

Lämmastikuringe

Aineringses esineb lämmastik peamiselt järgmistes vormides: molekulaarne lämmastik (N_2), orgaaniliste ühendite lämmastik (taimedes, loomades, mikroobide biomassis ja mulla orgaanilises aines) ning nitraadi- ja ammooniumioonina. Mulla orgaanilises aines esineb lämmastik paljude erinevate ühenditena, milledest ligi pool on täpselt identifitseeritavad.

N-ringe võib vaadelda koosnevana kolmest alaringest:

Elemendi ringe on bioloogiliste oksüdeerimis- ja redutseerimisreaktsioonidega seotud lämmastiku ja molekulaarse lämmastiku muundumine erinevateks keemilisteks vormideks.

Fototroofne ringe on taimede poolt lämmastiku omastamine, mille liikumapanevaks jõuks on fotosüntees. Anorgaaniline lämmastik muudetakse lämmastiku sisaldavateks orgaanilisteks ühenditeks taimes.

Heterotroofne ringe on seotud orgaanilise aine lagundamise protsessiga.

Lämmastikuringe põhikomponendid on lämmastiku fikseerimine, nitrifikatsioon ja denitrifikatsioon.

79 % atmosfäärist moodustab gaasiline lämmastik (N_2). Gaasiline lämmastik seotakse lämmastikku fikseerivate bakterite poolt. Lämmastikuühendid (peamiselt ammoniaak NH_3) tekivad orgaanilise aine lagunemisel (**ammonifikatsioon**). Ammoniaak oksüdeeritakse bakterite poolt nitraatideks (**nitrifikatsioon**). Lämmastikuühendid satuvad atmosfääri fossiilsete kütuste põletamisel. Põllumajandusmaastikes lisandub lämmastik ökosüsteemi kunstväetiste kasutamisel. Taimed suudavad omastada lämmastikku ammooniumi ja nitraadi kujul. Lämmastikuringe on tasakaalustatud lämmastiku pideva tagastamisega atmosfääri N_2 kujul **denitrifikatsiooniprotsessi** vahendusel.

Lämmastiku mineralisatsioon võib tähendada nii summaarset anorg. lämmastiku ($NH_3 + NO_3^-$) tootmist või ainult ammooniumi tootmist.

Ammonifikatsioon tähendab org. lämmastiku bioloogilist muundumist ammooniumiks. Protsessi esimest etappi viivad läbi rakuvälised ensüümid: need depolümeeriseerivad valgud, aminosuhkrud ja nukleiinhapped.

I Eksoensüümid Valke lagundavad *prote(in)aa*sid ja *peptida*sid. Kitiini lagundavad *kitina*as ja *kitobia*as. Peptidoglükaani lagundab *lüsoso*üm. Nukleiinhappeid lagundavad *ribonuklea*sid ja *desoksüribonuklea*sid (jagunevad endo- ja eksonukleaasid). Ureaas lagundab urea CO_2 ja NH_3 -ks.

II Rakusised ensüümid Aminorühmade puhul toimub aminorühma eemaldamine aminohappe dehüdrogenaaside või oküdaaside vahendusel deamineerimise protsessis. Nukleotiidide lagundamine on mitmeetapiline protsess.

Enamasti on aminohapete, aminosuhkrute ja nukleiinhapete lagundamisel heterotroofsete mikroobide eesmärgiks saada energiat ja süsinikku. Ammonifikatsiooniprotsessi käigus vabanenud NH_3 võib käsitleda kui katabolismi kõrvalprodukti.

Lämmastiku immobilisatsioon on ammoniaagi muundumine orgaaniliseks lämmastikuks, mis on peamiselt seotud lämmastiku assimilatsiooniga mikroobide biomassi poolt. Mikroobid assimileerivad ammooniumi kahe biokeemilise raja kaudu: glutamaadi dehüdrogenaas ja glutamiini süntetaas-glutamaat süntaas (GOGAT). GOGAT rada kasutatakse juhul, kui ammooniumi kontsentratsioon on keskkonnas madal.

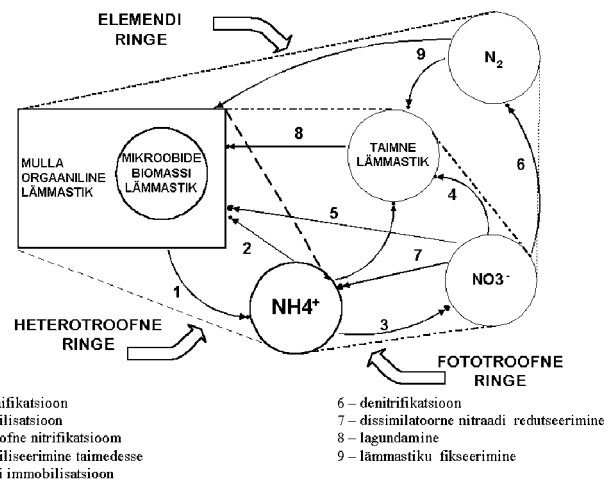
Mikroorganismide osa lämmastiku-ringes

Mikroorganismide funktsionaalsed rühmad, mis võtavad osa N-ringest.

- 1) nitrifitseerivad bakterid ($NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$)
- 2) denitrifitseerivad bakterid ($NO_3^-, NO_2^-, N_2O \rightarrow N_2$)
- 3) lämmastikku fikseerivad bakterid ($N_2 \rightarrow NH_3$)
- 4) nitritid ja nitraati ammonifitseerivad bakterid
- 5) ammoniaaki assimileerivad (s.o NH_3 orgaanilisse ainesse siduvad) mikroobid - kõik mikroorganismid
- 6) deamineerivad mikroorganismid (NH_3 eemaldamine aminohapetest, peptiididest ja valkudest) - bakterid ja osa vetikaid

Nitrifikatsioon

toimub obligaatsete kemolitoautotroofide vahendusel, protsess on aeroobne, selle käigus assimileeritakse CO_2 ja ammoniaak oksüdeeritakse nitritiks (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, ensüüm ammoniaagi monoooksügenaas) – *nitrifikatsiooni esimene etapp* ning nitrit nitraadiks (*Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira*; *Nitrospina*) – *nitrifikatsiooni teine etapp*. Ammoniaaki



oksüdeerivad bakterid moodustavad fülogeneetiliselt ühtse rühma (16 rRNA järjestuse põhjal). $\text{NH}_3 + 1.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}^+ + \text{H}_2\text{O}$ Osalevad ensüümid ammoniaagi monooksügenaas (AMO) ja hüdroksüülamiini oksüdüreduktaas. Ammoniaagi monooksügenaas on membraanseoseline ensüüm, mis esineb kõikidel autotroofsetel ammoniaagioksüdeerijatel ja võibolla ka heterotroofsetel nitrifitseerijatel. On leitud, et ensüüm on väga sarnane metaani monooksügenaasiga metaani oksüdeerivatel bakteritel. Ammooniumi oksüdeerivad bakterid võivad sisaldada nitriti reduktaasi, mis võib redutseerida nitriti N_2O -ks. Aeroobsetes tingimustes ei ole see protsess oluline, kuid hapniku kontsentratsiooni vähenemisel see protsess kiireneb. Ammoniaagi oksüdeerimise tulemusena mulla pH langeb, sest keskkonda eraldatakse H^+ -ioone.

Nitriti oksüdeerimine: summaarne reaktsioon $\text{NO}_2^- + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{NO}_3^-$

Protsessi viib läbi membraaniseoseline ensüüm nitriti oksüdüreduktaas, mis kannab üle hapniku vee molekulist ja paari elektrone elektronitranspordiahelale: $\text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NO}_3^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$

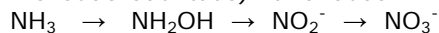
Nitrifikatsiooni kiirus sõltub nitrifitseerijate arvukusest (tavaliselt on arvukus väike: 10^3 - 10^4 rakku g^{-1}), substraadi kontsentratsioonist, temperatuurist (opt. 25-30°C), pH (opt 7.5-8.0), hapniku kontsentratsioonist. Nitrifikatsiooniks on vaja: min O_2 : NH_4 -N ~4.3; min aluselisuus (CaCO_3): NH_4 -N ~8.6. Nitrifikatsiooni üheks tagajärjeks on lämmastiku väljauhtumine mullast, sest erinevalt ammooniumist ei absorbeeru nitrit ja nitraat mullaosakeste pinnale. Nitrifikatsiooni inhibeerimiseks kasutakse põllumajanduses erinevaid kemikaale (N-serve, DCD).

Viimastel aastatel on avastatud bakterid, kes kuuluvad seltsi *Planctomycetales* ning kes on võimeline anaeroobseks ammoniaagi oksüdeerimiseks ja nitriti redutseerimiseks (nn. ANAMMOX protsess ehk ANAerobic AMMonia OXidation). Selle protsessi käigus oksüdeeritakse ammoniaak või redutseeritakse nitrit hüdroksüülamiiniks (NH_3 või $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH}$). Seejärel reageerib hüdroksüülamiin ammooniumiga hüdrasiiniks, mis omakorda oksüdeeritakse molekulaarseks lämmastikuks ($\text{NH}_2\text{OH} + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2\text{H}_2 \rightarrow \text{N}_2$). Oluline ensüüm on hüdroksüülamiini oksüdüreduktaas, mis katalüüsib hüdrasiini ja hüdroküülamiini oksüdeerimist. Sellised bakterid on erakordselt aeglase kasvuga (jagunevad vaid kord kahe nädala jooksul). Huvitav on asjaolu, et nende uurimisel biofilmis on leitud, et ANAMMOX bakterid on aktiivsed vaid sel juhul, kui rakud on saavutanud teatava tiheduse (10^{10} – 10^{11} rakku milliliitris). *Planctomycetales* seltsi bakteritel puudub peptidoglükaan ja neil on diferentseerunud tsütoplasma. Ülejäänud selle seltsi liikmed on aeroobsed kemoorganotroofid.

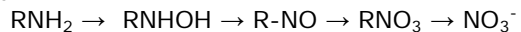
Heterotroofne nitrifikatsioon

Autotroofsetele nitrifitseerijatele bakteritele ebasoodsates tingimustes võib nitrifikatsioon toimuda heterotroofsete mikroorganismide elutegevuse tulemusena. **Heterotroofseks nitrifikatsiooniks nimetatakse heterotroofsete mikroorganismide poolt nitriti ja nitraadi produtseerimist ammoniaagist.** Heterotroofne nitrifikatsioon ei ole seotud energia tootmisega. Kõikide heterotroofsete mikroorganismide kasvuks on rangelt vajalik orgaanilise substraadi oksüdeerimine. Heterotroofsed nitrifitseerijad on tuntud oma võime poolest nitrifitseerida ja denitrifitseerida samaaegselt. Üldiselt arvatakse, et heterotroofsete nitrifitseerijatena domineerivad seened (*Aspergillus*) ja seega nitrifikatsioon omistatakse sageli vaid nende mikroorganismide heterotroofseks aktiivsuseks. Tegelikult aga võivad heterotroofset nitrifikatsiooni läbi viia ka mõned bakterid (*Thiosphera pantotropha*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*). Kuigi heterotroofse nitrifitseerija potentsiaalne nitrifikatsioon biomassi ühiku kohta pole võrreldav kemoautotroofidega, arvatakse ometi, et suur heterotroofide biomass suurendab oluliselt nende poolt läbiviidava nitrifikatsiooni osakaalu keskkonnas. Üldiselt ollakse seisukohal, et looduses on paljudes süsteemides esikohal heterotroofne nitrifikatsioon.

Arvatakse, et heterotroofne ammoniaagi oksüdatsioon toimub samal viisil nagu autotroofne ammoniaagi oksüdatsioon üle vaheühendi hüdroksüülamiin samade ensüümide (ammoniaagi monooksügenaas ja hüdroksüülamiini oksüdüreduktaas) vahendusel:



Samas teatakse toimuvat (eriti seente hulgas) orgaanilist rada, mis on seotud amiinide või amiidide oksüdatsiooniga

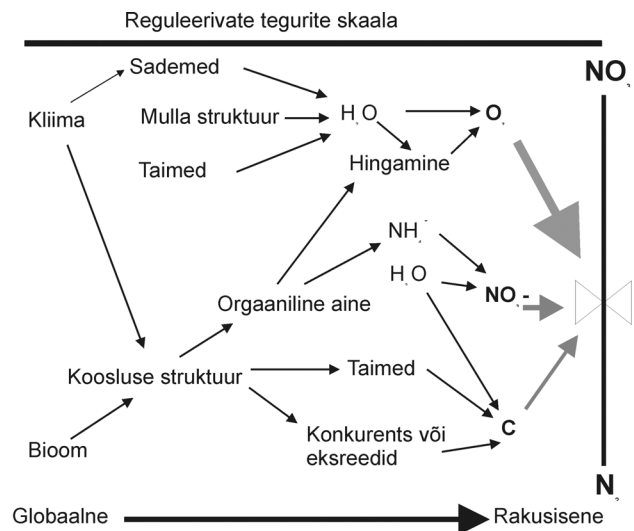


Laboratoorses tingimustes on heterotroofseid nitrifitseerijaid keeruline uurida, sest pole olemas selektiivset rikastamis- või isoleerimismeetodit heterotroofsete nitrifitseerijate jaoks. Selliste liikide kasvu soodustav keskkond peab sisaldama orgaanilist süsinikku ja lisaks lämmastikku; sellises keskkonnas aga võib kasvada suur hulk mulla mikroobikooslusest, kellest enamik pole suutelised lämmastikku oksüdeerima. Siinkohal pole alati abi ka molekulaarsetest uurimismeetoditest, sest heterotroofsed ammoniaaki oksüdeerivad bakterid ei ole märklauaks ei *amoA*-le seonduvatele praimeritele ega ka 16S rDNA-le seonduvatele praimeritele ja seetõttu sellised lähenemised alahindavad nende mikroorganismide funktsionaalset mitmekesisust. Heterotroofse nitrifikatsiooni lõppprodukt on sageli nitrit, seega võib heterotroofne nitrifikatsioon toota substraati autotroofsete nitrifitseerijate jaoks ning heterotroofsetele denitrifitseerijatele (viimase protsessi käigus tekivad gaasilised lämmastikuühendid, näiteks NO, NO_2 ja N_2O , millised on olulised atmosfäärikeemia seisukohalt).

Kuna heterotroofsed nitrifitseerijad ei tooda selle protsessi käigus energiat, on ebaselge, millist kasu heterotroofsed nitrifitseerijad ammmoniaagi või orgaaniliste lämmastikühendite oksüdeerimisest saavad. Näiteks arvatakse, et oksüdeeritud orgaanilise lämmastiku vaheprodukt hüdroksamaat käitub keskkonnas siderofoorina ehk ühendina, millega seotakse keskkonnast rauda.

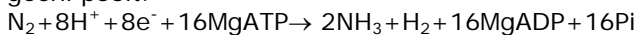
Dissimilatoorne nitraadi redutseerimine toimub fakultatiivse metabolismiga bakterite vahendusel, kes kasutavad hapniku puudumisel elektroni aktseptorina nitraati. ($\text{NO}_3^- + 4\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{H}_2\text{O}$). Energiat saadakse protsessi esimesest etapist (nitraadi redutseerimine nitritiks), teise etapi ($\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_3$) eesmärgiks on regenereerida NAD ja see toimub juhul, kui keskkonnas on piisavalt org. süsinikku. Üksnes nitraati nitritiks redutseerivaid baktereid nimetatakse nitraadi hingajateks (nitraadi redutseerijad), tüüpiline näide enterobakterid.

Denitrifikatsioon on dissimilatoorse nitraadi redutseerimise põhivorm ($\text{NO}_3^- + 5\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{N}_2 + 6\text{H}_2\text{O}$). Denitrifitseerijad bakterid moodustavad 0.1 kuni 5% kogu bakterikooslusest mullas Enamik denitrifitseerivaid baktereid on heterotroofid ja kuuluvad erinevatesse taksonoomilistesse ja fülogeneetilistesse rühmadesse, kõige sagedamini perekondadest *Pseudomonas* ja *Bacillus*. Võtmeensüümid denitrifikatsiooni protsessis on **nitraadi reduktaas** ja **nitriti reduktaas** (kaks vormi: Cu-Nir ja heme-Nir). Protsessi kiirus sõltub hapniku, nitraadi ja org. süsiniku kontsentratsioonist, keskkonna pH, temperatuurist. Denitrifikatsiooniks vajalik min COD:NO₃-N ~2.9. inhibeerivad atsetüleen, CO₂, tsüaniid, nitrapüriin, pestitsiidid, sulfaat. D. intensiivsus metsas < 1kg N ha⁻¹ aasta⁻¹, raiesmikul 3-6 kg N ha⁻¹ aasta⁻¹. Denitrifikatsiooni saagis on 0.44 kg biomass/kg orgaanilise aine kohta (aeroobsel hingamisel 0.5). Assimilatoorse denitrifikatsiooni abil seotakse nitraatlämmastikku taimede, seente ja prokarüootide biomassi ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_2\text{OH} \rightarrow \text{NH}_3 \rightarrow \text{R-NH}_2$).



Denitrifikatsiooni reguleerivad tegurid erinevatel ruumilistel skaaladel.

Lämmastiku fikseerimine. N₂ redutseeritakse **nitrogenaas-kompleksi** (dinitrogenaas-reduktaas (Fe valk) ja dinitrogenaas (MoFe valk)) vahendusel. Nitrogenaas on tundlik hapniku suhtes, vajab Mg²⁺ aktiveerimiseks, ADP inhibeerib. Protsess vajab palju energiat (ATP), protsessi efektiivsus on keskmiselt 15 mg N g⁻¹ süsinikuallika kohta (13 kg tonni süsiniku kohta). Nitrogenaas moodustab ca 10% raku valkudest, kuid osakaal võib olla ka suurem. Nitrogenaas-kompleksi formeerumist inhibeerivad lämmastikühendid keskkonnas (NH₃, NO₃, org. N). Bakterite nitrogennasi süsteem on kodeeritud ja reguleeritud vähemalt 20 geeni poolt.



Lisaks N₂ võib nitrogenaasi vahendusel redutseerida HCN, HN₃, CH₃NC, C₂H₂- atsetüleen. N₂ seovad ainult üksikud bakteriliigid. N₂ sidumine toimub nii aeroobsetes kui ka anaeroobsetes tingimustes. N₂ seovad järgmised tsüanobakterite liigid - *Anabaena*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, fototroofsed bakterid - *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, kemotroofsed bakterid - *Spirillum*, *Azotobakter*, *Beijerinckia*, *Rhizobium*, *Escherichia*, *obligaatseid ja fakultatiivsed anaeroobid* - *Clostridium pasteurianum* ja *Klebsiella pneumoniae*, samuti mõned arhede liigid. **Lämmastiku sidumine vabalt elavate mullabakterite poolt:** selleks on vaja molübdeeni, rauda, Mg, ATP. bakterid kasutavad nitrogenaasi kaitsmiseks hapniku eest erinevaid mooduseid: anaeroobid fikseerivad N₂ üksnes hapniku puudumisel, mikroaerofiilid teevad seda väikeses hapniku konts. juures, kiire hapniku tarbimine hingamisel raku sees (*Azotobacter*), spetsialiseeritud rakud - heterotsüstid ja vesiikulid, taimed toodavad leghemoglobiini, mis kaitseb juuremügarates elavaid lämmastikufikseerijaid.

Assotsiatsioon taime ja N₂ siduvate bakterite vahel: lämmastiku sidumine fülloosfääri ja risosfääri bakterite poolt; 5-25 kg N ha⁻¹ a⁻¹. N₂ sidumine toimub intensiivselt mikroelupaikades lühikestel perioodidel.

Lämmastiku sidumine sümbioosis 1.-*Rhizobium* ja liblikõielised taimed, varasem perekond *Rhizobium* on jaotatud 4 (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*) perekonda kokku 16 liigiga. Noodulite moodustumine taime juurel- selleks vajalikud geenid paiknevad plasmiidis. Need geenid jagunevad kaheks: tüüpilised noodulite moodustamise geenid (*nod* A, B, C, D) ja peremehe spetsiifilised noodulite moodustamise geenid (*nod* E, F, G, H, I, J, L, M, P, Q). Lämmastiku fikseerimine algab noodulis 8-16 päeva pärast bakteri tungimist taimerakku. Noodulid koosnevad neljast erinevast tsoonist. Aktiivne N₂ sidumine

toimub tsoonis, kus paikneb leghemoglobiin. Sõltuvalt nooduli tüübist eksporditakse NH_3 või glutamaati, aspartaati, püriine peremeestaime rakkudesse. Noodulite moodustumise puhul on tegemist peremeestaime spetsiifilisusega: maapähkliil võivad nooduleid moodustada mitmed erinevad *Bradyrhizobiumi* liigid, Lähis-Ida hernesordid ei nakatu Euroopa hernesortidel kasvavate *Rhizobiumi* liikidega. Vajalikud keskkonnatingimused: mulla neutraalne pH, mesofiilid, fosfor- ATP, molübdeenja raud- nitrogeenaas ja leghemoglobiin, kaltsium. 65 % põllumajanduses kasutatavast lämmastikust on saadud bioloogiliste protsesside tulemusel.

Frankia moodustab nooduleid katteseemnetaimedel lepp (*Alnus*), mürt (*Myrica*), *Purshia*;

Azolla/Anabaena (veesõnajalg + tsüanobakter *Anabaena azollae*); seob kuni 2 kg N ha^{-1} päevas, madal C/N suhe, kasutatakse riisipõldude väetamiseks Aasias.

Samblikud - seen + tsüanobakter.