

М. В. ФЕДОРОВ

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ УСЛОВИЙ  
СРЕДЫ НА ФИКСАЦИЮ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА  
CLOSTRIDIUM PASTEURIANUM**

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 5 VI 1951)

В отличие от других азотфиксирующих бактерий *Clostridium Pasteurianum* может осуществлять процесс фиксации молекулярного азота при очень низких значениях окислительно-восстановительного потенциала. Эта строго анаэробная бактерия образует в процессе маслянокислого брожения значительные количества водорода, выделение которого в молекулярной форме едва ли будет иметь место при окислительном потенциале, превышающем  $Eh=350$  мв. На этом основании у многих исследователей создавалось впечатление, что усвоение атмосферного азота у данного бактериального организма должно совершаться иным путем, чем у азотобактера. Однако, наши исследования<sup>(1)</sup> показали, что многие ингибиторы и активаторы фиксации азота одинаково влияют на продуктивность данного процесса как в культурах азотобактера, так и в культурах *Cl. Pasteurianum*.

На основании этих исследований нами и было высказано предположение<sup>(1)</sup>, что процесс фиксации атмосферного азота у данного бактериального организма осуществляется, повидимому, тем же путем, как и у азотобактера. Некоторое подтверждение этой точки зрения можно найти в работе Розенблюма и Вильсона<sup>(2)</sup>, которым удалось показать, что молекулярный водород, образуемый *Cl. Pasteurianum* в значительных количествах, все же заметно понижает продуктивность этого процесса, если он вводится в среду в повышенных количествах. Таким образом, и в отношении этого специфического ингибитора фиксации азота выявилась аналогия между *Cl. Pasteurianum* и азотобактером.

В связи с этим возникла необходимость исследовать, какое влияние на продуктивность усвоения атмосферного азота у *Cl. Pasteurianum* оказывают окислительно-восстановительные условия среды. С этой целью нами были поставлены опыты в колбах Эрленмейера объемом на 300 мл. В каждую колбу вносилось 200 мл безазотной питательной среды (наша модификация для культур азотобактера) с 3,6 г инвертного сахара. В качестве веществ, повышающих или же понижающих окислительно-восстановительные условия среды, вносились аскорбиновая кислота (добавлялась после стерилизации среды в форме раствора, фильтрованного через бактериальный фильтр), хинон, гидрохинон и фумаровая кислота. Опыт продолжался при температуре 30° 7 дней. Результаты его приводятся в табл. 1.

Эффект от внесения испытывавшихся веществ оказался небольшим, но довольно своеобразным. Если добавление гидрохинона, несколько понижающее окислительный потенциал среды, по крайней мере в пер-

вые периоды развития организма, не оказало заметного влияния на продуктивность усвоения атмосферного азота (прибавки азота по сравнению с контролем не превышают 10% и не могут считаться доказанными), то хинон, несколько повышающий окислительный потенциал, также в первые периоды культуры, вызвал заметное повышение продуктивности этого процесса. Во всех вариантах с этим веществом, а их было поставлено значительно больше, чем приводится в таблице, прибавка азота по сравнению с контролем превышала 10% и не может объясняться ошибкой анализа. Вероятной причиной положительного влияния хинона может быть участие его в реакции дегидрирования (в качестве акцептора водорода) при образовании свободных карбонильных групп у катализатора фиксации азота, если предполагать, что и в клетках *Cl. Pasteurianum* процесс идет по схеме, аналогичной с культурами азотобактера (2). В ходе этого взаимодействия в составе фермента получают свободные карбонильные группы, которые и реагируют далее с молекулярным азотом. Первичные же продукты взаимодействия восстанавливаются далее подвижным водородом и, вероятно, через стадию гидразина используются для синтеза аминокислот, идущих на построение белковых веществ клеток *Cl. Pasteurianum*.

Таблица 1

Влияние на продуктивность фиксации азота атмосферы *Cl. Pasteurianum* хинона, гидро-хинона, аскорбиновой и фумаровой кислот

Концентрация добавлявшихся в среду веществ в молях	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг		Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отд. культуре	на 1 г сахара в среднем	
<b>Гидрохинон</b>					
0,000	3,60 3,60	100,0	2,49 2,93	2,71	100,0
0,0005	3,60 3,30	95,8	2,91 2,93	2,92	107,8
0,0025	3,30 3,30	91,7	3,06 3,07	3,07	113,3
0,0050	3,60 3,45	97,9	2,83 2,81	2,82	104,0
<b>Хинон</b>					
0,000	3,60 3,60	100,0	2,68 2,41	2,54	100,0
0,0005	3,60 3,60	100,0	2,88 2,84	2,86	112,6
0,0025	3,60 3,60	100,0	2,87 2,12	2,90	114,1
0,0050	3,60 3,60	100,0	3,96 3,19	3,17	125,0
<b>Аскорбиновая к-та</b>					
0,000	3,60 3,60	100,0	2,34 2,63	2,48	100,0
0,0005	3,60 2,80	89,0	2,60 3,25	2,92	117,8
0,0025	3,60 3,60	100,0	2,97 3,08	3,03	122,1
0,0100	2,80 2,60	75,0	3,20 3,23	3,22	130,0
<b>Фумаровая к-та</b>					
0,000	3,60 3,60	100,0	2,53 3,03	2,78	100,0
0,0005	3,60 3,60	100,0	2,57 3,23	2,90	104,9
0,0025	3,60 3,60	100,0	2,73 3,05	2,89	104,0
0,0100	3,60 3,60	100,0	2,70 3,08	2,89	104,0

Близкие результаты получились и с аскорбиновой кислотой. Продуктивность усвоения атмосферного азота в присутствии этого соединения в среде возросла на 10—20%. Только фумаровая кислота, имеющая окислительный потенциал около  $E_h +15$  мв, не дала никакого эффекта. Повидимому, ее потенциал слишком низок и она не может служить акцептором водорода при образовании свободных карбонильных групп (для этого нужен потенциал около +100 мв). Кроме того, и энергия связей у водорода с кислородом (в гидроксильной группе) значительно больше, чем у водорода с углеродом (у фумаровой кислоты), что также будет мешать переходу водорода от кислородных

атомов к углеродным. Поэтому отсутствие положительного эффекта от внесения в среду фумаровой кислоты следует расценивать как факт, подтверждающий указанный механизм положительного влияния хинона.

Наряду с добавлением в питательную среду веществ, изменяющих окислительный потенциал последней, были поставлены опыты с внесением в нее окислительных индикаторов, поддерживающих этот потенциал на определенном уровне, по

крайней мере в первые периоды культуры, пока еще в среде не содержится избыточных количеств подвижного водорода. В качестве таких индикаторов были использованы: метиленовая синь (потенциал +11 мв), индиго-кармин (—100 мв), метиловая зеленая (—258 мв) и нейтральная красная (—340 мв). Все индикаторы, кроме индиго-кармина, добавлялись в количестве 2 мг на 200 мл среды. Индиго-кармин вносился в количестве 20 мг на 200 мл среды. Опыт ставился в двух вариантах: в части колб производилось взбалтывание питательной жидкости на особой качалке в течение 10—12 час. ежедневно, а в другой части колб жидкость все время оставалась в спокойном состоянии. Результаты этого опыта приводятся в табл. 2.

В спокойных культурах по мере развертывания брожения все индикаторы постепенно полностью обесцветились, а нейтральная красная приобрела желтую окраску. После же завершения брожения они вновь начали приобретать окраску, присущую им в окисленном состоянии. Только индиго-кармин и после брожения остался бесцветным. Иным было поведение индикаторов в взбалтывающихся культурах. Все они, кроме индиго-кармина, оставались все время окрашенными.

Результаты этого опыта показывают, что в спокойных культурах добавленные индикаторы не влияют на скорость использования сахара. Во всех случаях она отвечает интенсивности контрольного опыта. В взбалтывающихся же культурах они понизили скорость потребления сахара, видимо, частично инактивируя ферментный аппарат брожения. Иной результат получился по отношению к фиксации азота. Индиго-кармин и в спокойных и в взбалтывающихся культурах немного понизил продуктивность этого процесса, вероятно, вследствие конкуренции с вторичными дегидразами за активные формы водорода. Если часть водо-

Таблица 2

Влияние окислительных индикаторов на фиксацию молекулярного азота *Cl. Pasteuriana* в спокойных и взбалтывающихся культурах

Концентрация индикаторов в среде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг		Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отд. культуре	на 1 г сахара в среднем	
Спокойные культуры					
Контроль	3,60	100,0	2,30	2,55	100,0
	3,60		2,59		
Метиленовая синь 2,0	3,60	100,0	2,92	2,68	109,9
	3,60		2,45		
Индиго-кармин 20,0	3,60	100,0	2,50	2,38	97,6
	3,60		2,26		
Метиловая зелень 2,0	3,60	100,0	3,03	3,03	124,2
	3,60		3,03		
Нейтральная красная 2,0	3,60	100,0	3,03	2,78	114,0
	3,60		2,34		
Взбалтывающиеся культуры					
Контроль	3,30	100,0	3,21	3,21	100,0
	3,30		3,21		
Метиленовая синь 2,0	2,50	75,8	4,20	4,15	129,3
	2,50		4,11		
Индиго-кармин 20,0	3,60	97,0	2,88	2,89	94,1
	3,10		2,90		
Метиловая зелень 2,0	0,90	27,8	2,32	2,30	71,7
	1,10		2,29		
Нейтральная красная 2,0	1,60	55,5	3,60	3,71	120,8
	2,40		3,83		

рода пошла на восстановление индиго-кармина при потенциале —100 мв, то количество восстанавливаемых первичных продуктов фиксации азота должно было сократиться и уменьшить общую продуктивность этого процесса. Метилловая зелень в спокойных культурах повысила продуктивность этого процесса на 24%, а в взбалтывающихся культурах сократила ее на 28%. В последнем случае она, видимо, также начала конкурировать с соответствующими дегидразами за подвижный водород. Нейтральная красная оказала более благоприятное влияние на фиксацию азота в взбалтывающихся культурах и также, вероятно, за счет создания более подходящего окислительно-восстановительного потенциала.

Все эти данные показывают, что отношение *Cl. Pasteurianum* к окислительно-восстановительным условиям среды весьма напоминает отношение к этому фактору азотобактера. Поэтому возникают дополнительные основания для предположения, что и ферментный аппарат, обслуживающий у обоих бактериальных организмов процесс фиксации атмосферного азота, может быть однотипным, несмотря на разнотипность у них ферментных механизмов, обслуживающих процессы дыхания.

Московская сельскохозяйственная академия  
им. К. А. Тимирязева

Поступило  
8 VI 1951

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> М. Ф. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, М., 1948.  
<sup>2</sup> М. Ф. Федоров, Микробиология, 18, в. 6, 498 (1949). <sup>3</sup> E. Rosenblum and P. Wilson, Journ. Bacter., 59, No. 1, 83 (1950).