

МИКРОБИОЛОГИЯ

М. В. ФЕДОРОВ

**ПЕРЕХОД АЗОТОБАКТЕРА В ПОКОЯЩЕЕСЯ СОСТОЯНИЕ ПРИ
ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ НА СРЕДЕ, ОБЕСПЕЧЕННОЙ
ЭНЕРГЕТИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ**

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

Азотобактер обладает резко выраженной синтетической способностью и может строить все составные части своих клеток, пользуясь весьма простыми органическими соединениями (например, уксусной кислотой) в качестве единственного источника углерода и молекулярным азотом в качестве единственного источника азота. Несмотря на то, что синтез сложных органических веществ протоплазмы требует затраты энергии, ингибиторы роста (азиды и 2,4-динитрофенол) не оказывают угнетающего действия на рост числа клеток этого организма и фиксацию им азота атмосферы (2). Повидимому, блокирование макроэргических фосфатных связей не лишает азотобактера возможности пользоваться другими химическими механизмами для трансформации энергии, затрачиваемой на процессы синтеза и другие стороны жизнедеятельности организма. В связи с тем, что указанные ингибиторы не прерывают процессов синтеза, интересно было выяснить, как скажется на развитии азотобактера и фиксации им азота атмосферы недостаток в питательной среде минеральных солей (в том числе и фосфорнокислых). Для выяснения этого вопроса и были осуществлены описываемые ниже опыты.

Техника постановки их была следующей: в колбы Эрленмейера объемом на 300 мл добавлялось 100 мл безазотной питательной среды (наша модификация) с 2 г инвертного сахара. После стерилизации среда инфицировалась 1 мл суспензии *Azotobacter agile*, и колбы ставились в термостат с температурой 30°. В дальнейшем через каждые 7 дней в колбы добавлялось по 2 г сахара, пока конечное содержание его в последнем варианте не достигло 20 г. Сахар добавлялся в форме 50% раствора, предварительно стерилизованного в автоклаве. Опыт продолжался в течение 80 дней. По окончании опыта во всех вариантах определен неиспользованный сахар и общий азот. В одной повторности азот определялся фракционно — отдельно в составе клеток и в растворе, а во второй повторности — в клетках и в растворе вместе. Результаты анализов приводятся в табл. 1.

Из полученных данных следует, что недостаток фосфорнокислых и других минеральных солей в среде приводит к постепенному падению продуктивности фиксации азота атмосферы. В последних вариантах она не достигает и 25% от контроля. Расход же сахара во всех вариантах продолжается все время на сравнительно высоком уровне, отвечающем примерно 80% от количества вещества, добавленного в среду.

Очевидно, после исчерпания из среды всех минеральных элементов, идущих на построение клеточного вещества, и накопления каких-то про-

дуктов жизнедеятельности, азотобактер не может уже осуществлять дальнейшие синтетические процессы и переходить в покоящееся состояние. В этом состоянии он продолжает окислять сахар в актах дыхания с достаточной активностью, но освобождающаяся при этом окислении энергия идет, видимо, только для поддержания жизнедеятельности. Определяя

Таблица 1

Влияние продолжительной культуры азотобактера и недостатка минеральных солей в питательной среде на фиксацию азота атмосферы

№ пп	Внесено в среду инвертир. сахара в г	Использовано сахара в г	Использовано сахара в % от имеющегося в среде	Найдено азота, фиксирован. из атмосферы в мг			Продукт. фиксации азота атмосферы в % от контроля	
				Всего	в составе клеток	в растворе		
1	2,0	2,00 2,00	100,0	17,0	—	—	9,85	100,0
				21,0	14,0	7,00		
2	4,0	3,85 3,75	95,0	25,06	—	—	6,80	69,1
				26,66	20,30	6,36		
3	6,0	5,35 5,15	86,6	32,70	—	—	6,22	63,2
				32,05	25,06	7,00		
4	8,0	6,80 6,45	82,8	40,18	—	—	6,17	62,6
				41,58	33,38	7,70		
5	10,0	7,90 6,70	73,0	41,16	—	—	5,34	54,2
				36,78	30,48	6,30		
6	12,0	9,70 8,95	77,7	41,00	—	—	4,22	42,8
				37,70	30,80	6,90		
7	14,0	10,70 11,00	77,5	42,84	—	—	4,13	41,9
				43,88	36,88	7,00		
8	16,0	12,40 13,60	81,2	38,70	—	—	3,13	31,8
				42,90	35,20	7,70		
9	18,0	14,70 15,10	82,7	38,36	—	—	2,71	27,5
				42,42	33,32	9,10		
10	20,0	16,75 16,05	82,0	41,92	—	—	2,52	25,6
				40,70	33,60	7,10		

расход сахара на поддержание жизнедеятельности с момента прекращения фиксации азота атмосферы, мы видим, что за 60 дней опыта было израсходовано 10 г сахара на 8 г живого веса клеток, т. е. на 1 г живого веса клеток в 1 час расходуется около 1 мг сахара на поддержание жизнедеятельности.

В связи с тем, что при введении в среду значительного количества сахара могли создаваться неблагоприятные осмотические условия, тормозящие фиксацию атмосферного азота независимо от недостатка в среде минеральных солей — опыт был повторен в дальнейшем в двух вариантах: 1) с добавлением сахара без минеральных солей и 2) с добавлением сахара вместе с минеральными солями (каждый раз в количествах, отвечающих их содержанию в среде). Полученные в этом опыте результаты сведены в табл. 2.

Рассматривая данные табл. 2, легко убедиться в том, что продолжительная культура азотобактера в одной и той же среде с постепенным добавлением в нее все повышающихся доз сахара приводит к падению продуктивности азотфиксации. В варианте опыта с введением 20 г сахара (по 2 г через каждые 7 дней) продуктивность этого процесса упала до 36,6% от контроля даже в том случае, когда сахар добавляется вместе с минеральными солями. Если же добавление сахара про-

изводилось без минеральных солей, то в аналогичном варианте продуктивность фиксации понизилась до 24,4%. Максимальное накопление азота, хотя и при низкой относительной продуктивности использования энергетического материала, имело место в обоих случаях в седьмом варианте, в котором было добавлено в общей сложности 14 г сахара и

Таблица 2

Влияние продолжительной культуры азотобактера в питательной среде, обеспеченной и необеспеченной минеральными солями, на фиксацию азота атмосферы

№ пп	Внесено в среду инертн. сахара в г	Использовано сахара в г	Используйов. сахара в % от внесен. в среду	Найдено азота, фиксирован. из атмосферы в мг			Продуктивн. фиксац. азота атмосферы в % от контроля	
				всего	в составе клеток	в растворе		
Вариант с добавлением минеральных солей								
1	2,00	1,80 } 1,85 }	91,2	16,88 19,88	11,04 11,48	5,84 } 8,40 }	10,08	100,0
2	4,00	3,35 } 3,75 }	98,6	31,36 29,42	21,56 25,06	9,80 } 4,36 }	8,00	79,3
3	6,00	5,45 } 5,70 }	92,9	47,44 46,76	37,66 39,20	9,30 } 7,56 }	8,47	84,0
4	8,00	5,90 } 6,40 }	77,0	41,86 46,20	29,26 39,20	12,60 } 7,00 }	7,16	71,0
5	10,00	7,60 } 7,70 }	76,5	57,40 54,04	49,00 43,12	8,40 } 10,92 }	7,28	72,2
6	12,00	9,65 } 9,70 }	80,6	59,90 63,70	49,70 53,90	10,20 } 9,80 }	6,39	63,4
7	14,00	11,25 } 10,50 }	77,7	68,18 64,20	55,58 54,70	12,60 } 9,50 }	6,08	60,3
8	16,00	13,40 } 13,50 }	84,1	58,34 56,84	49,98 45,64	8,36 } 11,20 }	4,28	42,4
9	18,00	15,40 } 15,60 }	86,1	58,40 59,36	53,90 48,16	4,50 } 11,20 }	3,80	37,7
10	20,00	17,75 } 17,05 }	87,0	67,20 61,04	53,20 50,40	14,00 } 10,64 }	3,69	36,6
Вариант без добавления минеральных солей								
1	2,00	1,90 } 1,85 }	93,7	19,60 20,16	14,28 14,56	5,32 } 5,60 }	10,57	100,0
2	4,00	3,85 } 3,80 }	93,1	34,16 34,86	28,00 29,96	6,16 } 4,90 }	9,02	85,3
3	6,00	4,55 } 4,35 }	74,2	38,36 40,10	32,20 32,00	6,16 } 8,10 }	8,81	83,7
4	8,00	5,00 } 5,35 }	64,7	40,16 40,74	34,00 33,46	6,16 } 7,28 }	7,81	74,1
5	10,00	6,90 } 6,40 }	66,5	45,40 42,97	39,20 34,72	6,20 } 8,15 }	6,64	63,0
6	12,00	8,55 } 8,20 }	70,0	52,22 50,20	46,20 41,60	6,02 } 8,60 }	6,12	57,9
7	14,00	11,00 } 10,20 }	75,7	52,78 51,10	45,50 43,82	7,28 } 7,28 }	4,90	48,0
8	16,00	11,90 } 12,00 }	74,7	46,54 42,54	41,50 37,50	5,74 } 5,04 }	3,73	35,3
9	18,00	13,60 } 14,00 }	76,4	44,74 44,40	35,84 33,32	8,90 } 10,08 }	3,24	30,6
10	20,00	16,00 } 16,00 }	80,0	41,58 40,92	35,70 34,00	5,88 } 6,92 }	2,58	24,4

фиксировано 50—68 мг азота. Дальнейшие добавки сахара до 20 г не только не привели к повышению общего содержания азота в культуре, но даже несколько сократили его накопление — по видимому за счет улетучивания азотистых продуктов, получившихся в процессах автолиза. Однако последний процесс имел малое развитие, так как азота в растворе найдено очень мало. И несмотря на то, что азот в культуре в дальнейшем не увеличился, окисление сахара все еще продолжалось довольно интенсивно. В варианте с наивысшей дозой сахара за последние 28 дней было дополнительно окислено еще 5 г энергетического материала, по сравнению с вариантом, давшим максимальное накопление азота. Очевидно, эти 5 г были окислены без параллельной фиксации азота атмосферы и пошли только на поддержание жизнедеятельности организма. Такой результат опыта представляет существенный интерес с точки зрения понимания взаимозависимости между дыханием и фиксацией азота атмосферы. Полученные данные с определенностью показывают, что оба эти процесса, хотя косвенно и связаны между собою, однако осуществляются при помощи различных ферментных механизмов, что нами было в свое время показано при помощи метода блокировки (3).

В вариантах опыта с большими добавками сахара дыхание идет еще весьма активно и после достижения максимальной дозы накопления азота, т. е. и в тот период, когда фиксация атмосферного азота уже совсем прекратилась. В этих вариантах культура перешла, видимо, в покоящееся состояние и перестала выполнять свою важнейшую функцию, связанную с усвоением молекулярного азота. Какие причины привели ее в покоящееся состояние в той серии опыта, где сахар добавлялся вместе с минеральными солями, и где, казалось, были созданы все условия для нормальной жизнедеятельности азотобактера, пока остается еще неясным. Объяснение обнаруженного явления можно искать, видимо, в нескольких направлениях: или 1) в среде накапливаются продукты жизнедеятельности, прекращающие рост клеток и тем самым исключают фиксацию атмосферного азота как функцию роста, или 2) происходит необратимое изменение ферментных систем, обслуживающих процесс фиксации. Первое объяснение нам представляется более вероятным: дальнейшие исследования с влиянием фильтратов из такого рода культур на размножение азотобактера могут дать интересные результаты.

Оказывается, что покоящуюся культуру азотобактера можно получить не только путем отмывания ее от питательного субстрата, но и путем продолжительной культуры в среде, обеспеченной энергетическим материалом. Если бы оба процесса обслуживались одной и той же ферментной системой, как это принимается в теориях фиксации азота Блома (5) и Е. Н. Гапона (1), то прекращение фиксации азота вследствие инактивации ферментной системы должно было бы автоматически повлечь за собою и прекращение дыхания.

Описанные в этом сообщении факты в полной мере согласуются с развиваемой нами теорией (4) химизма фиксации азота атмосферы азотобактером, в основе которой лежит представление о наличии в клетках этого микроорганизма специфического катализатора, обслуживающего данный процесс.

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
12 IX 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Е. Н. Гапон, ДАН, 58, № 2, 249 (1947). ² М. В. Федоров, ДАН, 89, № 2 (1953). ³ М. В. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, 1948 (1952). ⁴ М. В. Федоров, Микробиология, 18, № 6, 498 (1949). ⁵ I. Blom, Bioch. Z., 184, 385 (1928).