

Е. Н. ГАПОН

ТЕОРИЯ ФИКСАЦИИ АЗОТА АТМОСФЕРЫ МИКРООРГАНИЗМАМИ

(Представлено академиком Д. Н. Прянишниковым 1 IV 1947)

1. Хотя изучению биологической фиксации азота атмосферы посвящены многочисленные исследования, однако до настоящего времени общепринятой теории этого процесса не создано. Подводя итоги исследований в этой области, Прянишников⁽¹⁾ приходит к заключению, что только две теории могут претендовать на обсуждение. Это — гидрирование азота, приводящее к образованию аммиака, или гидратация азота, затем восстановление гидрата азота, приводящее к образованию гидроксилamina.

Впервые идея о синтезе аммиака микроорганизмами из газообразного азота и водорода была высказана Виноградским в 1894 г. по отношению к анаэробному *Clostridium pasterianum*. Работа Виноградского⁽²⁾ заканчивается следующей замечательной фразой: „Чтобы резюмировать в немногих словах, я скажу, что в нашем случае явление предстает как результат столкновения газообразного азота и водорода, рождающегося внутри живой протоплазмы, и допустимо, что непосредственным результатом этого мог бы быть синтез аммиака“. По отношению в аэробному *Azotobacter* экспериментальные доказательства образования аммиака как первичного продукта фиксации азота были даны Костычевым⁽³⁾, Виноградским⁽⁴⁾ и Буткевичем⁽⁵⁾. В общей форме та же мысль была высказана Виландом⁽⁶⁾. Однако никем из авторов, рассматривавших аммиак как первичный продукт фиксации азота, не было дано теории этого процесса, протекающего при обычных температурах и давлении.

2. Относительно природы катализатора фиксации азота до последнего времени не было получено никаких определенных данных. Блом⁽⁷⁾, полагая, что первичным продуктом фиксации азота является гидроксиламин, выдвинул гипотезу об участии в процессе ферментной системы $Fe^{++} — Fe^{+++}$. Виртанен и Лайне⁽⁸⁾ показали, что в клубеньковых бактериях содержатся пигменты типа гемоглобина и метгемоглобина. Тип адсорбции азота ферментом не установлен. По отношению к синтезу Габера известно, что на железном катализаторе адсорбция азота является активированной и скорость активированной адсорбции определяет скорость синтеза аммиака⁽⁹⁾; синтез аммиака идет через промежуточные продукты — нитрид и имид. Наконец, мною⁽¹⁰⁾ было показано, что при фиксации азота атмосферы азотобактером субстраты являются источниками водорода. Эти факты очень важны для построения теории.

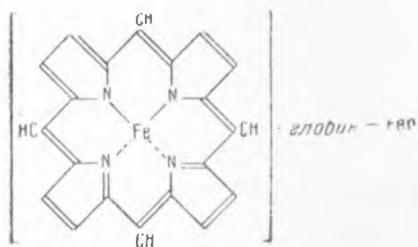
3. Основные положения предлагаемой теории фиксации азота атмосферы микроорганизмами следующие:

а) Адсорбция азота ферментом является активированной; скорость этой адсорбции определяет скорость образования аммиака. Образова-

ние аммиака из активного азота и молекулярного водорода происходит практически моментально.

б) Для микроорганизмов субстраты являются источником молекулярного водорода.

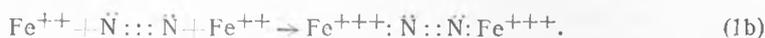
в) По химическому составу фермент принадлежит к веществам типа гемоглобина:



Активированная адсорбция азота ферментом приводит к образованию активного нитрида (или активного азота), содержащего избыток энергии, равный сумме энергии активации адсорбции и теплоты адсорбции:



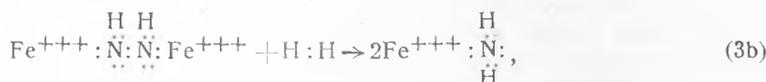
или, выражая электронными формулами (из символа фермента приведено только железо):



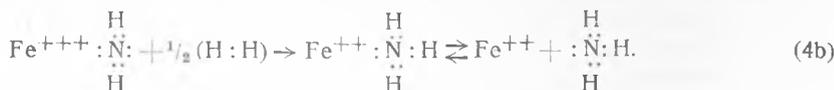
Если в каталитической ячейке имеется водород, то нитрид восстанавливается прямо до аммиака или через стадии диимида



амида



и, наконец,



Реакция (4) приводит к регенерации фермента и к десорбции аммиака, ассимилируемого микроорганизмом.

При недостатке водорода внутри клетки энергия молекул активного нитрида рассеивается и образуются нормальные молекулы, уже неспособные к реакции с водородом. Но эти молекулы способны к гидролизу, приводящему к образованию метгемоглобина и диимида:



Гидратация диимида дает гидросиламин⁽¹¹⁾:



Следовательно, развиваемая теория рассматривает гидросиламин как аномальный продукт фиксации азота. Гидросиламин в достаточ-

ной концентрации подавляет фиксацию азота азотобактером и его размножение⁽¹²⁾, так как известно⁽¹³⁾, что он превращает гемоглобин в метгемоглобин. Наоборот, гидразин восстанавливает метгемоглобин в гемоглобин⁽¹⁴⁾; поэтому, подавляя фиксацию азота, он не останавливает размножения азотобактера⁽¹²⁾, т. е. является для азотобактера источником азота. Прибавление аммиачных соединений к культуре азотобактера приостанавливает фиксацию азота вследствие обратимости последней стадии реакции (4). Восстановление азотобактером нитритов и нитратов до аммиака, вероятно, не связано с действием фермента фиксации; прекращение же фиксации азота в этих случаях определяется обратимой стадией реакции (4).

Адсорбция других газов ферментом, например H_2 , O_2 , CO , не требует энергии активации. Образование соответствующих продуктов адсорбции:



должно приводить к понижению фиксации азота. Действительно установленное экспериментально парализующее действие CO на фермент азотобактера⁽¹⁵⁾ может быть поставлено в параллель с действием CO на гемоглобин крови. Точно так же понижающее действие H_2 на фиксацию азота азотобактером и клубеньковыми бактериями находит себе естественное объяснение.

Предлагаемая теория позволяет вывести количественные законы фиксации азота, подтверждение которых можно найти в опубликованных экспериментальных данных ряда ученых. Ограничусь выводом одного из основных законов, а именно зависимости количества фиксированного азота n мг от навески субстрата g г. Число h -атомов H , связанного с углеродом в навеске g г субстрата, равняется $(h/M)g$, где M — молярный вес субстрата, h — число h -атомов H в 1 моле субстрата. Если бы весь образовавшийся в клетках водород пошел на образование аммиака, то количество образовавшегося аммиака в мг равнялось бы $4670(h/M)g$. Но так как в действительности используется только некоторая часть водорода η , то окончательно получаем:

$$n = \eta 4670 \frac{h}{M} g. \quad (1)$$

Введем величину $\frac{n}{g} = a \frac{\text{мг N}}{\text{г субстрата}}$ и перепишем уравнение (1) следующим образом:

$$\frac{Ma}{h} = \eta 4670 = f \frac{\text{мг N}}{\text{г-атом H}}. \quad (2)$$

Коэффициент фиксации азота азотобактером f , как было показано мною⁽¹⁰⁾ для 19 самых разнообразных субстратов, экспериментальные данные для которых получены Федоровым⁽¹⁶⁾, представляет величину постоянную и равную 220 мг N/г-атом H. Отсюда $\eta = 0,05$, т. е. только 5% водорода субстрата используются при фиксации азота. Только исходя из гипотезы Виноградского — Костычева можно было вывести подтверждающееся экспериментально уравнение (2).

Ферментная система *Clostridium pasterianum*, возможно, отлична от только что рассмотренной, так как у анаэробных бактерий не были найдены дериваты, содержащие порфириновый цикл.

Лаборатория
биофизико-химических проблем
Московской сельскохозяйственной академии
им. К. А. Тимирязева

Поступило
1 IV 1947

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Д. Н. Прянишников, Азот в жизни растений и в земледелии СССР, 1945, стр. 90. ² S. Winogradsky, C. R., 118, 353 (1894). ³ S. Kostytschew, A. Ryskaltshuk u. O. Schwezova, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 154, 1 (1928). ⁴ S. Winogradsky, Ann. Inst. Pasteur, 48, 269 (1932); C. R., 209, 616 (1939). ⁵ В. С. Буткевич и Н. А. Колесникова, ДАН, 33, 66 (1941). ⁶ H. Wieland, Ber., 55, 3639 (1922). ⁷ J. Blom, Ztb f. Bakt., II Abt., 84, 60 (1931). ⁸ A. S. Virtanen and Laine, Nature, 157, № 3975, 19 (1946). ⁹ P. H. Emmet and S. Brunaer, J. Amer. Chem. Soc., 56, 35 (1934). ¹⁰ Е. Н. Гапон, Микробиология, 16, № 3, 204 (1947). ¹¹ A. S. Virtanen, Trans. of the Third Commission Intern. Soc. Soil Sci., 1939. ¹² М. В. Федоров, ДАН, 52, 81 (1946). ¹³ E. Letsche, Hoppe-Seyler's Z. f. physiol. Chem., 80, 412 (1912). ¹⁴ G. Quagliariello, Arch. di scienze biol., 5, 194 (1923). ¹⁵ C. Lind and P. Wilson, Arch. Biochem., 1, 59 (1942), цит. по М. В. Федорову, Микробиология, 15, 537 (1946). ¹⁶ М. В. Федоров, Микробиология, 14, 94 (1945).