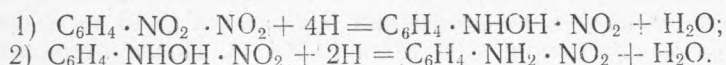


М. В. ФЕДОРОВ

**ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ
В ПРИСУТСТВИИ ОРТО-ДИНИТРОБЕНЗОЛА В КАЧЕСТВЕ
АКЦЕПТОРА ВОДОРОДА**

(Представлено академиком А. А. Рихтером 3 VIII 1946)

В ряде схем, предложенных для объяснения химизма фиксации азота атмосферы (4, 5, 11, 12), допускается, что в качестве первичного продукта фиксации азота образуется аммиак. Если бы такое допущение, основанное на действительном нахождении аммиака в культурах азотобактера, было вполне справедливо, то на 1 г использованного водорода органического вещества, вероятно, фиксировалось бы определенное количество азота атмосферы. Однако нашими опытами было установлено, что прямой зависимости между использованным водородом и фиксированным азотом не наблюдается. В связи с тем, что этот вопрос имеет принципиальное значение, нами были проведены дополнительные опыты с значительным отвлечением водорода к необратимо связывающему акцептору. Как было установлено В. Липшицем (10) и А. Гуревичем (1, 2), орто-динитробензол может служить хорошим акцептором водорода при окислении органического вещества во время дыхания и восстанавливается им сначала до нитро-фенилгидроксиламина, а затем до нитранилина по уравнению:



Из этого уравнения следует, что для полного отвлечения водорода из сферы реакции с азотом требуется использовать на 1 граммолекулу сахара 2 граммолекулы орто-динитробензола. Как бы показано А. Гуревичем, это вещество не ядовито для живых клеток и легко поступает в них через полупроницаемую оболочку. Но так как продукты его восстановления легко растворяются в воде и при значительной концентрации могут оказать неблагоприятное влияние на живую клетку, то в первом опыте нами было испытано влияние на продуктивность фиксации азота разных концентраций орто-динитробензола. Опыт ставился в эрленмейеровских колбах объемом на 300 мл. В каждую колбу наливалось 100 мл жидкой питательной среды для азотобактера (наша модификация) с 2,0 г глюкозы. После стерилизации среда инфицировалась 1 мл суспензии *Azotobacter agile*, и колбы ставились в термостат с температурой 25° С на 60 дней. За это время орто-динитробензол был восстановлен до нитранилина через промежуточную стадию нитро-фенилгидроксиламина. По окончании опыта была проверена чистота культуры и определено содержание неиспользованной глюкозы и общего азота. Результаты опыта приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Продуктивность фиксации азота атмосферы азотобактером в присутствии орто-динитробензола в качестве акцептора водорода

№	Концентрация добавленного орто-динитробензола в г на 100 мл среды	Восстановлено орто-динитробензола до нитрилина в г	Содержалось водорода в использованной глюкозе	Затрачено водорода в г на восстановление динитробензола	Фиксировано азота атмосферы в мг			Продуктивность фиксации азота в % от контроля	Потреблено глюкозы в г
					на 1 г глюкозы в отдельной культуре	на 1 г глюкозы в среднем	на 1 грамм-молекулу		
1	0,00 (контроль)	0,00	0,133	0,00	6,32	5,82	1 047,6	100	2,00
		0,00	0,133	0,00	5,32				2,00
2	0,01	0,01	0,133	0,00085	7,70	7,40	1 332,0	127,2	2,00
		0,01	0,133	0,00085	7,09				2,00
3	0,05	0,05	0,080	0,00425	6,40	7,45	1 339,0	128,0	1,20
		0,05	0,060	0,00425	8,50				0,90
4	0,10	0,10	0,080	0,00850	7,25	7,34	1 321,2	126,1	1,20
		0,10	0,080	0,00850	7,42				1,20
5	0,25	0,25	0,080	0,02125	11,75	9,92	1 785,6	170,3	1,20
		0,25	0,066	0,02125	8,10				1,00

Как можно видеть из цифр табл. 1, отвлечение водорода на восстановление орто-динитробензола, достигшее в варианте № 5 34% всего запаса водорода в использованной глюкозе, не только не приводит к понижению продуктивности фиксации азота, но даже, наоборот, повышает ее, что указывает на отсутствие прямой связи между фиксацией азота и превращениями водорода используемого органического вещества. Получив такой результат, мы решили, для большей убедительности, повторить опыт, но с использованием больших доз орто-динитробензола. Опыт ставился в эрленмейеровских колбах объемом на 750 мл. В каждую колбу наливалось 200 мл жидкой питательной среды, содержащей глюкозу в концентрации 0,025 моля (0,45 г) и орто-динитробензол в концентрации 0,03 моля (0,504 г). После стерилизации питательная среда была инфицирована 1 мл суспензии *Azotobacter agilis*

Таблица 2

Влияние орто-динитробензола на интенсивность фиксации *Azotobacter agilis* азота атмосферы

Варианты опыта	Восстановлено динитробензола в г	Потреблено глюкозы в г	Содержалось водорода в глюкозе в мг	Затрачено водорода на восстановление динитробензола в мг	Фиксировано азота атмосферы в мг		Продуктивность фиксации азота в % от контроля	Число клеток азотобактера в культуре
					на 1 г использованной глюкозы	на 1 г-моль		
Контроль	0,00	0,450	30,0	0,00	6,85	1 270,8	100,0	1,793 · 10 ⁸
		0,450	30,0	0,00	7,27			
0,03 моля орто-динитробензола	0,504	0,450	30,0	18,0	6,70	1 333,8	104,9	2,686 · 10 ⁸
		0,450	30,0	18,0	8,13			

и поставлена в термостат с температурой 30° С на 15 дней. По окончании этого срока были определены титр клеток азотобактера, количество потребленного сахара и общего азота (модификация метода Иодельбауэра). Полученные результаты приведены в табл. 2.

Так как определение азота орто-динитробензола сопряжено с известными трудностями, то в этом опыте был произведен еще и учет числа развившихся клеток азотобактера. Этот показатель весьма важен для оценки общей продуктивности фиксации азота, поскольку азот нитро-группы, а также и амино-группы нитранилина не усваивается азотобактером. Как можно видеть из табл. 2, количество развившихся клеток азотобактера в этом варианте опыта было несколько выше, чем в параллельном варианте без орто-динитробензола. Эти бесспорные факты определенно показывают, что между содержанием водорода в веществе и количеством фиксированного азота атмосферы нет количественной зависимости. Кроме того, они позволяют сделать еще одно важное заключение: между энергетическим выходом окислительной реакции и фиксацией азота атмосферы также нет прямой количественной зависимости. В тех случаях, когда больше половины водорода использованной глюкозы направляется на восстановление орто-динитробензола, выход энергии, конечно, ниже, чем в случае сжигания водорода до воды при его окислении молекулярным кислородом, а продуктивность фиксации азота остается довольно высокой. Получив такой результат, мы сделали попытку установить, может ли орто-динитробензол целиком заменять молекулярный кислород в окислительных процессах у азотобактера. С этой целью был поставлен еще один опыт с густой суспензией азотобактера в строго анаэробных условиях. Опыт ставился в колбах Вюрца объемом на 1000 мл. В колбу добавлялось 250 мл питательной жидкости, содержащей 2 г глюкозы и около 20 г азотобактера (живой вес), выращенного на маннитном агаре. Содержание азота в азотобактере отвечало 28,4 мг. После добавления нужных соединений из колбы был выкачан воздух до остаточного давления в 25 мм и заменен чистым азотом. Затем колба была вторично эвакуирована до остаточного давления в 25 мм и вновь заполнена чистым азотом. При такой системе удаления воздуха в колбе остались только следы кислорода, не превосходившие 0,2—0,3 мл. В таком виде колбы ставились в термостат с температурой 30° С на 50 дней. По окончании этого срока были произведены соответствующие анализы, результаты которых приведены в табл. 3.

Таблица 3

Продуктивность фиксации азота атмосферы *Azotobacter agile* в бескислородной среде, содержащей орто-динитробензол в качестве единственного акцептора водорода

Варианты опыта	Потреблено сахара за время опыта в г	Содержалось водорода в использованной глюкозе в мг	Использовано водорода на восстановление динитробензола в мг	Баланс азота в культуре в мг			Количество клеток азотобактера в культуре
				содержалось азота в клетках азотобактера до опыта	найдено азота в клетках азотобактера после опыта	фиксировано азота из атмосферы	
2 г глюкозы + 4 г динитробензола	0,675	45,0	45,0	28,4	35,13	6,73	14,8 · 10 ¹⁰
2 г глюкозы + 2 г нитранилина	0,125	8,33	0,0	28,4	29,0	0,6	12,05 · 10 ¹⁰

В результате опыта выяснилось, что полное лишение азотобактера свободного кислорода не лишает его способности продолжать свою жизнедеятельность, если в среде имеются подходящие акцепторы водорода. В их присутствии создаются условия для потребления сахара и даже роста клеток азотобактера. Однако этот процесс совершается только в присутствии орто-динитробензола в качестве акцептора водорода. В параллельном опыте с добавлением в качестве акцептора водорода нитранилина потребление сахара было ничтожным. Повидимому, вторая нитро-группа из динитробензола не подвергается дальнейшему восстановлению и не может служить акцептором водорода. Из этих данных следует, что в строго анаэробных условиях, но в присутствии подходящих акцепторов водорода азотобактер может фиксировать азот атмосферы и размножаться. Этот факт представляет большой интерес, так как он указывает нам на возможное наличие общности в механизме фиксации азота у азотобактера и *Clostridium Pasteurianum*. Помимо этого, способность азотобактера фиксировать азот атмосферы в бескислородной среде еще раз подтверждает, что количественной зависимости между водородом радикала и фиксацией азота не существует. Фиксация атмосферного азота азотобактером, в первую очередь, связана с превращениями углерода радикала, в частности с образованием карбонильных групп при его окислении. По месту этих групп и происходит, видимо, присоединение азота сначала к катализатору фиксации азота, а затем от него и к другим веществам, синтезирующимся в клетке.

Лаборатория физиологии растений
и микробиологии Московской
сельскохозяйственной академии
им. К. А. Тимирязева

Поступило
3 VIII 1946

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. Гуревич, Сб. «Новое в сельском хозяйстве», 1938. ² А. Гуревич, ДАН, 48, № 2 (1945). ³ В. Буткевич и Н. Колесникова, ДАН, 33, № 1 (1941). ⁴ С. Костычев, А. Рыскальчук и О. Швецова, Тр. ГИОА, 1 (1926). ⁵ С. Костычев и А. Шелоумова, Изв. АН СССР, сер. биол., 1 (1931). ⁶ М. В. Федоров, Микробиология, 14, № 2 (1945). ⁷ М. В. Федоров, Микробиология, 14, № 3 (1945). ⁸ М. В. Федоров, ДАН, 48, № 8 (1945). ⁹ М. В. Федоров, ДАН, 49, № 8 (1945). ¹⁰ W. Liepschitz, G. Hertwig, Pflüg. Arch., 191, 51 (1921). ¹¹ S. Winogradsky, Ztrbl. für Bakt., 2 Abt., 97, 399 (1938).