

М. В. ФЕДОРОВ

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ МНОГОКРАТНО ЗАМОРАЖИВАВШИХСЯ КЛЕТОК АЗОТОБАКТЕРА

(Представлено академиком А. И. Опариным 15 I 1953)

Азотобактер осуществляет фиксацию молекулярного азота при помощи особой ферментной системы, очень тесно связанной со структурой протоплазмы (1). Поэтому различные факторы внешней среды, изменяющие состояние структурных поверхностей протоплазмы, чрезвычайно сильно отражаются на интенсивности данного процесса. К числу таких факторов можно отнести и многократное замораживание клеток этого организма, чередующееся с последующим оттаиванием, что также приводит к сильному понижению азотфиксирующей активности. Вероятной причиной столь сильного снижения азотфиксирующей активности азотобактера при замораживании может быть изменение химического состава каталитического аппарата, обслуживающего данный процесс. Как показали наши исследования (2), какое-то звено выпадает из ферментной системы. Его можно в значительной степени восстановить путем введения в инактивированные культуры аскорбиновой кислоты. Так как это вещество оказывает сильное активирующее действие и при очень малых концентрациях в несколько раз повышает интенсивность как дыхания, так и фиксации азота атмосферы, то нами было высказано предположение, что оно может превращаться в активную группу фермента фиксации азота, которая, по нашим данным, содержит в своей структуре две рядом расположенные карбонильные группы. Аскорбиновая кислота, подвергаясь дегидрированию, как раз и дает такого рода соединение. Кроме такого объяснения активирующего влияния аскорбиновой кислоты, можно было бы дать и другое: это соединение, как известно может вызвать изменение окислительно-восстановительных условий в среде. Для того чтобы точнее ориентироваться, какое из этих двух предположений более вероятно, нами и были поставлены описываемые ниже опыты с пятикратно замораживавшимися клетками азотобактера. Замораживание производилось при температуре $-15, -20^{\circ}$ и оттаивание при $+30^{\circ}$.

Техника постановки опытов была следующей: на питательной среде с 1,8 г инвертного сахара (наша модификация) выращивалась культура *Azotobacter agile* при $+30^{\circ}$. Когда сахар из среды практически использовался полностью и в ней накапливалось большое количество живых клеток азотобактера (около 3—4 г живого веса), они вместе с питательной средой замораживались при -15° , выдерживались в замороженном состоянии около суток, а затем переносились в термостат с температурой $+30^{\circ}$, тоже примерно на сутки. Такая операция повторялась пять раз. После этого в каждую колбу добавлялось по 2 г инвертного сахара в форме стерильного 50% раствора и по вариантам опыта вводилось соответствующее количество стерильного раствора испытуемого вещества.

Все операции производились с соблюдением полной стерильности. После всех добавок колбы снова ставились в термостат с температурой +30° и выдерживались в нем в первом опыте 28 дней, а во втором 35 дней. Помимо аскорбиновой кислоты был испытан еще ряд соединений. Аспарагиновая и глутаминовая кислоты были включены в качестве аминокислот, участвующих в процессах переаминирования, а хинная аконитовая и фумаровая кислоты — как возможные заменители аскорбиновой кислоты. Кроме этих соединений были испытаны еще окислительные индикаторы — метиленовая синь и индигокармин. Их влияние на азотфиксирующую активность азотобактера должно было показать, какое значение может иметь поддержание в среде определенного окислительно-восстановительного потенциала. Если бы они оказались малоэффективными, то и в случае аскорбиновой кислоты следовало бы искать причину активации процесса не в изменении окислительно-восстановительных условий.

Таблица 1

Влияние некоторых органических кислот, аминокислот и окислительных индикаторов на азотфиксирующую активность пятикратно замораживавшихся клеток азотобактера

Вещество, внесенное в культуру	Использовано сахара в г	Интенсивность использования сахара в %	Фиксировано азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			на 1 г сахара		на 1 моль глюкоз	
			в отдельн. культуре	в среднем		
Контроль	2,80 2,90	100,0	9,17 9,46	9,32	1678	100,0
Аскорбиновая кислота (100 мг)	3,80 3,75	132,5	11,72 11,68	11,70	2106	125,5
Глутаминовая кислота (50 мг)	3,70 2,75	113,2	11,35 10,44	10,90	1962	116,9
Аспарагиновая кислота (50 мг)	2,35 3,05	94,9	9,61 9,25	9,43	1697	101,2
Хинная кислота (0,05 м)	3,35 3,70	123,7	10,75 11,50	11,12	2002	119,4
Фумаровая кислота (0,001 м)	3,25 3,45	117,5	9,75 11,44	10,60	1908	113,7
Индиго-кармин (100 мг)	3,20 3,80	122,8	9,34 9,40	9,37	1687	100,5
Метиленовая синь (10 мг)	2,65 2,95	98,4	10,10 9,79	9,95	1791	106,7

Кроме этих веществ во втором опыте были дополнительно использованы витамин В₂ и тиамин, как дополнительные факторы роста, а также малахитовая зелень (яд для дегидраз) и 2,4-динитрофенол (ингибитор процессов фосфорилирования). Такой подбор соединений должен был дать более подробные сведения о характере активирующего влияния аскорбиновой кислоты и причинах инактивации азотобактера при замораживании. Результаты, полученные в первом опыте, сведены в табл. 1.

Как можно видеть из приведенных цифр, наибольшее повышение азотфиксирующей активности замораживавшихся клеток азотобактера было вызвано аскорбиновой кислотой

(на 25,5%), хинной кислотой (на 19,4%) и глутаминовой кислотой (на 16,9%). Все эти соединения оказали благоприятное влияние не только на продуктивность фиксации атмосферного азота, но и на интенсивность использования энергетического материала. В их присутствии она также повысилась на 20—30% по сравнению с контролем. Такой результат дает еще одно свидетельство справедливости нашего положения, что фиксация азота атмосферы азотобактером является функцией роста и синтеза им клеточного вещества. Более повышенное потребление энергетического материала влечет за собою и более повышенную фиксацию атмосферного азота, а то и другое дает основу для усиленного синтеза клеточного вещества.

Природу активирующего влияния аскорбиновой и глутаминовой кислоты следует, видимо, связывать с ферментным комплексом фиксации азота, а не с окислительно-восстановительными условиями среды, так как окислительные индикаторы (индигокармин и метиленовая синь) оказались неэффективными, хотя и способствовали поддержанию окислительного потенциала на определенном уровне. Они были восстановлены в течение первых трех дней и оставались в таком состоянии до конца опыта.

Для установления стабильности благоприятного влияния вышеуказанных соединений опыт был повторен еще раз также с пятикратно замораживавшимися клетками азотобактера. Результаты его приводятся в табл. 2.

И во втором опыте аскорбиновая и глутаминовая кислоты оказались весьма эффективными и дали результат, аналогичный с предыдущим опытом. В присутствии этих соединений продуктивность азотфиксации возросла на 25,5% по сравнению с контролем. Очевидно, эти соединения действительно могут заменять какое-то звено в ферментном аппарате азотфиксации, выпадающее при многократном замораживании клеток азотобактера. Вероятнее всего они дают основу для синтеза активной группы фермента азотфиксации, которая, по нашим данным, представляет собою дикетоаминоглутаровую кислоту или же близкое к этой кислоте соединение. Одинаковый эффект от обоих вышеуказанных соединений указывает и на однотипную природу их действия. Если бы глутаминовая кислота доставляла инактивированным клеткам азотобактера только связанный азот, позволяющий вновь начать синтез клеточного вещества без фиксации атмосферного азота, то эффект от ее введения в среду был бы связан только с усилением потребления энергетического вещества. А между тем она не меняет интенсивности использования сахара, но специфически повышает продуктивность фиксации азота атмосферы. Очевидно, дело здесь не в связанных формах азота.

Таблица 2

Влияние витаминов, некоторых аминокислот и окислительных индикаторов на азотфиксирующую активность замораживавшихся клеток азотобактера

Вещество, добавлявшееся в питательную среду	Использовано сахара в отделе, культуре в г	Интенсивность использования сахара в %	Найдено фиксированного азота атмосферы в мг			Интенсивность фиксации азота атмосферы в %
			в растворе	в составе клеток	всего	
Контроль	4,00 3,90	100,0	8,40 9,80	27,16 25,76	35,56 35,56	9,00 100,0
Тиамин (15 мг)	4,00 4,00	101,3	9,38 6,46	32,20 31,64	41,58 38,10	9,96 110,7
Аскорбиновая кислота (50 мг)	3,95 3,95	100,0	7,72 9,80	37,10 34,62	44,82 44,42	11,29 125,5
Витамин В ₂ (5 мг)	3,80 3,80	96,2	4,76 4,10	32,48 37,24	37,24 41,34	10,34 114,9
Аспарагиновая кислота (50 мг)	4,00 3,90	100,0	2,28* 1,80	32,20 32,90	34,48 34,70	8,76 97,3
Глутаминовая кислота (50 мг)	3,80 3,85	96,9	4,82* 7,20	36,78 37,52	41,60 44,72	11,28 125,4
Аконитовая кислота (50 мг)	3,80 3,85	96,9	8,12 9,70	31,50 27,53	39,62 37,28	9,79 108,8
Метиленовая синь (5 мг)	3,45 3,85	92,4	6,30 4,20	36,68 25,96	42,98 30,16	10,02 111,3
Малахитовая зелень (5 мг)	3,20 3,10	80,0	3,08 5,46	29,12 27,16	32,20 32,62	10,60 117,9
2,4-динитрофенол (0,001 мг)	3,85 3,80	96,9	6,44 8,40	32,48 29,68	38,92 38,08	10,06 111,8

* Азот, содержащийся в аспарагиновой и глутаминовой кислотах, вычтен из азота, найденного в растворе, поэтому цифры по азоту в растворе получились здесь ниже, чем в других вариантах.

Если бы дело ограничивалось только связанными формами азота, то и аспарагиновая кислота должна была бы дать аналогичный эффект. Однако она никакого эффекта не дает.

Если бы, далее, природа инактивации азотобактера при его многократном замораживании была связана с дополнительными факторами роста, то тиамин и витамин В₂ должны были бы дать такой же эффект, как и аскорбиновая кислота (витамин С). Однако добавление этих витаминов дает в два раза меньший эффект и показывает, что природа инактивации азотобактера не связана с витаминной недостаточностью.

Если бы причиной малой азотфиксирующей активности замораживавшихся клеток азотобактера были неблагоприятные окислительно-восстановительные условия, создающиеся в среде после замораживания, то введение в субстрат метиленовой сини, помогающей поддерживать потенциал на сравнительно высоком уровне, должно было бы дать положительный эффект. Однако и при добавлении в среду этого окислительного индикатора повышение активности не выходит за пределы погрешности анализа.

Если бы, наконец, причиной малой азотфиксирующей активности замораживавшихся клеток азотобактера была недостаточная мобилизация водорода для восстановления первичных продуктов фиксации, то малахитовая зелень, отравляющая дегидразы, должна была бы понизить не только интенсивность дыхания, но и азотфиксирующую активность. А она понизила только активность дыхания на 20%, а азотфиксацию даже повысила на 17,9%.

Очевидно, малая азотфиксирующая активность замораживавшихся клеток азотобактера не связана с затруднениями в доставке активированного водорода для восстановления первичных продуктов фиксации. Она, видимо, связана, как нами и было указано ранее, только с первичными реакциями катализатора фиксации азота с молекулярным азотом. Аскорбиновая и глутаминовая кислоты потому оказывают положительное влияние, что они дают материал для образования активной группы фермента фиксации азота, реагирующего непосредственно с молекулярным азотом.

Таким образом, все дополнительные факты, полученные в этих опытах, полностью подтверждают высказанное нами в предыдущих работах (2) предположение, что активная группа азотфиксирующего фермента содержит в своей структуре две рядом расположенные карбональные группы, взаимодействующие с молекулярным азотом. Дегидрирование аскорбиновой кислоты дает соединение такого типа и замещает инактивированную при замораживании активную группу. Что же касается глутаминовой кислоты, то хотя природа ее активирующего действия пока еще и не совсем ясна, однако не исключена возможность, что и при ее дегидрировании, сопряженном с гидролизом, могут возникать такого же рода соединения. Так как ясно выраженной активирующей способностью обладают только аскорбиновая, хинная и глутаминовая кислоты, содержащие 5 и более углеродных атомов в цепи, а аспарагиновая и фумаровая кислоты такого эффекта не дают, то следует думать, что в составе активной группы азотфиксирующего фермента содержится не менее пяти углеродных атомов. Если бы их было меньше, то аспарагиновая и фумаровая кислоты, также способные превращаться в кетокислоты, должны были бы давать аналогичный эффект, а они такого эффекта не дают.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
12 IX 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ М. В. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, 1952.
² М. В. Федоров, ДАН, 89, № 3 (1953).