

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. В. ФЕДОРОВ

**ИНГИБИТОРЫ ПРОЦЕССОВ СИНТЕЗА И ФИКСАЦИЯ
МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА АЗОТОБАКТЕРОМ***(Представлено академиком А. И. Опариным 15 I 1953)*

В опубликованных нами работах (2, 3) приводились экспериментальные доказательства, что между числом выросших клеток азотобактера и количеством фиксированного им азота атмосферы имеется прямая зависимость. На какой бы стадии развития ни заканчивалась культура этого микроорганизма, число клеток на единицу использованного энергетического вещества и единицу фиксированного атмосферного азота оставалось почти одинаковым. На этом основании было сделано заключение, что фиксация атмосферного азота является функцией роста азотобактера и синтеза им клеточного вещества. Поскольку процессы синтеза сопровождаются потреблением энергии, встает естественный вопрос: каким химическим механизмом пользуется данный организм для трансформации энергии окислительных процессов в другие формы химической энергии? Как известно, многими организмами используется для этих целей энергия макроэргических фосфатных связей. Если в основе синтетических процессов у азотобактера лежит такой же механизм, то ингибиторы роста типа азиды и 2,4-динитрофенола должны угнетать фиксацию атмосферного азота этим микроорганизмом, так как эти соединения (1, 5, 8) тормозят фосфорилирование, сопряженное с окислением. В частности, азиды тормозят использование энергии макроэргических фосфатных связей в реакциях синтеза, а 2,4-динитрофенол тормозит реакции фосфорилирования, связанные с окислением водорода субстрата. Последняя особенность динитрофенола была установлена Hersey (6, 7) на бесклеточных препаратах *Bact. coli*. Так как при тех же условиях азиды не оказывали заметного действия на бесклеточные препараты *B. coli*, то из этого факта было сделано заключение, что азиды тормозят только синтетические реакции, осуществляющиеся в сложной системе живой протоплазмы. Вероятность этого предположения находит подтверждение в данных Вентцлера (9). Добавляя в питательную среду 10^{-3} моля азиды, он обнаружил, что дрожжи вызывают 100% расщепление сахара на спирт и углекислоту и не расходуют его на процессы синтеза составных частей клетки. Поскольку оба ингибитора избирательно тормозят только процессы синтеза составных частей клетки и не оказывают влияния на дыхание, представлялось интересным установить, каково будет их влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером. Для получения ответа на этот вопрос и были поставлены описываемые опыты.

Все опыты ставились на безазотной питательной среде для азотобактера (наша модификация). В каждую колбу объемом 300 мл вносилось

100 мл питательной среды с 1,8 г инвертного сахара и соответствующей дозой ингибитора. Среда стерилизовалась в автоклаве при давлении пара 0,5 атм. в течение 20 мин., после охлаждения инфицировалась 1 мл суспензии *Azotobacter agilis* и ставилась в термостат с температурой 30° на 2—3 недели. По окончании опыта в среде определялись неиспользованный сахар (по Бертрану) и общий азот (по Кьельдалю). При наличии в среде динитрофенола общий азот определялся по Йодельбауэру. Во всех случаях азот, внесенный в среду вместе с ингибитором, вычитался из количества азота, найденного в среде, и таким путем определялось количество азота, использованного азотобактером из атмосферы.

Первый опыт был поставлен с семикарбазидом. Он продолжался 20 дней. Результаты опыта приводятся в табл. 1.

Таблица 1

Влияние семикарбазид на фиксацию молекулярного азота *Azotobacter agilis*

Концентр. семикарбазид в среде в молях	Содержание азота в семикарбазиде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивн. использов. сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивн. фиксации азота атмосферы в %
				на 1 г сахара в отдельн. культ.	на 1 г сахара в средн.	на 1 г-моль гексоз	
Контроль	0,00	1,80 } 1,80 }	100,0	7,16 } 7,40 }	7,28	1310,4	100,0
0,00001	0,042	1,60 } 1,70 }	91,7	6,76 } 6,50 }	6,63	1193,4	91,1
0,0001	0,42	1,70 } 1,65 }	92,9	7,00 } 5,58 }	6,29	1132,2	86,4
0,001	4,2	1,70 } 1,45 }	88,0	4,16 } 4,80 }	4,48	806,4	61,6

Хотя в присутствии семикарбазид продуктивность фиксации азота и падает, но расход энергетического материала остается на высоком уровне, и число вырастающих клеток азотобактера мало отличается от контроля. Очевидно, азот этого соединения доступен азотобактеру и заменяет ему молекулярный азот. Одно и то же число выросших клеток азотобактера в контроле и в варианте с 0,001 моля семикарбазид указывает на то, что данный ингибитор процессов синтеза не мешает азотобактеру нормально развиваться.

Аналогичный результат получился и с 2,4-динитрофенолом. Опыт с этим ингибитором процессов синтеза продолжался 13 дней. В контроле и в вариантах с малыми дозами ингибитора (до 0,0004 моля) образовалась хорошая пленка на поверхности субстрата в первые же 2 дня. В вариантах же с более высокими дозами данного вещества пленка появилась позже (через 4 дня) и быстро осела на дно колбы. Анализ субстратов дали результаты, приведенные в табл. 2.

Результаты этого опыта оказались несколько неожиданными. Динитрофенол в концентрации от 0,0001 до 0,001 моля не оказал угнетающего влияния на фиксацию молекулярного азота азотобактером. Напротив того, при концентрациях 0,0001—0,0005 он даже повысил продуктивность фиксации на 25%. Очевидно, в присутствии этого ингибитора процессы синтеза составных частей клеток азотобактера могли совершаться с нормальной, а в ряде случаев даже с более высокой продуктивностью. Столь своеобразное отношение азотобактера к динитрофенолу может определяться двумя причинами: или 1) использованные дозировки этого соединения не достигли еще той концентрации, которая блокирует связь

Таблица 2

Влияние 2,4-динитрофенола на фиксацию молекулярного азота
Azotobacter agilis

Концентр. динитрофенола в среде в мол.%	Содержа- лось азота в динитро- феноле в мг	Используй- вано сахара в г	Интенсивн. использов. сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивн. фиксация азота атмо- сферы в %
				на 1 г сахара в отделн. культ.	на 1 г сахара в средн.	на 1 г-моля гексоз	
0,0000	0,00	1,35 } 1,45 }	100,0	9,00 } 11,58 }	10,29	1852,2	100,0
0,0001	0,28	1,60 } 1,80 }	121,42	11,81 } 10,80 }	11,30	2034,0	109,9
0,0002	0,56	1,65 } 1,65 }	117,8	11,45 } 12,30 }	11,87	2136,6	115,3
0,0003	0,84	1,55 } 1,70 }	116,1	13,67 } 12,71 }	13,17	2370,6	128,0
0,0004	1,12	1,50 } 1,65 }	112,8	13,07 } 12,80 }	12,93	2327,4	125,6
0,0005	1,40	1,60 } 1,75 }	119,6	12,25 } 12,96 }	12,60	2268,0	122,4
0,0006	1,68	1,80 } 1,80 }	128,0	10,06 } 8,69 }	9,37	1686,6	91,0
0,0007	1,96	1,80 } 1,80 }	128,0	10,00 } 8,67 }	9,33	1679,4	90,5
0,0008	2,24	1,80 } 1,65 }	123,2	10,66 } 9,84 }	10,25	1845,0	99,5
0,0009	2,52	1,80 } 1,80 }	128,0	9,72 } 10,43 }	10,07	1812,6	97,8
0,0010	2,80	1,75 } 1,65 }	121,42	10,22 } 10,67 }	10,45	1881,0	101,5

окислительных процессов с фосфорилированием, или 2) в культурах этого бактериального организма, обладающего высокоразвитой синтетической способностью, процессы синтеза могут осуществляться и без участия макроэргических фосфатных связей. Весьма возможно, что у данного бактериального организма имеются и другие пути использования энергии окисления для синтетических целей.

Отсутствие эффекта от 2,4-динитрофенола, тормозящего связь дегидрирования с фосфорилированием, побудило нас поставить дополнительный опыт с внесением в среду малахитовой зелени. Этот краситель известен в качестве сильного яда для дегидраз. Поэтому желательно было дополнительно выяснить, каково будет его влияние на фиксацию азота атмосферы азотобактером. С этой целью и был поставлен опыт с добавлением в среду этого ингибитора от 0,25 до 20 мг на 100 мл среды. Во всех вариантах опыта с добавлением красителя развитие азотобактера было весьма хорошим. Питательная среда во всех случаях обесцветилась и приобрела слабожелтую окраску. Но в вариантах, содержавших более высокие дозы красителя, пленка азотобактера осталась зеленой.

Из этих данных следует, что окислительно-восстановительный потенциал в клетках этого организма не падает до уровня восстановления малахитовой зелени, хотя в питательной среде она полностью восстанавливается. Этот опыт продолжался 20 дней при температуре 30°. По окончании опыта в среде был определен неиспользованный сахар и общий азот. Результаты этих определений приводятся в табл. 3.

Влияние на фиксацию азота атмосферы *Azotobacter agilis* малахитовой зелени (ингибитор дегидраз)

Содерж. малахитовой зелени в среде в мг	Использовано сахара в г	Интенсивн. использов. сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Продуктивн. фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара в отдельн. культ.	на 1 г сахара в средн.	на 1 г-моль глюкоз	
0,00	1,80 } 1,65 }	100,0	12,83 } 12,73 }	12,88	2318,4	100,0
3,00	1,80 } 1,70 }	102,9	11,51 } 11,60 }	11,55	2079,0	90,0
4,00	1,80 } 1,70 }	101,4	11,90 } 12,83 }	12,36	2224,8	96,0
5,00	1,80 } 1,75 }	102,9	12,80 } 12,81 }	12,80	2304,0	99,9
6,00	1,80 } 1,75 }	102,9	13,33 } 12,60 }	13,00	2340,0	100,0
7,50	1,80 } 1,80 }	104,4	11,05 } 12,44 }	11,75	2115,0	91,2
10,00	1,80 } 1,80 }	104,4	12,33 } 13,25 }	12,79	2302,2	99,3
12,50	1,80 } 1,80 }	104,4	10,76 } 11,67 }	11,21	2017,8	87,4
15,00	1,80 } 1,80 }	104,4	12,20 } 12,22 }	12,21	2197,8	94,8
20,00	1,80 } 1,75 }	102,9	11,37 } 12,20 }	11,78	2120,4	91,4

Из результатов этого опыта видно, что малахитовая зелень не оказывает заметного угнетающего действия ни на окисление сахара, ни на фиксацию азота атмосферы. Продуктивность последнего процесса понизилась только на 10%, т. е. практически осталась почти без изменений. Такой результат можно объяснить только тем, что малахитовая зелень, повидимому, конкурирует только с дегидразами, обладающими активностью при низком окислительно-восстановительном потенциале. К такого типа дегидразам относятся, как известно, пиридиновые дегидразы, окислительный потенциал которых отвечает примерно $E_h = -350$ мв. Поскольку малахитовая зелень не отравляет ни дыхания, ни фиксации азота атмосферы азотобактером, очевидно, этого типа дегидразы не имеют решающего значения в окислительных процессах у него. В протоплазме клеток азотобактера окислительные процессы могут идти и при участии дегидраз флавинового типа, вызывающих дегидрирование при более высоком окислительном потенциале. Эти же дегидразы, как нами было показано в предыдущих работах (4), доставляют водород и для восстановления первичных продуктов фиксации до гидразинов и затем аминокислот.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
12 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Ю. И. Сорокин, Тр. Ин-та микробиол. АН СССР, 2 (1952). ² М. В. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, 1948; 1952. ³ М. В. Федоров, Микробиология, 15, в. 6, 509 (1946). ⁴ М. В. Федоров, там же, 18, в. 6, 488 (1949). ⁵ С. E. Clifton, Cell and Comp. Physiol., 22, 147 (1943). ⁶ D. F. Hersey, J. Biol. Chem., 191, 173 (1951). ⁷ D. F. Hersey, J. Gener. Physiol., 34, 295 (1951). ⁸ R. D. Hotchkiss, Adv. in Enzymol., 4, 153 (1944). ⁹ R. J. Wentzler, Science, 99, 327 (1944).