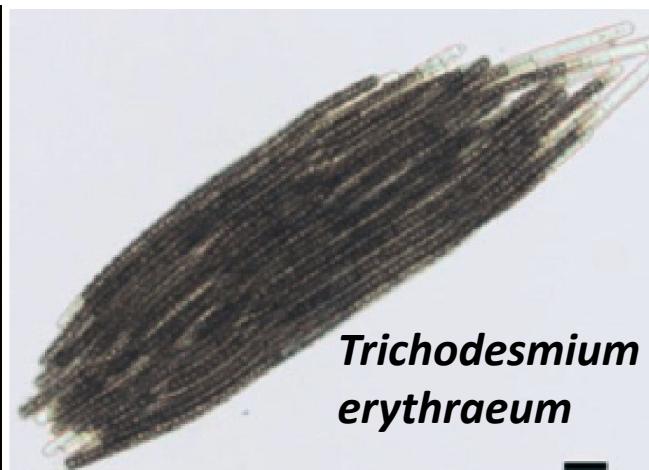
*Crocospaera* дает значительный вклад в бюджет азота в тропических водах

## *Trichodesmium* spp.

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

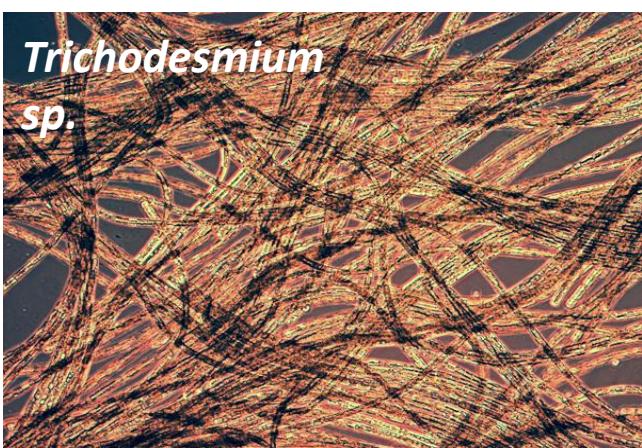


*Trichodesmium thiebautii*



*Trichodesmium erythraeum*

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



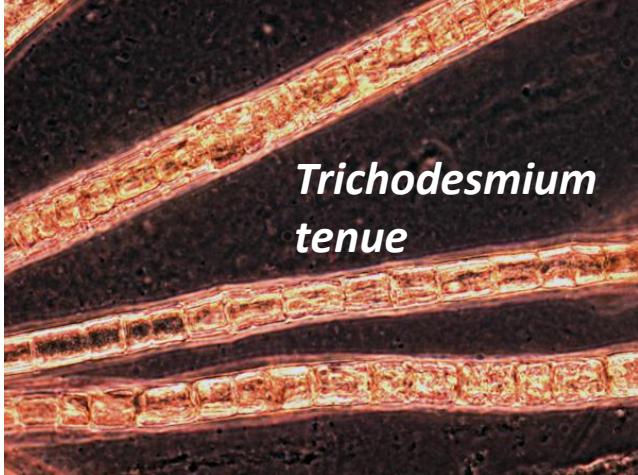
*Trichodesmium*  
sp.



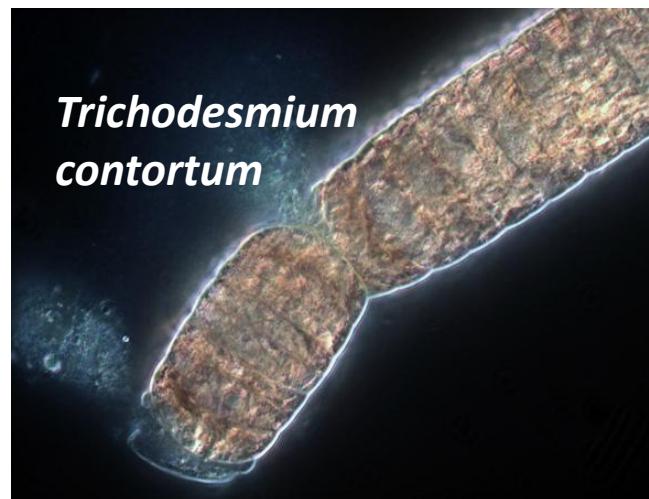
*Trichodesmium erythraeum*

«Лабораторона  
я крыса»

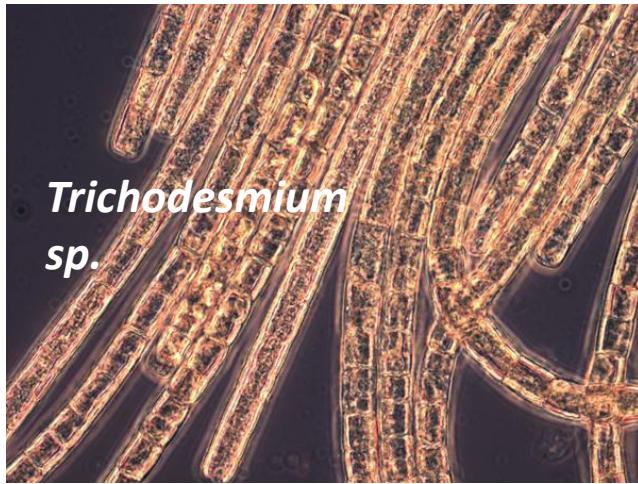
Колонии – сферические, «сноповидные», встречаются и одиночные трихомы. В колонии 200 и более трихомов.



*Trichodesmium  
tenuie*



*Trichodesmium  
contortum*

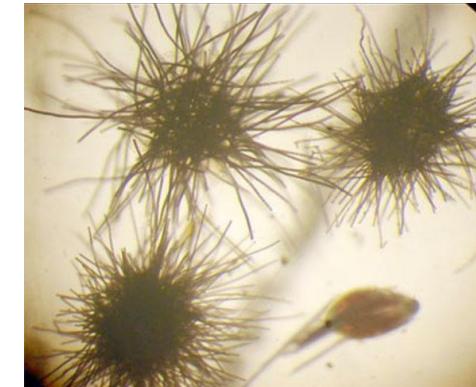


*Trichodesmium  
sp.*



*Trichodesmium  
pelagicum*

До 80 % клеточного объема могут занимать газовые вакуоли.



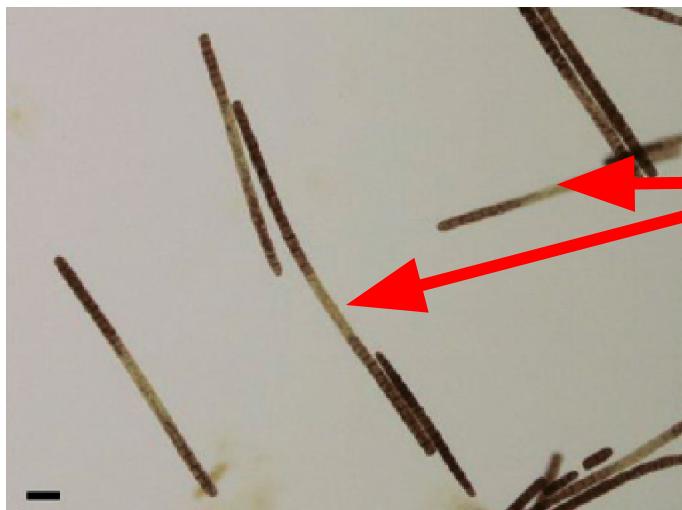
# Как экспрессия Nif генов, так и активность нитрогеназного комплекса у блокируются

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

??

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

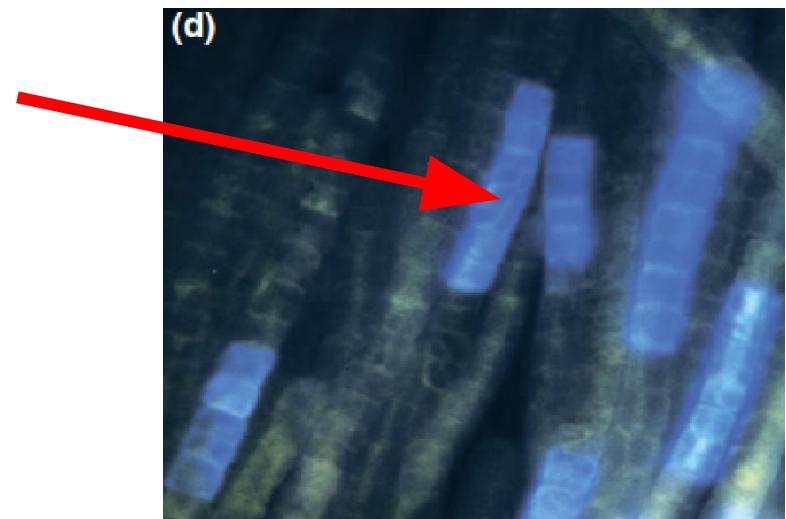
Низкое число и меньший размер клеточных структур, таких как цианофициевые гранулы, газовые вакуоли, полифосфатные гранулы (из-за этого и большая прозрачность диазоцит)

Трихомы, фиксированные р-ром Люголя

# Разделение азотфиксации и фотосинтеза в пространстве у *Trichodesmium*

Фиксация азота идет  
**ТОЛЬКО** в диазоцитах

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



Окраска специфическим красителем Nif белков

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

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

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

## **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<sup>+</sup>, а кислородом. Такой нециклический транспорт электронов от молекулы воды на О<sub>2</sub> называют псевдоциклическим транспортом. Псевдоциклический транспорт электронов приводит к восстановлению кислорода (образованного при окислении воды) с образованием перекиси водорода Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>. При этом идет образование АТФ

Также происходит изменение равновесного состояния – 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  $\text{CO}_2$  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

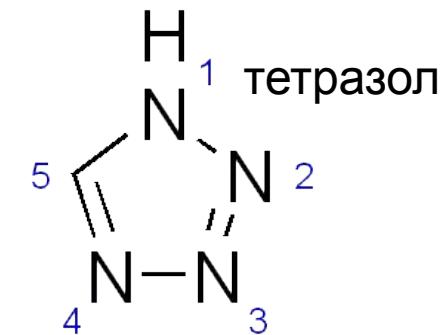
Повышается содержание ферментов, участвующих в образовании восстановителя в пентозофосфатном шунте

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,  
**ПРЕДПОЖИТЕЛЬНО**, также включают:

Формирование в диазоцитах  
восстановленных зон за счет  
скопления солей тетразола



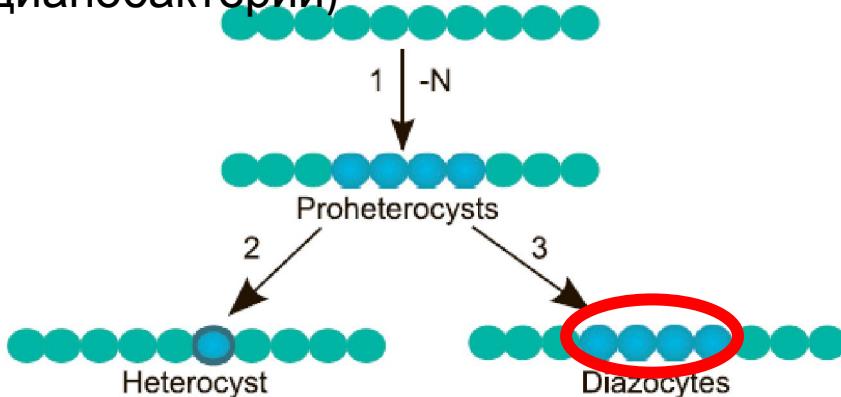
Наличие в диазоцитах особых каротиноидов,  
обладающих сильной антиокислительной  
способностью



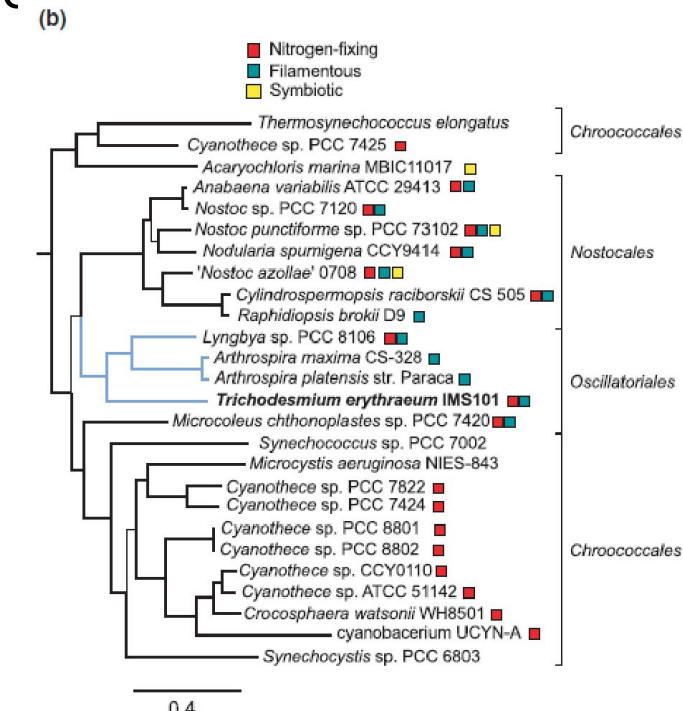
# Диазоцит

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 (изменение, 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)



## Деление диазоцитов



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 диазоцитов в трихомах

*Trichodesmium*

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

*Trichodesmium* способен фиксировать молекулярный азот в присутствие 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

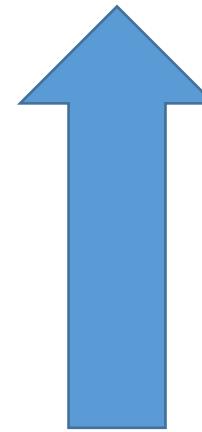
Для потребления фосфатов колонии *Trichodesmium* мигрируют – опускаются ниже пикноклина (зарегистрированы вертикальные миграции до глубины 100 – 200 м).



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»



Цианофициевые ?? гранулы

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

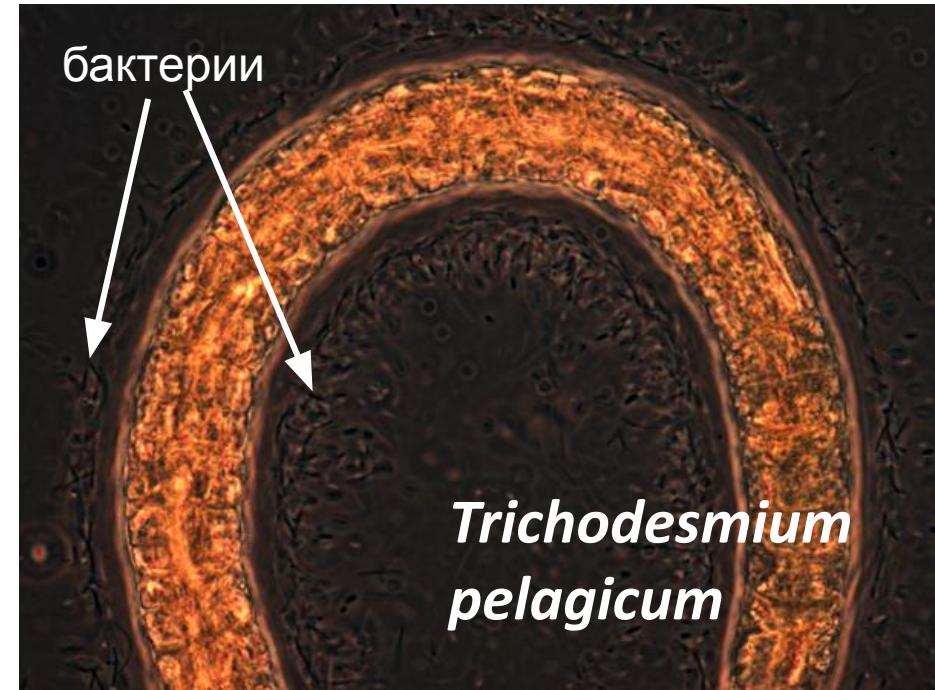
Когда весь «балласт» метаболизируется, легкие колонии поднимаются в верхние слои для фотосинтеза и азотфиксации

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

Мембранны - 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 усиlena 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*

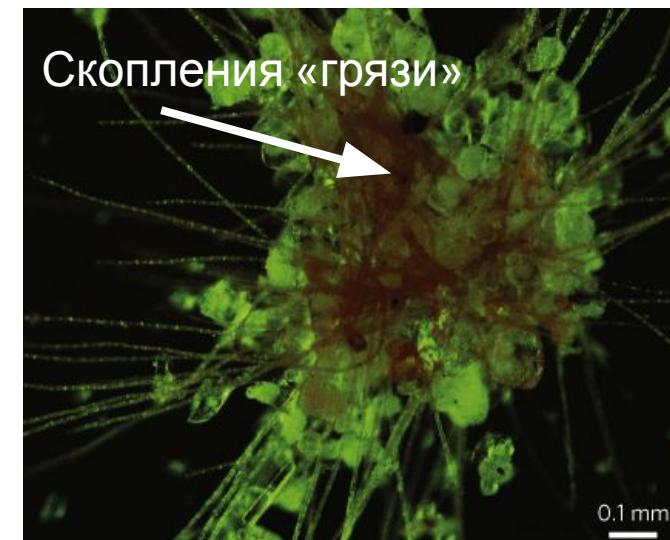
В клетках *Trichodesmium* высокое содержание Fe. Учитывая, что массовое развитие наблюдается в олиготрофных водах с низкой концентрацией железа, предполагают высокую способность *Trichodesmium* к потреблению и клеточному «удержанию» этого биогенного элемента

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 азофиксации

А вот фотосинтетическая активность продолжает сохраняться!

Замена ферредоксина на флаводоксин, не содержащий железа (предложено использовать флаводоксин как маркер недостатка железа)

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

# Экосистемная роль *Trichodesmium*

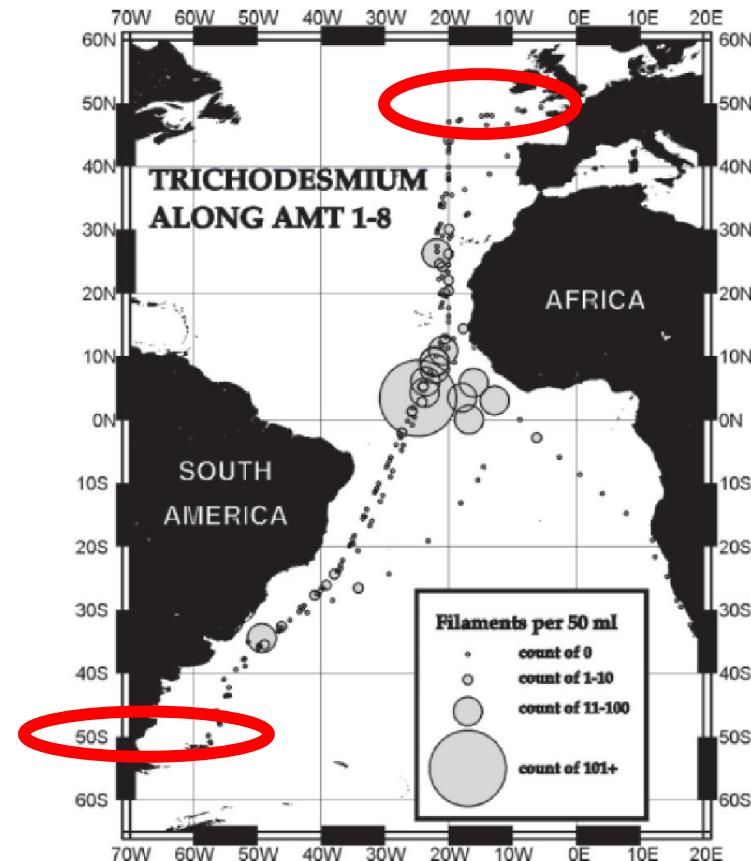
Пределы температурной толерантности для роста и азотфиксации у *Trichodesmium*: 20 – 34 °C, оптимальная температура 24 – 30 °C, в зависимости от вида НО! *Trichodesmium*-подобные цианобактерии (*nif* гены) недавно обнаружены в Арктике – более широкие пределы толерантности?

*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



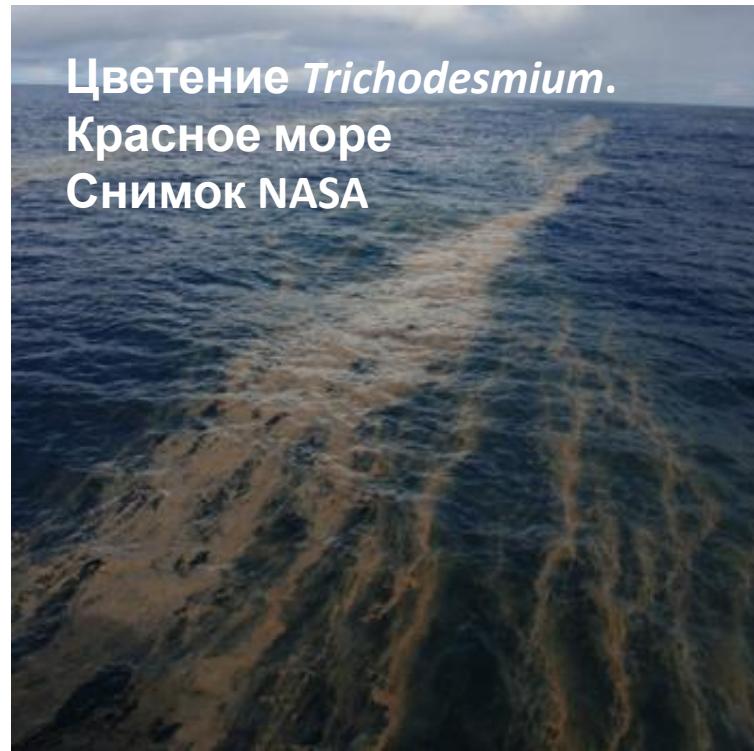
Рекорд: Индийский океан, поверхность - 17 000 трихомов в 1 л объема колонии

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

Протяженность акватории, охваченной  
цветением *Trichodesmium*, может достигать  
100 000 км<sup>2</sup> (отмечено в Аравийском море)

Число колоний при цветении может  
достигать 11 000/м<sup>3</sup> с числом трихомов до  
200 в одной колонии

Цветение *Trichodesmium*.  
Красное море  
Снимок NASA



# 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 •10<sup>12</sup> г N/год** (суммарно азотфиксация в водных экосистемах оценивается в 100 – 200 •10<sup>12</sup> 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, анchoусы)

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



# Прогнозы динамики *Trichodesmium* при наблюдаемом климатическом тренде

Есть все основания полагать, что повышение температуры и концентрации CO<sub>2</sub>, а также возрастание стратификации приведут к возрастанию масштабов цветения *Trichodesmium*

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

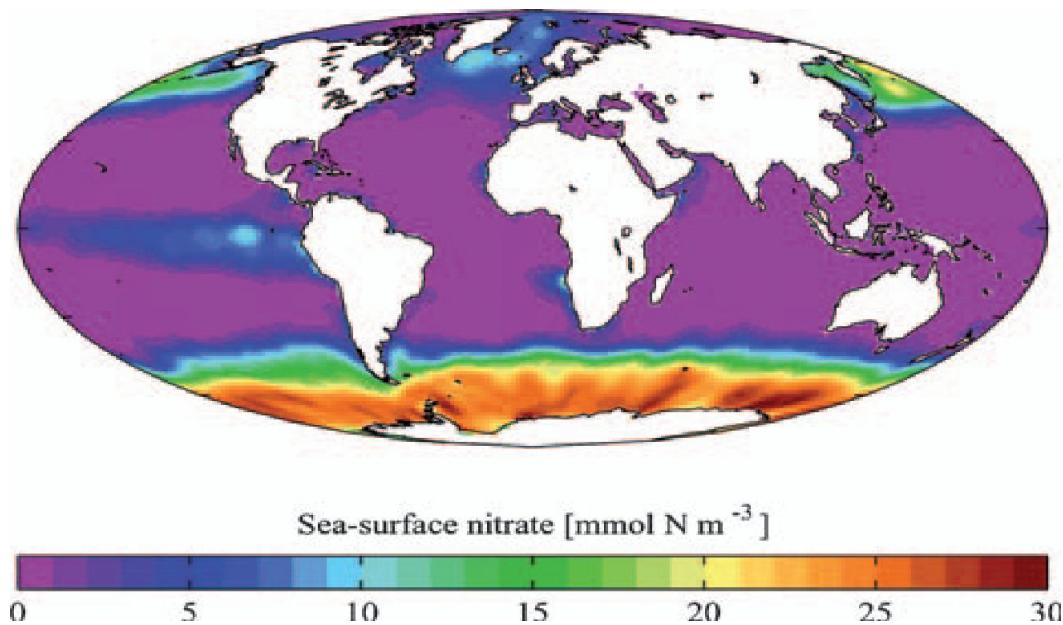
С другой стороны, такие механизмы, как **колимитирование** несколькими биогенными элементами может предотвратить возрастание масштабов цветения *Trichodesmium*

# КОЛИМИТИРОВАНИЕ

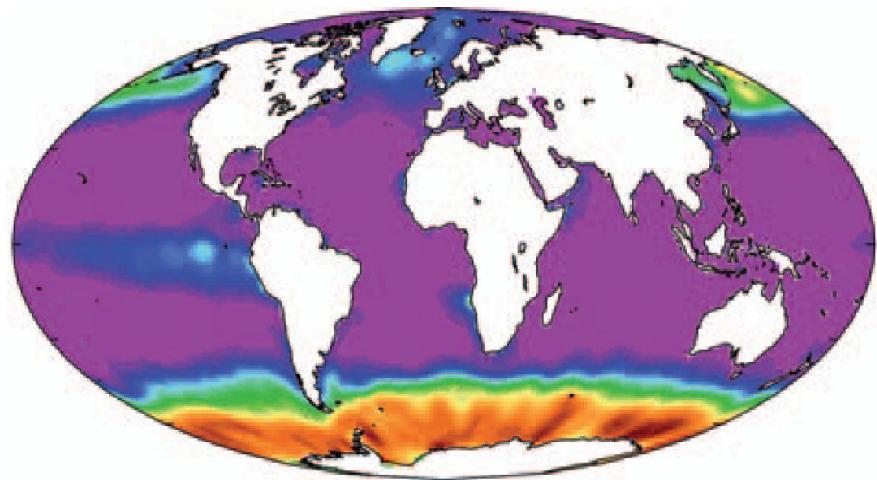
Длительное время основной парадигмой в экологии фитопланктона было утверждение, что только один ресурс лимитирует рост водорослей в конкретный момент времени (закон Либиха, сформулированный при изучении высшей растительности).

## Лимитирующий элемент в водных экосистемах:

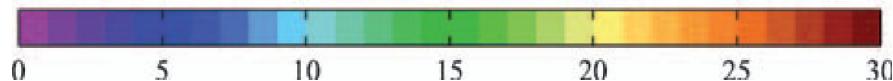
1. На большей части акватории Мирового океана фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток азота.



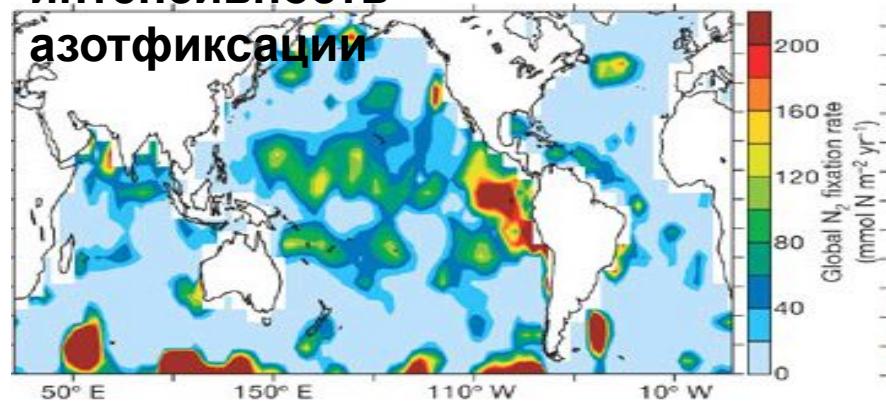
2. В так называемых «районах высокой концентрации биогенных элементов и низкой концентрации хлорофилла» фотосинтетическую активность и рост водорослей лимитирует недостаток **железа**.



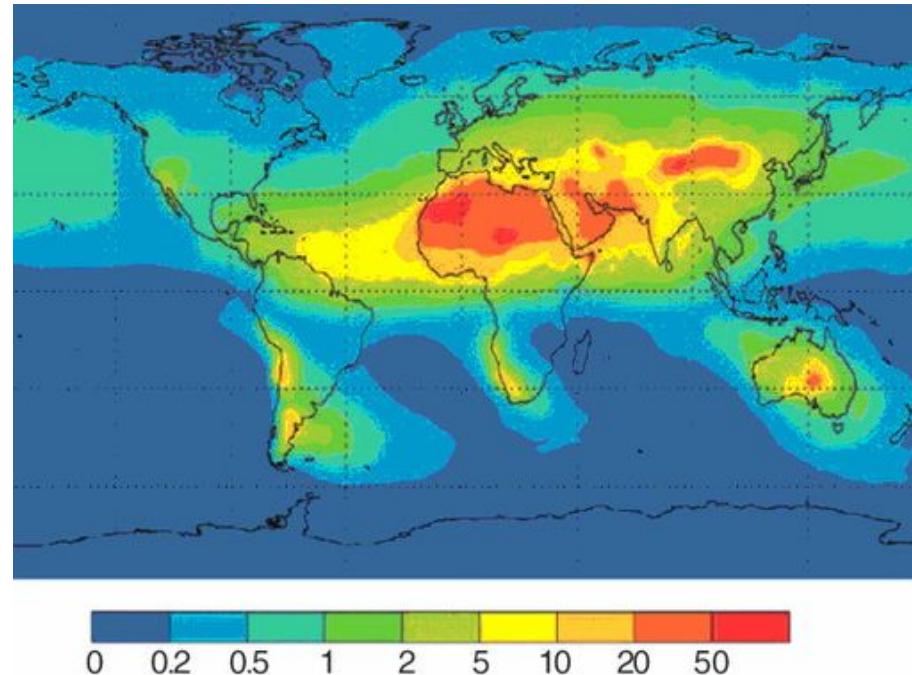
Sea-surface nitrate [mmol N m<sup>-3</sup>]



интенсивность  
азотфиксации



Распределение пыли (г/м<sup>2</sup> в год),  
приносимой ветрами



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 – **колимитирование**.

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 невозможno.

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.

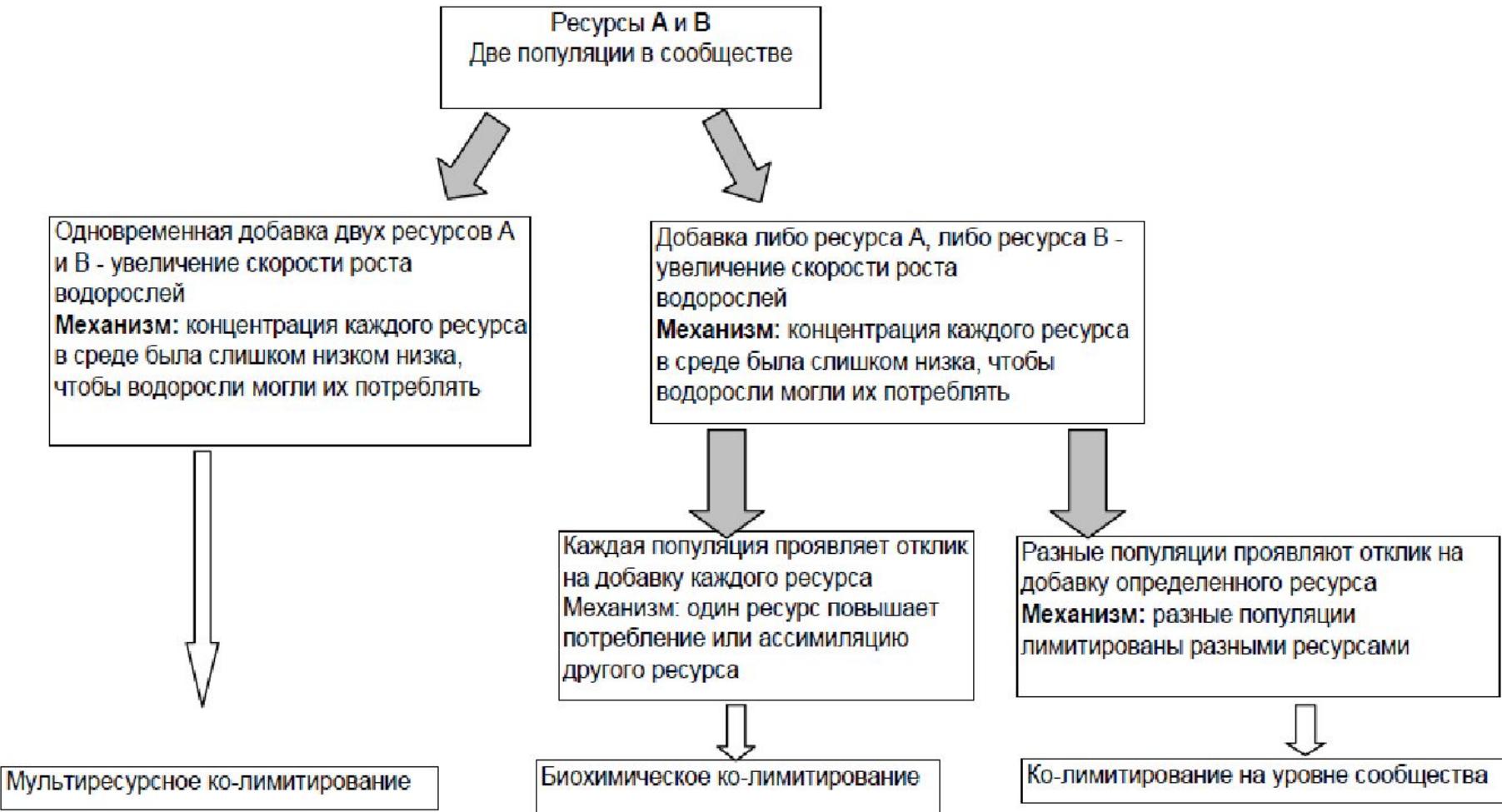
**Колимитирование на уровне сообщества.** Добавка ресурса **A** стимулирует рост одной популяции, добавка ресурса **B** стимулирует другую. В итоге при добавке каждого ресурса активируется рост сообщества.

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.

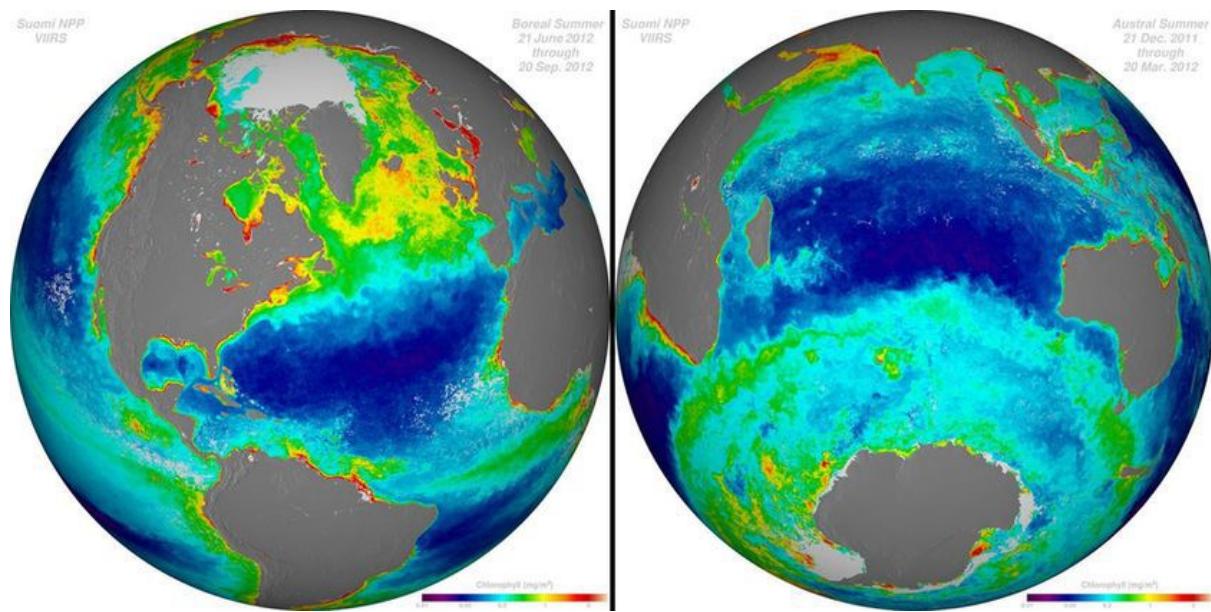
# Схема колимитирования



# 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.