

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. В. ФЕДОРОВ

**ВЛИЯНИЕ ОТДЕЛЬНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
НА ФИКСАЦИЮ АЗОТА АТМОСФЕРЫ АЗОТОБАКТЕРОМ**

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 6 III 1950)

Определение значения отдельных питательных элементов для процесса фиксации азота атмосферы азотобактером весьма существенно потому, что на основе этих данных можно точнее установить, какое место занимает данный процесс в общей системе физиологических процессов в протоплазме клетки и в какой взаимосвязи он находится с ними. Накопленный к настоящему времени экспериментальный материал позволяет признать, что наиболее важное значение для осуществления процесса фиксации имеет источник углерода, так как, независимо от химической структуры используемого углеродистого вещества, на каждый грамм углерода радикала (без углерода карбоксильной группы) фиксируется примерно 20—25 мг атмосферного азота (2, 6). Такое постоянство в продуктивности фиксации указывает на возможную энергетическую связь фиксации с сжиганием углеродистого радикала в актах дыхания. Из этого правила составляют исключение только поверхностно-активные вещества. При их использовании в качестве источника углерода продуктивность фиксации азота сильно падает. Так например, развиваясь на этиловом спирте, азотобактер фиксирует в два раза меньше азота, чем на глюкозе, а при развитии на пропиловом спирте — даже в четыре раза меньше, чем на глюкозе. Из этого факта следует естественный вывод: продуктивность фиксации находится в зависимости не только от запаса химической энергии в веществе, но и от физико-химических особенностей используемого вещества. Следовательно, фиксацию азота нужно рассматривать как строго закономерный физиологический процесс, находящийся в тесной связи с другими физиологическими процессами в протоплазме и определенным образом координирующийся с ними. Этот процесс тесно связан с синтезом живого вещества и подчиняется закономерностям, определяющим ход этого синтеза. Среди этих закономерностей важное значение имеет количественная зависимость между расходом углерода и азота. Как известно, различные аэробные микроорганизмы в процессе своей жизнедеятельности потребляют углерод и азот в отношении 25 : 1. Азотобактер же является исключением из этого правила; для построения живого вещества своих клеток он использует углерод и азот в отношении 50 : 1. Более высокая потребность в энергетическом материале у азотобактера указывает на возможную эндотермичность процесса фиксации и на относительную бедность протоплазмы этого организма азотистыми веществами. При затрудненном добывании азота последний, повидимому, расходуется только на синтез веществ, необходимых для поддержания структуры протоплазмы, и не откладывается в форме запасных питательных веществ. Так как без углеродистых соединений нет базы для синтеза

составных частей клетки, то между расходом углерода и фиксацией азота получается строгая количественная зависимость, усложненная дополнительными энергетическими затратами.

Аналогичное же значение имеет и второй питательный элемент — азот. Если без источника углерода нет фиксации азота атмосферы, то без источника связанного азота она совершается наиболее интенсивно, так как это — единственная возможность обеспечить синтез нового живого вещества. При наличии же в среде доступных источников связанного азота необходимость в фиксации азота или снижается или же совсем отпадает. Это зависит только от химической природы азотистых веществ, так как не любые формы связанного азота могут заменить азотобактеру молекулярный азот. Как нами было установлено (4), амидный азот, а также азот органических оснований, входящих в нуклеиновую кислоту, азот индола, динитробензола, анилина, гидроксиламина и ряда других азотистых соединений, совершенно не усваивается этим организмом. Азот многих аминокислот, пептонов, альбуминов и других сложных азотистых соединений также не усваивается им или усваивается в ничтожных количествах. Эти вещества, видимо, не могут использоваться непосредственно для построения белкового вещества, а предварительное отщепление от них азота в более простой форме не может осуществляться из-за отсутствия соответствующих ферментов. Таким образом, выходит, что и по отношению к азоту остаются в полной силе те же общие закономерности. Фиксация азота совершается в той мере, в какой связанный азот необходим для построения азотистых веществ протоплазмы и не может быть заменен каким-либо другим доступным источником. Такое же отношение выявляется и по отношению к сере и фосфору. Недостаток серы в среде почти в равной мере угнетает как использование углерода энергетического вещества, так и фиксацию азота атмосферы, что легко установить из данных табл. 1, А. Этот опыт ставился с *Azotobacter agile* и продолжался 21 день. Для заражения использовалась суспензия азотобактера (1 мл), предварительно выращенного на среде с малыми дозами серы (0,0001 M). В качестве источника углерода предоставлялся инвертный сахар (0,1 M).

При малых дозах серы как фиксация атмосферного азота, так и использование сахара крайне мало продуктивны (30—40 % от контроля). При более высоких концентрациях серы синтез белка становится возможным в больших размерах и рост организма нормализуется, постепенно приближаясь к продуктивности на среде, обеспеченной всеми питательными элементами. Таким образом, и из этого опыта вытекает общая физиологическая закономерность: фиксация атмосферного азота находится в тесной связи с синтезом азотистых веществ протоплазмы.

Близкий результат получается и с фосфором, нужным для синтеза сложных белковых веществ (нуклеопротеидов) и липоидов, необходимых для образования липоидно-протеинового и нуклео-протеинового комплексов протоплазмы.

Ниже следующий опыт, в котором дозировка фосфора в среде подвергалась значительным колебаниям, дает вполне определенный ответ на этот вопрос и позволяет считать фосфор только косвенным участником процесса фиксации. Фосфорная кислота в этом опыте вносились в форме смеси Na_2HPO_4 и KH_2PO_4 . Среда инфицировалась *A. agile* и выдерживалась в термостате 30 дней при температуре 30°. В каждой колбе содержалось 100 мл питательной среды с 1,8 г инвертного сахара (табл. 1, Б).

Повышение концентрации фосфорной кислоты вызывает значительное усиление азотфиксирующей способности азотобактера, но прямой количественной зависимости все же не наблюдается. Даже при ничтожном количестве фосфорной кислоты фиксация азота атмосферы совершается еще довольно интенсивно. Только процесс дыхания оказывается сильно

Таблица 1

Влияние серы, фосфорной кислоты, калия и магния на фиксацию азота атмосферы *A. agile*

Концентрация в среде <i>M</i>	Использо- вано саха- ра в г	Интенсивность использова- ния сахара в % от кон- тrolя	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азо- та атмосферы в % от кон- тrolя
			на 1 г сахара в отd. куль- туре	на 1 г сахара в среднем	на 1 г-моль гексоз	
А. Влияние серы (в форме сернокислой соли)						
0,000	0,90	45,8	3,34	3,55	639,0	31,7
	0,85		3,77			
0,0001	1,40	65,3	6,53	6,85	1233,0	61,3
	1,25		7,16			
0,0005	1,65	95,8	10,52	10,35	1863,0	92,5
	1,80		10,47			
0,001	1,70	94,4	9,41	9,62	1731,6	86,0
	1,70		9,82			
0,005	1,75	95,8	9,16	9,81	1765,8	87,7
	1,70		10,46			
Нормальная среда	1,80	100,0	11,43	11,18	2012,4	100,0
	1,80		10,93			
Б. Влияние фосфорной кислоты (в форме H_3PO_4)						
0,00001	0,70	36,1	4,40	4,76	856,8	42,5
	0,60		5,13			
0,0001	0,60	33,3	5,13	5,13	923,4	45,9
	0,60		5,13			
0,0005	1,35	77,7	4,34	5,07	912,6	45,3
	1,45		5,80			
0,001	1,40	81,9	5,40	6,08	1094,4	54,4
	1,55		6,77			
0,005	1,65	87,5	6,19	6,31	1135,8	56,4
	1,60		6,42			
Нормальная среда	1,80	100,0	11,43	11,18	2012,4	100,0
	1,80		10,93			
В. Влияние калия						
0,000001	1,30	67,5	4,84	4,92	885,6	52,1
	1,13		5,00			
0,00001	1,30	76,1	4,74	5,53	995,4	58,5
	1,44		6,32			
0,0001	1,58	55,6	7,45	7,48	1346,4	79,2
	1,53		7,50			
0,001	1,71	91,9	7,20	6,80	1240,2	73,0
	1,60		6,58			
Г. Влияние магния						
0,00001	1,17	60,3	4,91	4,51	811,8	47,8
	1,00		4,10			
0,0001	1,40	81,4	8,40	7,72	1389,6	81,8
	1,53		7,30			
0,001	1,71	95,0	7,94	7,87	1416,6	83,4
	1,71		7,80			
Нормальная среда	1,80	100,0	9,41	9,44	1699,2	100,0
	1,80		9,47			

подавленным. Так как дальнейшее повышение содержания фосфора усиливает использование сахара почти в 2,5 раза и повышает интенсивность фиксации азота атмосферы в 1,5 раза, то нужно думать, что в этом

случае начинается более усиленный рост клеток азотобактера и повышается расход как углерода, так и фосфора. Поэтому участие фосфорной кислоты в процессе фиксации азота атмосферы осуществляется только через усиленный рост клеток азотобактера. Такова же, повидимому, и роль калия и магния, что легко установить из данных табл. 1, В и Г, где даны результаты опытов с разными дозами калия и магния в среде при их замене натрием.

При почти полной замене калия или магния натрием фиксация атмосферного азота продолжается еще на сравнительно высоком уровне (4,5—4,9 мг на 1 г использованного сахара). Введение в среду дополнительных доз этих элементов (0,00001 *M*) заметно повышает интенсивность этого процесса, а затем дает еще более резкое повышение (7,48—7,87 мг азота на 1 г использованного сахара), указывая на существенное значение этих элементов в жизнедеятельности клетки и в фиксации азота.

Но если бы влияние калия или магния носило строго специфический характер и они участвовали бы непосредственно в процессе фиксации, то дальнейшее повышение их концентрации должно было бы еще более повысить его интенсивность. Однако эксперименты показывают, что подобное явление не имеет места. При повышении концентрации выше 0,1 *M* наблюдается заметное понижение продуктивности фиксации. На этом основании следует полагать, что действие калия и магния — также косвенное и осуществляется через протоплазму клетки, физико-химическое состояние которой теснейшим образом связано с этими катионами. Поэтому предположение Стоклаза (8), что калий специфически влияет на фиксацию азота как радиоактивный элемент, следует признать не отвечающим действительности. Ни калий, ни магний не выполняют специфической функции в фиксации азота.

То же самое следует отметить и по отношению к железу. Как показали наши исследования, железо участвует только в образовании окислительных ферментов, нужных для выполнения процесса дыхания, но прямого участия в фиксации атмосферного азота не принимает. Полное связывание железа цианидами (6) или щавелевой кислотой практически не отражается на продуктивности этого процесса, хотя и сильно подавляет дыхание. В силу этого различные теории фиксации азота, основанные на участии железа в реакции связывания (1, 7), должны быть признаны не отвечающими действительности. Повидимому, ни один из указанных питательных элементов (азот, фосфор, сера, калий, магний и железо) не принимает прямого участия в процессе фиксации атмосферного азота. Исключение составляет только углерод. Между потреблением углеродистого радикала и фиксацией азота наблюдается строгая количественная зависимость, что указывает на важное значение превращений углеродистого вещества для процесса фиксации. Они обеспечивают данный процесс энергией и исходными соединениями, нужными для образования сложных азотистых веществ протоплазмы. Все это говорит о том, что азотобактер обладает совершенно своеобразным азотистым обменом и специфически приспособлен к усвоению молекулярного азота атмосферы.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
6 III 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Н. Гапон, ДАН, 48, № 2 (1947). ² М. В. Федоров, Микробиология, 14, № 2 (1945); ДАН, 48, № 8 (1945). ³ М. Ф. Федоров, Микробиология, 15, № 5 (1946); Докл. ВАСХНИЛ, №№ 3, 4 (1946). ⁴ М. В. Федоров, ДАН, 50, № 1 (1945); Тр. ТСХА, № 30 (1949); Микробиология, 17, № 6 (1948). ⁵ М. В. Федоров, ДАН, 51, № 1 (1946). ⁶ М. В. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, М., 1948. ⁷ J. Blom. Biochem. Zs., 134, 385 (1928). ⁸ J. Stoklasa, C. R., 157, 879 (1913).