



Stickstofffixierung durch Bakterien – Ohne diese Bakterien gäbe es vermutlich kein Ammonium, das für die Synthese von Aminosäuren und somit Proteinen wichtig ist

• Wichtige Punkte		
Stickstofffixierer	<ul style="list-style-type: none"> • N_2 zu NH_3/NH_4^+ 	<ul style="list-style-type: none"> • Bedeutung für das Ökosystem/ Bezug zum Stickstoffkreislauf, Grafik Linder S. 101 • Beispielorganismus eines wasserlebenden Cyanobakteriums/ einer Blaualgen mit Heterocyste (was ist eine Heterocyste? Weshalb eine spezielle Zelle mit Sauerstoff-undurchlässiger Zellwand?) • Wie gewinnt eine Blaualge Energie? • Wie funktioniert chemisch (unter welchen Enzymen, Reaktionsgleichung) die Umwandlung von N_2 zu NH_3/NH_4^+?

Stickstoff-Fixierung

Einige Bakterien und Blaualgen reduzieren atmosphärischen Stickstoff zu Ammoniak, und einige dieser Arten wiederum leben in Symbiose oder Assoziation mit grünen Pflanzen. Reduktion heißt, dass Elektronen dem Stickstoffatom/ den Stickstoffatomen hinzugefügt werden. Im Anschluss können nun Protonen (H^+) an das Stickstoffatom gebunden werden. Die Elektronen müssen irgendwoher bezogen werden. Als Elektronenquelle können z.B. (neben den Gärungs- oder Zellatmungsprozesse) die Prozesse der Photosynthesereaktion dienen, welche die photosynthetisch aktiven blaugrünen Blaualgen in aller Regel auch durchführen. Bei der Lichtreaktion werden Elektronen dem Wasser entzogen, wobei Sauerstoff und Protonen und Elektronen entstehen. Elektronen und Protonen werden via Reduktionsäquivalente dann zum Ort der Dunkelreaktion oder wie in diesem Falle auch zum Ort der Stickstofffixierung und Stickstoffreduktion transportiert. Letzteres geschieht allerdings erst, wenn die Kohlenhydrat-Reserven gefüllt sind (siehe Bild ganz unten).

Die bekanntesten Stickstofffixierer sind die Knöllchenbakterien (Rhizobien), Symbionten der Leguminosen. Sie sind wirtsspezifisch. *Rhizobium japonicum* lebt in Symbiose mit der Sojabohne, *Rhizobium trifolii* mit Klee und *Rhizobium meliloti* mit Luzerne; *Anabaena azollae* (eine Blaualge) kooperiert mit dem Wasserfarn *Azolla*, und *Nostoc muscorum* (ebenfalls eine Blaualge) mit der Tropenpflanze *Gunnera macrophylla*. In der Leguminosengattung *Pisum* gibt es Arten, die ständig in Symbiose mit Knöllchenbakterien leben, andere, die funktionslose Knöllchen bilden, und schließlich solche, die keine Knöllchen bilden und daher zu keiner Symbiose befähigt sind.

Zu den stickstoffreduzierenden (stickstoffbindenden, stickstofffixierenden) Arten gehören eine Anzahl freilebender Bodenbakterien z.B. solche aus den Gattungen *Azotobacter* (aerob lebend), *Closterium* (strikt anaerob), *Klebsiella* (fakultativ aerob) und *Rhodospirillum* (anaerob, mit Photosynthese).

In den beiden letzten Jahrzehnten ist viel über Stickstofffixierung gearbeitet worden, weil man sich durch Einsatz gentechnischer Verfahren eine Verbesserung der Stickstoffversorgung der Pflanzen erhoffte. Die Produktion von synthetischem Stickstoffdünger ist nämlich kostspielig und außerordentlich energieaufwendig. Doch auch die Bakterien schaffen es nicht, energiesparend Ammoniak zu bilden. Die Dreifachbindung des Stickstoffs gehört nämlich zu den stärksten kovalenten Bindungen in biologisch wichtigen Molekülen. Für die Umsetzung von 1 Mol Stickstoff zu 2 Mol Ammoniak werden 25 Mol ATP benötigt, oder anders ausgedrückt, pro Gramm fixiertem Stickstoff werden - unter günstigsten Voraussetzungen - ca. 10 g Glucose verbraucht. Besonders aufwendig ist die Reaktion in *Azotobacter*, denn dort werden sogar ca. 100 g Glucose benötigt.

Stickstoffbindung durch Blaualgen

Die Wechselwirkungen in *Anabaena-Azolla*-Symbiosen unterscheiden sich von den Leguminosen-Rhizobien-Interaktionen. Über die Erkennungsreaktion ist nur wenig bekannt. *Anabaena* dringt an der Spitze wachsender Sprosse in das Gewebe des Farns ein. Die Stickstofffixierung erfolgt in differenzierten (spezialisierten) Zellen, den **Heterozysten**, die im Wechsel mit vegetativen, photosyntheseaktiven Zellen entlang eines Algenfilaments auftreten. Größenordnungsmäßig ist etwa jede zehnte Zelle ein Heterozyst. Im Falle der *Anabaena-Azolla*-Interaktion sind eindringende *Anabaena*-Zellen klein, Heterozysten fehlen. Erst nachdem sie das Farngewebe kolonisiert und sich in intrazellulären Kavernen eingestekt haben, setzen Heterozystenbildung und damit Stickstofffixierung ein (H. D. HILL, 1977). *Azolla* ist in den Reisfeldern Ostasiens verbreitet, wo ein beachtlicher Teil des von ihm gebundenen Stickstoffs den Reispflanzen zugute kommt.

Bei symbiontischen und bei freilebenden *Anabaena*en (und anderen Blaualgen) stellt sich die Frage nach dem Schutz vor Sauerstoff. Einerseits gibt es intrazelluläre Stoffwechselprozesse, die überschüssigen Sauerstoff abfangen, andererseits ist aber auch beobachtet worden, daß Heterozysten oft von Bakterien umgeben sind. **Aktive Heterozysten** sind, im Gegensatz zu den vegetativen Zellen, von einem Polysaccharidmantel umgeben, und der wiederum scheint den Bakterien als Nahrung zu dienen; sie verbrauchen durch ihren eigenen Stoffwechsel Sauerstoff und schaffen damit um die Heterozysten herum sauerstoffarme Mikrozonen.

Heterocysten

Einige filamentös wachsende Cyanobakterien, wie z. B. *Anabaena*, formen bei Stickstoffmangel ca. jede zehnte vegetative Zelle entlang des Filaments oder eine endständige Zelle in eine **Heterocyste** um. Diese zeichnet sich durch eine verdickte Zellwand mit hohem Gehalt an Glykolipiden aus, wodurch sie im Lichtmikroskop auf Grund stärkerer Lichtbrechung von vegetativen Zellen leicht zu unterscheiden ist. Heterocysten enthalten das zur Stickstofffixierung notwendige Enzym Nitrogenase und besitzen, im Gegensatz zu den vegetativen Zellen, kein Photosystem II. In diesen Zellen entsteht bei der Photosynthese also kein Sauerstoff, der die Nitrogenase inaktivieren würde. Die verdickte Zellwand vermindert darüber hinaus die Diffusion von O_2 in die Heterocyste. Durch interzelluläre Verbindungen wird der notwendige Stoffaustausch zwischen Heterocysten und vegetativen Zellen gewährleistet. Bei den im Mikroskop sichtbaren polaren Granula handelt es sich um Cyanophycin.



(aus: <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/d34/34b.htm>)

12.1 Stickstoffhaushalt

Da der Stickstoff, wie soeben erwähnt, Bestandteil zahlreicher Biomoleküle ist, andererseits aber manche Böden verhältnismäßig stickstoffarm sind, befindet er sich häufig im Minimum und ist damit für das Wachstum der begrenzende Faktor. Ähnlich wie beim Kohlenstoff können wir auch im Falle der Stickstoffernährung autotrophe und heterotrophe Organismen unterscheiden. Erstere vermögen anorganisch gebundenen oder sogar elementaren Stickstoff zu verwerten, während die heterotrophen Lebewesen, zu denen neben zahlreichen Mikroorganismen auch Pilze, Tiere und der Mensch gehören, auf organisch gebundenen Stickstoff angewiesen sind, wobei Proteine bzw. Aminosäuren die wichtigsten Stickstoffquellen sind.

12.1.1 Stickstoffquellen

Schon bei der Besprechung der Ionenaufnahme wurde darauf hingewiesen, daß die grünen Pflanzen nicht nur kohlenstoffautotroph, sondern normalerweise auch stickstoffautotroph sind. Sie nehmen ihn, bevorzugt in Form des NO_3^- -Ions, aus dem Boden auf, der somit die wichtigste, meist sogar einzige Stickstoffquelle der höheren Pflanze ist. In der Regel ist NO_3^- durch NH_4^+ ersetzbar, doch bereitet die fortgesetzte Aufnahme von NH_4^+ vielen höheren Pflanzen wegen der dadurch bedingten Ansäuerung des Bodens Schwierigkeiten. Da der Stickstoff in den meisten Böden nur in relativ geringer Menge enthalten ist, müssen landwirtschaftlich intensiv genutzte Flächen regelmäßig gedüngt werden. Demgegenüber sind die dem Boden durch Regen zugeführten, aus elektrischen Entladungen in der Atmosphäre stammenden Mengen von Stickstoffoxiden gering zu veranschlagen.

Zur Bindung des elementaren Stickstoffs, der im Wasser des Bodens gelöst ist, sind einige Bakterien und Cyanobakterien befähigt, die entweder frei im Boden leben oder mit höheren Pflanzen in Symbiose vergesellschaftet sind. Von den frei lebenden Bakterien seien *Azotobacter chroococcum* und *Clostridium pasteurianum*, die Purpurbakterien und die Actinomyceten genannt. Von den symbiotisch lebenden Stickstoffbindern kommt den Wurzelknöllchenbakterien der Fabales (Hülsenfrüchtler) aus den Gattungen *Rhizobium* und *Bradyrhizobium* die größte praktische Bedeutung zu (S. 365). Sie ermöglichen den Pflanzen auch auf stickstoffarmen Böden ein gutes Gedeihen. Die durch sie jährlich gebundenen Stickstoffmengen können bis zu 300 kg/ha betragen, sind also für den Stickstoffhaushalt des Bodens von erheblicher Bedeutung.

12.1.2 Einbau des Stickstoffs

Unabhängig davon, ob als N-Quelle der elementare Stickstoff oder das Nitrat-Ion dient, muß der Stickstoff zunächst bis zur Stufe des Ammoniaks reduziert werden, da der Einbau in Kohlenstoffverbindungen nur in der reduzierten Form erfolgen kann.

13.2 Stickstoff-Fixierung durch freilebende Bakterien und Cyanobakterien

In der Befähigung zur N_2 -Bindung sah man bis 1949 eine Eigenschaft, die sich nur auf wenige Bakterien, vorwiegend Angehörige der Gattungen *Clostridium* und *Azotobacter*, beschränkt. Seit der Einführung der Isotopentechnik ($^{15}\text{N}_2$) und des Nachweises des N_2 -bindenden Enzymkomplexes *Nitrogenase* durch Acetylenreduktion ist bekannt, daß auch viele andere Bakterien molekularen Stickstoff zu binden vermögen, darunter die phototrophen Bakterien und viele Cyanobakterien; methanbildende Bakterien und Desulfurikanten; aber auch *Klebsiella pneumoniae*, das Wasserstoff oxidierende Bacterium *Xanthobacter autotrophicus* und methylole trophische Bakterien.

Besonders effektiv ist die N_2 -Bindung bei den *Azotobacter*-Arten (etwa 20 mg Stickstoff/g umgesetzter Zucker). Es lassen sich mehrere Arten unterscheiden, die an verschiedenen Standorten verbreitet sind (Tab. 13.1). Alle Arten sind Gram-negativ, relativ groß und unter bestimmten Bedingungen durch Geißeln beweglich. Sie sind streng aerob und oxidieren viele organische Verbindungen. Bei *Azotobacter chroococcum* sind die Zellen paarweise gelagert. Die starke Schleimbildung und dunkle Pigmente (Melanine) geben den Kolonien ein charakteristisches Aussehen. Bei Nährstoffarmut entstehen Cysten mit dicken Zellwänden („Arthrosporen“, „Microcysten“).

Im Wurzelbereich mehrerer Kulturpflanzen sind N_2 -fixierende Bakterien gefunden worden: *Azotobacter paspali* wächst an der Wurzeloberfläche des Sandgrases *Paspalum notatum*, *Azospirillum lipoferum* wächst in der Rhizosphäre von *Digitaria decumbens*.

Die Stickstoff-Fixierung durch freilebende Cyanobakterien ist zumindest in Reisfeldern von nicht zu unterschätzender Bedeutung [30–50 kg N/(ha·a)]. Bei etwa 40 Cyanobakterien-Arten ist die Befähigung zur

12.1.2.1 Fixierung des elementaren Stickstoffs

Die Reduktion des elementaren Stickstoffs (N_2), auch als Distickstoff bezeichnet, erfolgt durch das Enzym **Nitrogenase**. Es ist ein Molybdoferredoxin mit einer Molekülmasse von 245000 Da, das aus mehreren Untereinheiten besteht und 32 Fe-, ebensoviele S- und außerdem 2 Mo-Atome enthält.

Die Nitrogenase ist mit einer zweiten, kleineren Komponente von 64000 Da assoziiert, die 4 Fe- und 4 S-Atome enthält und als Azoferredoxin bzw. **Nitrogenase-Reduktase** bezeichnet wird. Sie überträgt unter Verbrauch von einem ATP ein Elektron auf die Nitrogenase, an deren Metall-Schwefel-Zentren der Distickstoff gebunden ist. Der N_2 wird schrittweise unter Übertragung von 6 Elektronen reduziert und schließlich als NH_3 bzw. NH_4^+ in das Cytosol der Wirtszelle entlassen und dort in eine organische Bindung überführt. Da keine Zwischenstufen gefunden wurden, ist anzunehmen, daß der Stickstoff die ganze Zeit über an das Enzym gebunden bleibt. Obwohl die Reaktion $3\text{H}_2 + \text{N}_2 \rightarrow 2\text{NH}_3$ exergonisch ist ($\Delta G^\circ = -50 \text{ kJ/mol} = -12 \text{ kcal/mol}$), ist der Energiebedarf, wohl wegen der Reaktionsträgheit des elementaren Stickstoffs, sehr hoch. Es werden 16 ATP/ N_2 benötigt.

Falls das bei der hydrolytischen Spaltung entstehende ADP nicht sofort wieder zu ATP phosphoryliert wird, kommt die Reaktion zum Erliegen. Der Organismus läuft also nicht Gefahr, sein verfügbares ATP ausschließlich zur N_2 -Fixierung zu verwenden. Als Wasserstoffdonator dient reduziertes Ferredoxin. Bei den nicht-photosynthetischen Stickstoffbindern werden das reduzierte Ferredoxin und das ATP durch Spaltung von Brenztraubensäure gewonnen. Bei den photosynthetischen Formen stammt das ATP hauptsächlich aus der zyklischen Photophosphorylierung. Das Ferredoxin wird dagegen offenbar nicht durch die Photosynthese reduziert, wie man erwarten sollte, sondern wahrscheinlich ebenfalls in einer Dunkelreaktion, wobei wiederum die Brenztraubensäure als Elektronendonator zu fungieren scheint.

Der enzymatische Apparat der bakteriellen Stickstoff-Fixierung und die Knöllchenbildung werden durch die *nif*-Gene codiert, die auf dem sogenannten *Sym*-Plasmid lokalisiert sind. Sie werden durch NH_4^+ und in einigen Fällen auch durch Sauerstoff (s. unten) reprimiert, weshalb die Bakterien außerhalb des Wirtes keinen Stickstoff fixieren.

Die Nitrogenase ist gegen Sauerstoff empfindlich. Für die anaeroben Stickstoffbin- der ist dies kein Problem. Bei den aeroben Formen muß jedoch dafür gesorgt werden, daß zum Zeitpunkt der Stickstoffbindung die Sauerstoffspannung in der Zelle gering ist. Besondere Probleme ergeben sich für solche Organismen, die eine oxy- gene Photosynthese betreiben, bei der molekularer Sauerstoff produziert wird. Bei der Mehrzahl der zur Bindung von elementarem Stickstoff befähigten Cyano- bakterien erfolgt die N_2 -Fixierung daher in besonderen Zellen, den Heterocysten, die nur das Photosystem I enthalten, durch das im zyklischen Elektronentransport zwar ATP erzeugt wird, nicht aber Sauerstoff.



13. Fixierung von molekularem Stickstoff

Tab. 13.1 Azotobacter - Gruppe und ihre Verbreiterung

Arten	Größe und Gestalt	Kolonie-merkmale	Herkunft und Verbreitung
<i>Azotobacter chroococcum</i>	3,1 · 2 µm meist paarweise	schleimig, dunkel verfärbend, Cysten bildend	Böden
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3,4 · 1,5 µm meist paarweise	groß, schleimig; gelbes, grün fluoreszierendes Pigment ausscheidend; Cysten bildend	Böden und Wasser
<i>Azotobacter paspali</i>	2 µm, stark pleomorph	Pigment wie vor; Cysten bildend	Böden, an der Wurzeloberfläche von <i>Paspalum notatum</i>
<i>Azomonas agilis</i>	3,3 · 2,8 µm einzeln und paarweise	gelbes, weiß fluoreszierendes Pigment ausscheidend	Böden und Wasser
<i>Beijerinckia indica</i>	2 µm	groß, schleimig, farblos	saure Böden der Tropen (pH 4,5)

N₂-Bindung an Reinkulturen nachgewiesen worden. Cyanobakterien zählen zu den Pionieren bei der Besiedlung armer Böden (Vulkanböden) und kommen an extremen Standorten der Antarktis bei Temperaturen nahe dem Gefrierpunkt und in heißen Quellen vor. Sie leben isoliert oder in Symbiose mit Pilzen als Blaualgen-Flechten. In Binnengewässern und Teilen der Ozeane kommt es jährlich zu den als „Wasserblüte“ bekannten Massenentwicklungen von Cyanobakterien. Es hat sich noch nicht abschätzen lassen, welcher Anteil am Stickstoffgewinn und an der Biomasseproduktion des Meeres den Cyanobakterien zukommt.

Spurenelemente der Stickstoff-Fixierung. Zur N₂-Fixierung ist Molybdän erforderlich (Tab. 13.2). Dieses Schwermetall ist ein essentieller Bestandteil der *Nitrogenase*.

Tab. 13.2 Mo-Anspruch der N₂-Fixierung durch *Azotobacter vinelandii*

Stickstoffquelle		Zellstickstoff*
N ₂	+ Mo	205
	- Mo	50
NH ₄ ⁺	+ Mo	240
	- Mo	250

* µg/ml Zellsuspension

Zur N₂-Fixierung der Leguminosen ist außerdem Cobalt notwendig. Es ist im N₂-Coenzym enthalten, das als Cofaktor der *Methylmalonyl-CoA-Mutase* und der *Nucleotid-Reductase* fungiert. Wie *Lactobacillus leichmannii* sind Rhizobien auf diesen Cofaktor angewiesen. In einigen N₂-bindenden Organismen läßt sich Molybdän teilweise durch Vanadium ersetzen.

13.3 Biochemie und genetische Übertragung der Stickstoff-Fixierung

Die N₂-Bindung ist ein reduktiver Prozeß, und Ammonium ist das erste erfaßbare Produkt dieses Vorgangs. Der Reduktionsprozeß vollzieht sich an einem Enzymkomplex, der *Nitrogenase*. Diese besteht aus zwei Untereinheiten, einem Molybdän-Eisen-Schwefel-Protein und einem Eisen-Schwefel-Protein. Das Enzym sowie der Vorgang der N₂-Fixierung sind äußerst sauerstoffempfindlich. Es ist daher verständlich, daß sowohl im Knöllchengewebe als auch bei den freilebenden N₂-fixierenden Bakterien besondere Mechanismen vorliegen, die die *Nitrogenase* vor hohen Sauerstoff-Partialdrücken schützen.

Zur N₂-Fixierung ist Reduktionskraft und Energie notwendig (Abb. 13.2). Beide lassen sich im Zuge der Photosynthese, Gärung oder Atmung erzeugen. Im Modellversuch an den gereinigten Bestandteilen des *Nitrogenase*-Systems (in vitro) läßt sich die Energie in Form von ATP und die Reduktionskraft in Form von reduzierten Pyridinnucleotiden und Ferredoxinen über Flavodoxin enthaltende Überträger zuführen. Der Aufwand an ATP ist sehr hoch.

Das *Nitrogenase*-System reduziert nicht nur molekularen Stickstoff (N≡N), sondern auch Acetylen (Ethin), Azid, Distickstoffoxid, Cyanid, Nitrite, Isonitrile und Protonen. Auf der Acetylenreduktion beruht das methodisch einfachste Verfahren zum Nachweis von *Nitrogenase*. Acetylen wird nur zu Ethylen (Ethen) reduziert, das sich gaschromatographisch leicht quantitativ bestimmen läßt. Bisher haben alle N₂-bindenden Mikroorganismen und Symbiose-Systeme auch Acetylen reduzieren können.

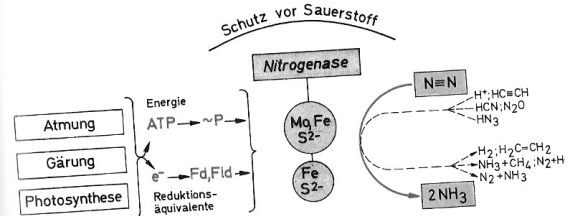


Abb. 13.2 Allgemeines Schema der Stickstoff-Fixierung. Fd = Ferredoxin; Fld = Flavodoxin

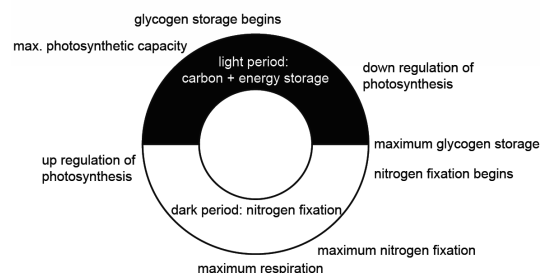
„Reduktionskraft ist erforderlich“ heißt, dass Elektronen zur Verfügung stehen müssen, die an anderer Stelle gewonnen werden müssen (z.B. Atmung, Gärung, Photosynthese, ...). Der Antransport der Elektronen geschieht mit Hilfe von Reduktionsäquivalenten. Die bekanntesten Reduktionsäquivalente sind die der Pflanze oder der Zellatmung (z.B. NAD⁺/NADH⁺). Anstelle dieser Reduktionsäquivalente findet sich hier ein komplexeres dreischrittiges System aus gleich drei Reduktionsäquivalentenpaaren Pyridinnucleotiden, Ferredoxin und Flavodoxin. Es muss nicht genauer beschrieben werden, lediglich erwähnt. Die Funktion dieser Reduktionäquivalente ist genau die gleiche: Übertragung von Elektronen (und gleichzeitig gebundenem Wasserstoff)

Wenn molekularer Stickstoff fehlt, reduziert das *Nitrogenase*-System Protonen zu molekularem Wasserstoff. Das *Nitrogenase*-System hat also auch die Eigenschaft einer ATP-abhängigen, H₂-entwickelnden *Hydrogenase*. Da Wasserstoff auch gebildet wird, wenn N₂ vorhanden ist, kann man die H₂-Bildung auch in die Reaktion der N₂-Fixierung einbeziehen:



In den meisten, wenn nicht allen N₂-fixierenden Bakterien ist neben *Nitrogenase* eine (klassische) *Hydrogenase* vorhanden, die H₂ aktiviert. Die *Hydrogenase* dient offenbar dazu, den bei der N₂-Fixierung auftretenden Wasserstoff wieder nutzbar zu machen.

Regulation der Photosynthese für die Stickstoff-Fixierung in Einzelligen Cyanobakterien (II)



Schicke Bilder und Informationen wie z.B. der Bezug der Lichtreaktion zur Stickstofffixierung

http://www.uni-konstanz.de/FuF/Bio/kuepper/Homepage/Stickstoff-Fixierung_KK2008.pdf
z.B.