Доклады Академии Наук СССР
1954. Том XCIX, № 5

МИКРОБИОЛОГИЯ

В. И. ЛЮБИМОВ и З. С. КАГАН

УРЕАЗА И АРГИНАЗА У НЕКОТОРЫХ ВИДОВ AZOTOBACTER

(Представлено академиком В. Н. Шапошниковым 5 X 1954)

Занимаясь выяснением физиологического значения процесса расщепления мочевины у бактерий и распространения среди них уреазы, мы включили в число исследуемых организмов штаммы Azotobacter agile и A. chroococcum, длительное время поддерживавшиеся на среде Эшби и полученные нами из Института микробиологии Академии наук СССР.

Известно, что доминирующим среди содержащихся в белках азотобактера аминокислот является аргинин (2). Мы полагаем, что выяснение наличия у азотобактера активной аргиназы и уреазы может объяснить один из путей появления в его культурах NH_3, отмеченное, вслед за С. П. Костычевым и его сотр. (3, 4), многими авторами.

В наших опытах бактерии выращивались в несколько видоизмененной жидкой питательной среде М. В. Федорова (1) при непрерывном продувании культур воздухом в специально сконструированном микроаэраторе (12). В пробах культур разного возраста определялись: редуцирующие сахара, содержание общего азота, общее количество клеток и уреазная активность суспензий из отмытых клеток. Предварительные опыты показали, что фильтрат культуры, полученный после фильтрования через мембранный фильтр, не обладает уреазной активностью, поэтому в дальнейшем фермент определялся только в телах бактерий.

Таблица 1

Уреазная активность клеток азотобактера* в различных буферных растворах

Виды азотобактера	Фосфатный буфер pH 6,4	Малеиновый буфер (7) pH 6,4
A. agile	0,701	0,660
A. chroococcum	0,602	0,454

* Суспензии содержали 1 мг/мл общего N.

При определении уреазной активности суспензии клеток выдерживались 2 часа при 20° в присутствии 1% мочевины, растворенной в фосфатном буфере pH 6,4 (5). Ферментативные опыты и определения NH_3 производились в парафиновых чашках, применяемых для определения NH_3 диффузионным методом (6). Уреазная активность выражалась количеством NH_3 (в мг), образовавшегося из мочевины при указанных выше условиях, и относилась к 1 млрд. клеток или 1 мг общего азота клеток.

В отличие от опытов с кристаллической уреазой (7), расщепление мочевины клетками азотобактера всегда осуществлялось быстрее в фосфатном буфере, чем в малеиновом (см. табл. 1).

Результаты одного из типичных опытов с A. agile графически представлены на рис. 1. Они указывают, что с возрастом культуры уреазная активность клеток A. agile увеличивается. Та же закономерность обнаруживается и при расчете уреазной активности на 1 мг общего N клеток. Повидимому, количество и роль уреазы в клетках возрастают в пе-

риод, когда главная масса фиксированного клетками азота подвергается дальнейшим превращениям и перераспределению.

Сравнительные определения уреазной активности клеток Micrococcus ureae, которая максимально проявлялась при pH 6,8, показали, что клетки азотобактера содержит значительно больше уреазы, чем эта уробактерия (см. табл. 2).

Таблица 2

Уреазная активность клеток M. ureae, A. agile и A. chroococcum

M. ureae		A. agile		A. chroococcum
возраст культуры в час.	уреазная активность 1 млрд.	возраст культуры в час	уреазная активность 1 млрд.	уреазная активность 1 млрд.
22	0,011	20	0,013	0.025
38	0,013	34	0,054	0,048
46	0,019	43	0,058	0,090
54	0,026	50	0,064	0,163
62	0,031			

Наблюдения над ходом потребления сахара и фиксацией N_2 в культурах азотобактера производились нами для того, чтобы проследить изменение уреазной активности организма на фоне проявления главного свойства этой бактерии — фиксации азота. Однако следует подчеркнуть и самостоятельное значение полученных результатов, указывающих на изменение продуктивности фиксации азота (количество миллиграмм фиксированного азота на 1 моль потребленного сахара), которая с возрастом резко повышается. В первой половине фазы логарифмического роста на каждый миллиграмм фиксированного азота из среды исчезает сахара больше, чем во второй. Это,

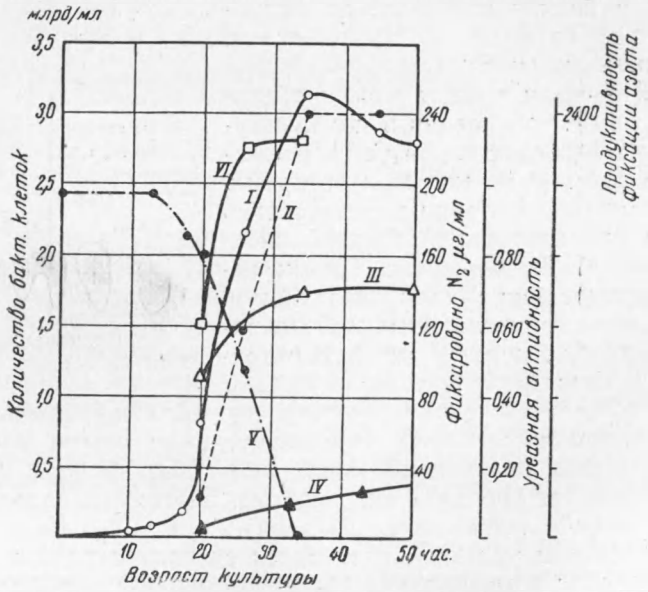


Рис. 1. Уреазная активность клеток A. agile с связи в возрастом культуры и фиксацией азота. *I* — количество бактериальных клеток, млрд/мл; *II* — фиксация N_2 μг/мл; *III* — уреазная активность 1 млрд. клеток; *IV* — уреазная активность на 1 мг N клеток; *V* — содержание сахара в среде; *VI* — продуктивность фиксации азота

повидимому, объясняется тем, что первоначально значительная часть сахара превращается в промежуточные соединения, используемые в дальнейшем.

Опыты с A. chroococcum дали результаты, аналогичные описанным выше.

Мы выясняли также, есть ли в клетках азотобактера аргиназа. Для этого суспензии из отмытых от среды клеток A. agile выдерживались 48 час. в забуференных растворах аргинина (pH 6,4 и 9,5) при 28°. Затем реакционная смесь анализировалась путем хроматографии на «быстрой» бумаге Ленинградской бумажной фабрики № 2, предварительно промытой проявляющим растворителем (водонасыщенный фенол и 3% раствор NH_4OH на дне камеры). На рис. 2 дана фотография хроматограммы одного из таких опытов. Расщепление аргинина с образованием орнитина было обнаружено только в опыте с клетками из 43-часовой культуры при pH 6,4.

При pH 9,5, оптимальном для действия аргиназы из тканей животных ([8]), расщепления аргинина не происходило. Клетки из более старых 63-часовых культур не расщепляли аргинин. Путем хроматографии на бумаге ([9]) мы не обнаружили мочевины в реакционной смеси. Отсутствие ее, повидимому, объясняется наличием весьма активной уреазы, действующей в интервале pH, при котором расщеплялся аргинин. В данном случае нет оснований предполагать существование другого известного механизма расщепления аргинина до орнитина через цитрулин ([10]), так как последний не был обнаружен. Все это дает право утверждать, что клетки азотобактера расщепляют аргинин с образованием орнитина и мочевины, которая и индуцирует образование активной уреазы.

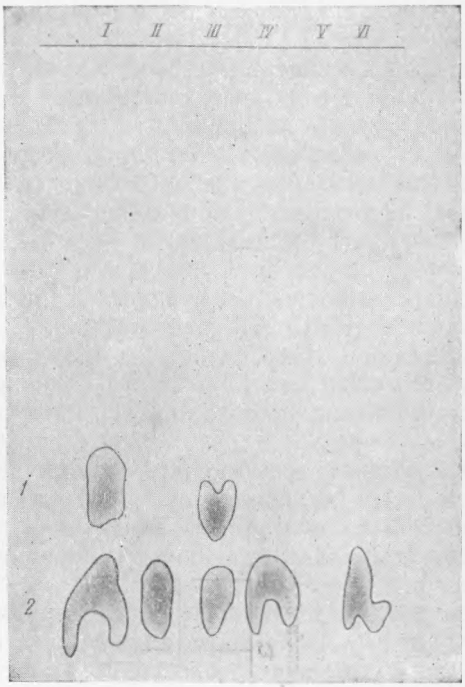


Рис. 2. Хроматограмма аминокислот, образуемых суспензиями клеток A. agile из аргинина. *1* — орнитин, *2* — аргинин. Реакционные смеси после 48 час. экспозиции: *I* — орнитин и аргинин (pH 6,4, контроль); *II* — аргинин + + суспензия клеток из 68-часовой культуры (pH 9,5, опыт); *III* — аргинин + суспензия клеток из 43-часовой культуры (pH 6,4, опыт); *IV* — аргинин + суспензия клеток из 43-часовой культуры (pH 9,5, опыт); *V* — суспензия клеток из 43-часовой культуры (pH 6,4, контроль); *VI* — аргинин (pH 9,5, контроль)

Следует отметить, что нами впервые непосредственно установлен факт наличия уреазы у видов азотобактера и у таких штаммов, которые длительное время культивировались в лаборатории, не сталкиваясь с вносимой извне мочевиной. До сих пор весьма распространен взгляд ([11]), согласно которому образуемые микроорганизмами ферменты подразделяются на «адаптивные» — образующиеся в клетке под влиянием внесенного извне специфического субстрата — и «конститутивные», которые постоянно содержатся в клетках и образуются последними независимо от наличия в среде специфического субстрата. Нам кажется, что деление ферментов микробов на «адаптивные» и «конститутивные» не отвечает действительным фактам, потому что не учитывает роли веществ, образуемых организмами в процессе собственного обмена.

Поступило
28 IX 1954

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] М. В. Федоров, Биологическая фиксация азота атмосферы, 1952. [2] R. H. Burris, J. Biol. Chem., **143**, 509 (1942). [3] С. П. Костычев и др., Тр. отд. с.-х. микробиол. Гос. инст. опытной агрономии, **1**, 91 (1926). [4] С. П. Костычев, Изв. АН СССР, ИМЕН, сер. 7, № 5, 661 (1931). [5] D. B. Sumner, Methoden der Fermentforsch., **2**, 1941, S. 1987. [6] Н. П. Мешкова, С. Е. Северин, Практикум по биохимии животных, 1950. [7] K. M. Harmon, C. Niemann, J. Biol. Chem., **177**, No. 2, 601 (1949). [8] Д. Б. Самнер, Г. Ф. Сомерс, Химия ферментов и методы их исследования, 1948. [9] J. K. Miettinen, A. J. Virtanen, Physiol. Plantarum, **5**, No. 4, 540 (1952). [10] H. D. Slade, Arch. Biochem. (and Biophys., **42**, No. 1, 204 (1953). [11] H. Karström, Erg. Enzymforsch., **7**, 350 1937—1938). [12] В. И. Любимов, Микробиология, **23**, в. 5, 584 (1954).