

М. В. ФЕДОРОВ

УЧАСТВУЕТ ЛИ ГЕМИННЫЙ ФЕРМЕНТ В ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ?

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 10 III 1949)

Весьма широкое распространение в литературе получила выдвигнутая в 1928 г. Бломом⁽¹⁾ теория, согласно которой фиксация молекулярного азота азотобактером осуществляется при участии геминного фермента, обслуживающего окислительные процессы при дыхании у большинства аэробных организмов. Ход процесса при участии этого каталитического агента можно представить следующей схемой:

1. $R \cdot Fe^{++} + N \equiv N + 2H_2O \rightarrow [R \cdot Fe^{++}] \cdot HO \cdot NH \cdot NHOH$.
2. $[R \cdot Fe^{++}] \cdot HO \cdot NH \cdot NHOH + 2H^+ \rightarrow R \cdot Fe^{+++} + 2NH_2OH$.

Основанием для этой гипотезы послужили два факта: 1) в культурах *Azotobacter agile* были найдены автором гипотезы следы гидроксиламина и 2) при избыточном содержании кислорода в среде (более 60% газовой смеси) фиксация молекулярного азота прекращается вследствие конкуренции кислорода с азотом за присоединение к ферменту. Однако на пути принятия этой схемы имеются большие трудности.

Прежде всего возникает вопрос: почему не фиксируют молекулярного азота другие организмы, располагающие этим ферментом? Во-вторых, переход азота в связанную форму за счет воды требует огромных давлений (10^{51} атм.) и, кроме того, мы⁽²⁻³⁾ показали на большом экспериментальном материале с использованием различных блокирующих веществ, что дыхание и фиксация азота обслуживаются различными ферментными системами. На основе этих данных можно было считать установленным, что геминный фермент не принимает участия в фиксации молекулярного азота азотобактером. Однако в 1947 г. Е. Гапоном⁽⁴⁾ была опубликована аммиачная модификация теории фиксации азота атмосферы микроорганизмами, основанная на участии геминного фермента. Согласно этой модификации, процесс должен идти следующим образом:

1. $2R \cdot Fe^{++} + N \equiv N \rightarrow 2R \cdot Fe^{+++} \cdot N_2$.
2. $2R \cdot Fe^{+++} \cdot N_2 + 3H_2 \rightarrow 2R \cdot Fe^{++} + 2NH_3$.

При первом же знакомстве с последней модификацией „железного катализа“ азота становится ясной ее искусственность. В самом деле, для расщепления одной молекулы азота используются две молекулы фермента, которые должны располагаться на очень близком расстоянии друг от друга и образовывать межмолекулярную щель, в которую атомы азота будут „загоняться“ для расщепления. Как это происходит в живой протоплазме клеток азотобактера, автор схемы никаких указаний не дает. Однако понятно, что при таком ходе процесса

фиксация молекулярного азота азотобактером превращается в чистейшую случайность. Между тем, нами (2) было давно уже показано, что азотобактер фиксирует совершенно определенное количество азота атмосферы на 1 ккал. запаса химической энергии в используемом им безазотистом органическом веществе (примерно 2 мг), независимо от того, какова химическая структура этого вещества. Из этого следует, что фиксация молекулярного азота азотобактером представляет собою строго закономерный процесс, определяющий возможность развития этого организма и выработанный им в процессе исторического приспособления к условиям окружающей среды. Кроме того, Гапоном принимается, что восстановление азота, адсорбированного геминным ферментом, осуществляется молекулярным водородом, а между тем известно, что молекулярный водород в культурах азотобактера не образуется и не может образоваться вследствие того, что этот аэробный организм развивается на самой поверхности питательного субстрата в присутствии избыточных доз кислорода, служащего хорошим акцептором для активированного водорода. Молекулярный же водород образуется только в том случае, если в среде имеется недостаток в акцепторах водорода. Так как в этом случае недостатка в акцепторах нет, то и участие молекулярного водорода в процессе фиксации азота исключается. К тому же, и наличие гидрогеназы для культур азотобактера не доказано. Но кроме этих общих возражений, можно привести еще и экспериментальные данные, исключающие участие в процессе фиксации геминного фермента.

Вот результат одного из опытов с щавелевой кислотой (были использованы калиевые и натриевые соли).

Таблица 1

Влияние на дыхание и фиксацию молекулярного азота *Azotobacter agilis* щавелевой кислоты

Концентрация щавелевой кислоты в среде в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в % к контролю	Фиксировано азота атмосферы в мг		Интенсивность фиксации азота атмосферы в % к контролю	Содержание щавелевой кислоты после опыта
			на 1 г сахара в отдельной культуре	на 1 г сахара в среднем		
1. Контроль 0,00	1,80	100,0	13,37	13,24	100,0	0,00
	1,80		13,10			
2. Калиевая соль щавелевой кислоты 0,025	0,45	19,4	14,00	12,16	91,8	Много
	0,25		10,32			
3. 0,00	1,80	100,0	16,59	16,16	100,0	0,00
	1,80		15,73			
4. Натриевая соль щавелевой кислоты 0,010	1,10	56,9	16,25	16,42	101,6	Значительно
	0,95		16,56			

Щавелевая кислота, начиная примерно с 0,01 моля, резко угнетает использование сахара в актах дыхания, но почти не сказывается на продуктивности фиксации азота атмосферы. При дозах, превосходящих 0,1 моля, развитие азотобактера совсем прекращается из-за невозможности окисления сахара, так как введение в питательную среду соединений азота (аспарагиновая кислота, хлористый аммоний и другие) не приводит к развитию этого организма в течение, по крайней мере, 8 мес. или года. Поэтому не возникает сомнения в том, что щавелевая кислота, как это нами впервые устанавливается, блокирует дыхание, не затрагивая фиксацию азота. Так как в этом случае трудно допустить иной способ воздействия щавелевой кислоты, кроме связывания железа дыхательного фермента, то появляется реальная возможность для утверждения, что атомы железа в фиксации азота атмосферы азотобактером участия не принимают.

Аналогичное заключение следует и из цифрового материала, представленного в табл. 2, где сопоставляется влияние на дыхание и фиксацию азота других блокирующих веществ.

Таблица 2

Влияние различных химических соединений на дыхание и фиксацию молекулярного азота азотобактером на сахаре

Химические соединения	Концентрация испытывавшегося вещества в среде в молях	Относительная интенсивность использования сахара в % к контролю	Относительная интенсивность фиксации молекулярного азота на 1 г использованного сахара в % к контролю
Контроль	0,00	100,0	100,0
Борная кислота	0,0005	102,6	140,0
Молибденовая кислота	0,0005	96,3	171,8
Фосфорно-молибденовая кислота	0,0001	100,0	186,1
Тимонукленовая кислота	0,0025	92,1	162,3
Фосфорно-вольфрамовая кислота	0,0001	73,0	127,3
Индол-уксусная кислота	0,0024	74,4	154,0
Три-бром-уксусная кислота	0,0020	73,5	117,5
Моно-иод-уксусная кислота	0,0005	88,3	125,2
Масляная кислота	0,0500	100,0	97,8
Валериановая кислота	0,0500	100,0	81,9
Изо-пропиловый спирт	0,2000	86,8	57,4
Изо-бутиловый »	0,1000	92,6	32,4
Изо-амиловый »	0,0500	100,0	62,6
Этилуретан	0,1000	101,2	37,4
Формамид	0,0100	70,0	130,7
Хлорная ртуть	0,0010	60,7	35,8
Хлорное золото	0,0010	110,6	86,2
Хлористый палладий	0,0050	73,6	29,2
Хлорное железо	0,0050	90,3	53,6
Сернистый марганец	0,0010	108,5	72,7
Галловая кислота	0,0010	100,0	67,7

Из табл. 2 легко установить, что различные кислоты, в той или иной мере связывающие железо геминного фермента, явно тормозят дыхание, но сильно активируют процесс фиксации азота. Поэтому вопрос о наличии в клетках азотобактера различных ферментных систем, обслуживающих эти процессы, не вызывает сомнений.

В отличие от этих соединений поверхностно-активные вещества мало сказываются на интенсивности дыхания, но сильно тормозят фиксацию азота. Их влияние, по видимому, связано с блокировкой пограничных поверхностей между активной группой катализатора и его коллоидным носителем. Соли тяжелых металлов действуют

аналогичным образом. Они также изменяют состояние коллоидного носителя и подавляют фиксацию.

Все вышеизложенное позволяет утверждать, что все теории фиксации азота, принимающие за основу процесса взаимодействие между железом геминного фермента и молекулярным азотом, в свете приведенных экспериментальных данных теряют свои основания. В фиксации молекулярного азота азотобактером принимает участие особый катализатор, отличный от геминного фермента и состоящий из коллоидного носителя — белка и активной группы. В составе активной группы, как это нами было ранее показано (6), имеется карбонильная группировка, которая и принимает непосредственное участие в фиксации молекулярного азота азотобактером.

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

Поступило
10 III 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Гапон, ДАН, 48, № 2 (1947). ² М. Федоров, Микробиология, 14, в. 2, 94 (1945). ³ М. Федоров, там же, 14, в. 3, 146 (1945). ⁴ М. Федоров, там же, 15, в. 1, 23 (1946). ⁵ М. Федоров, ДАН, 49, № 9 (1945). ⁶ М. Федоров, ДАН, 50, 501 (1945). ⁷ М. Федоров, ДАН, 51, № 1 (1946). ⁸ М. Федоров, Микробиология, 15, в. 6, 509 (1946). ⁹ М. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, 1948. ¹⁰ J. Влош, Cbl. f. Bakt., II Abt., 84, 60 (1931).