

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р



ТИМИРЯЗЕВСКИЕ ЧТЕНИЯ

XXXI

Я. В. ПЕЙВЕ

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ
АТМОСФЕРНОГО АЗОТА

24 коп.

ИЗДАТЕЛЬСТВО
«НАУКА»

А К А Д Е М И Я Н А У К С С С Р
ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ им. К. А. ТИМИРЯЗЕВА

Я. В. ПЕЙВЕ

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ
И БИОЛОГИЧЕСКАЯ ФИКСАЦИЯ
АТМОСФЕРНОГО АЗОТА

*Доложено
на тридцать первом ежегодном
Тимирязевском чтении
3 июня 1970 года*



ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
МОСКВА 1971

*Президиум Академии наук СССР
постановил проводить научные чтения, посвященные памяти
выдающегося русского биолога К. А. Тимирязева,
ежегодно 3 июня, в день рождения ученого*

Микроэлементы и биологическая фиксация атмосферного азота. Пейве Я. В. 1971. М., «Наука», стр. 1—52.

В настоящем 31 Тимирязевском чтении рассматривается роль микроэлементов — молибдена, меди, кобальта, бора, железа и других в биологической фиксации атмосферного азота. Биологически связанный азот является важным фактором повышения урожайности сельскохозяйственных культур и содержания белка в урожае. К. А. Тимирязев был одним из пионеров изучения этой проблемы. Процесс фиксации осуществляется азотфиксирующими микроорганизмами, живущими в почве и в клубеньках бобовых культур. Связывание атмосферного азота катализируется ферментами, в состав которых входят металлы — микроэлементы.

В работе описываются механизмы азотфиксации и приведены данные о повышении урожайности бобовых культур под влиянием микроэлементов.

Издание рассчитано на физиологов и биохимиков растений, микробиологов, специалистов сельского хозяйства, а также преподавателей, аспирантов и студентов биологических и сельскохозяйственных факультетов.

Табл. 5. Илл. 16. Библ. 5 стр.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема биологической фиксации атмосферного азота имеет важное общетеоретическое и народнохозяйственное значение. Биологический азот, наряду с азотом минеральных и органических удобрений, является одним из основных средств повышения урожайности сельскохозяйственных культур и содержания белка в урожае. Это неоднократно подчеркивал в своих работах основоположник советской агрохимии академик Д. Н. Прянишников.

Атмосферный азот фиксируется свободноживущими в почве микроорганизмами и клубеньковыми бактериями на корнях у бобовых культур. Процесс фиксации N_2 осуществляется при участии ферментов, в состав которых входят металлы-микроэлементы. К таким металлам мы причисляем и железо, хотя последние по существующей классификации не относятся к микроэлементам. Но это металл, каталитические функции которого близки к функциям некоторых металлов-микроэлементов.

Знаменательно, что у истоков научной разработки и проблемы микроэлементов и проблемы биологической фиксации молекулярного азота стоял Климент Аркадьевич Тимирязев, памяти которого и посвящается настоящее чтение.

В третьем томе трудов Санкт-Петербургского общества естествоиспытателей за 1872 год опубликован протокол заседания ботанического отделения этого общества, на котором молодой ученый Климент Аркадьевич Тимирязев (ему было тогда всего лишь 29 лет) сделал сообщение «О вероятном значении цинка в экономии растений».

В этом сообщении К. А. Тимирязев привел данные своих опытов с кукурузой, которая выращивалась на смеси Кнопа: в одном варианте с железом, в другом без железа. Без железа у растений развивался хлороз. Но этот хлороз устранялся, если листья смазывались солями железа или цинка. Таким образом, уже в те годы, т. е. около 100 лет тому назад, К. А. Тимирязев провел перые в нашей стране физиологические опыты по выяснению роли таких элементов минерального питания, как железо и цинк. Он совершенно правильно связывал действие этих элементов с процессами фотосинтеза и превращениями хлорофилла.



Климент Аркадьевич Тимирязев

Но, конечно, уровень науки в то время не позволял приступить к расшифровке физиологических и биохимических механизмов этого явления. Сейчас мы знаем, что и железо, и цинк входят в состав ряда ферментов и ферментных систем, катализирующих различные биохимические реакции в клетках живых организмов, в том числе и реакции, связанные с фотосинтезом (Zn, Fe), и процессы биохимической фиксации молекулярного азота (Fe, Mo). Еще при зарождении учения о ферментах К. А. Тимирязев придал им большое значение. Так, в своей замечательной книге «Жизнь растений», первое издание которой вышло в 1878 году, он писал: «Под ферментом обычно разумеют такое вещество, которое, будучи употреблено обыкновенно в ничтожном количестве, в состоянии вызвать химическое превращение других веществ. Таких ферментов существует очень много» (К. А. Тимирязев. «Жизнь растений». Избранные сочинения в четырех томах, том III, М., Сельхозгиз, 1948, стр. 93). К. А. Тимирязев подчерки-

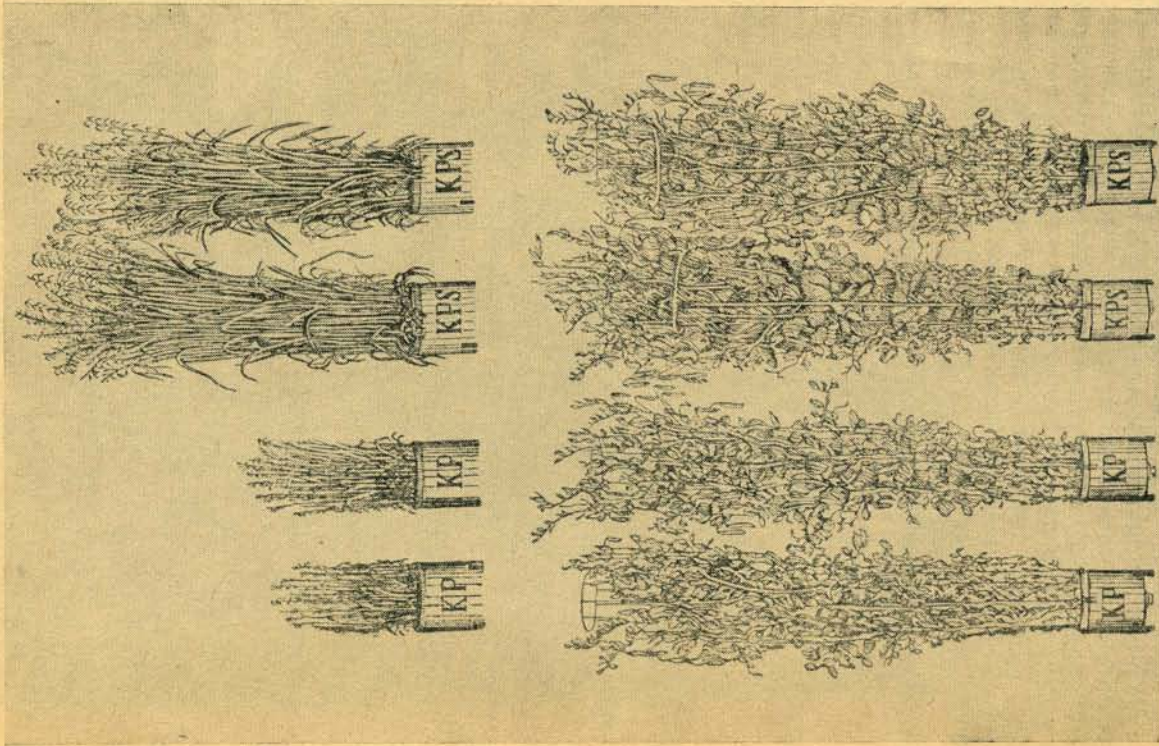


Рис. 1. Действие азотных удобрений (селитры — S) на овес и горох (по К. А. Тимирязеву)

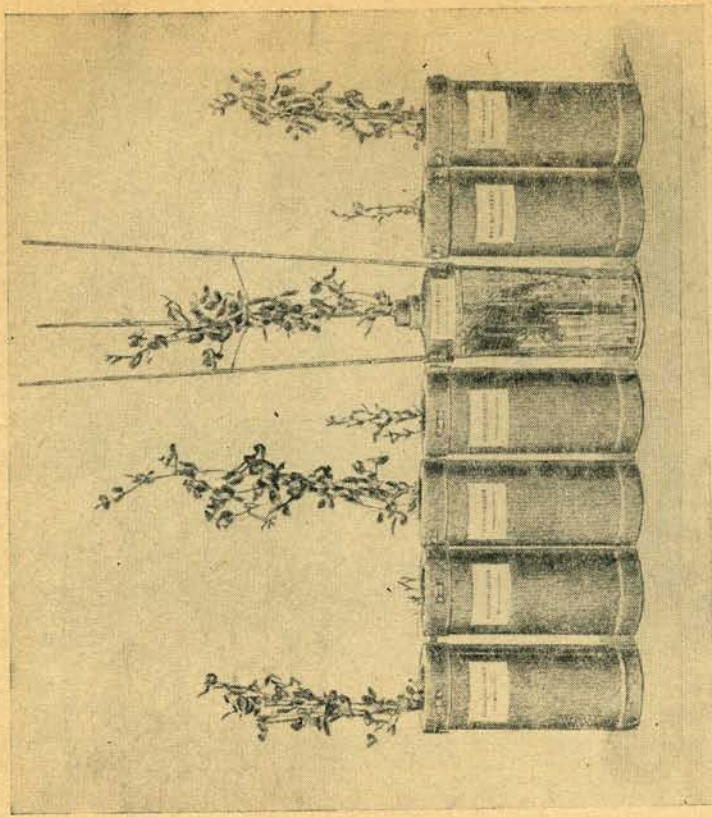


Рис. 2. Заражение почвы микроорганизмами и рост гороха
(по К. А. Тимирязеву)

При заражении клубеньковыми бактериями рост гороха идет нормально. Без заражения — резкое угнетение роста.

вал важную роль ферментов в углеводном и азотном обмене растений.

В своей лекции «Источники азота растений», опубликованной в 1893 году, К. А. Тимирязев уже непосредственно касается усвоения молекулярного азота бобовыми растениями. Излагая результаты опытов Буссенго и Гельригеля, он подчеркивает особенно важную роль бобовых культур в земледелии (рис. 1, 2). В результате заражения особыми микроорганизмами на корнях бобовых культур образуются клубеньки, или желвачки, как их предлагал назвать К. А. Тимирязев. В этих клубеньках и осуществляются процессы усвоения азота воздуха (рис. 3). При этом К. А. Тимирязев ссылается на работы М. С. Воронина, который еще в 1886 г. показал, что в клубеньках содержатся образования, во всем схожие с бактериями (рис. 4, 5). Он также высоко оценивает работы А. Пражмовского, детально исследовавшего клубеньковые бак-

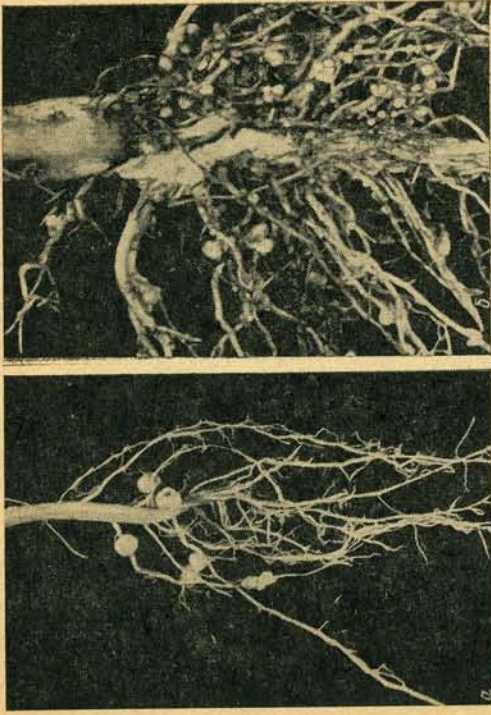


Рис. 3. Клубеньки на корнях
сои (а), кормовых бобов (б) и
люпина (в)

фотоснимки лаборатории биохимии
микрорэлементов ИФР

терии и внедрение их в корень бобовых растений. Однако в опытах самого К. А. Тимирязева, проведенных в 1892 году с клубеньками, отделенными и не отделенными от корней, ему не удалось показать поглощения азота из атмосферы.

Оценивая результаты этих опытов, К. А. Тимирязев писал: «Мы не знаем, где и как происходит этот еще загадочный с химической точки зрения процесс усвоения свободного азота» (цит. по книге «Земледелие и физиология растений». Избранные сочинения К. А. Тимирязева в четырех томах, том II, М., Сельхозгиз, 1948, стр. 198).

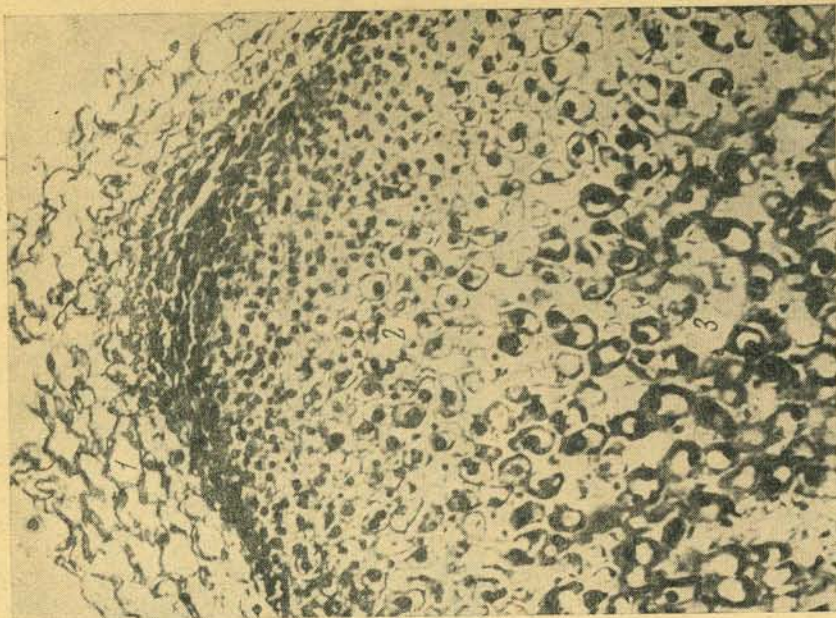


Рис. 4. Анатомическое строение клубенька кормовых бобов (Пейве и др., 1968)
 1 — кора; 2 — зона роста; 3 — участок бактериальной ткани, прилегающей к зоне роста.
 Клетки этой ткани заполнены клубеньковыми бактериями, активно фиксирующими азот

Вероятно, методическая сложность проведения опытов помешала Тимирязеву прямыми методами определить усвоение свободного азота в клубеньках бобовых культур. Но сам факт фиксации молекулярного азота клубеньками бобовых культур К. А. Тимирязев никогда не подвергал сомнению.

В конце прошлого столетия (1893 г.) знаменитый русский ученый С. Н. Виноградский впервые выделил свободноживущие в почве анаэробные бактерии *Clostridium pasteurianum*, способные фиксировать молекулярный азот воздуха. Эти бактерии в процессах фиксации свободного азота сбраживали глюкозу до уксусной



Рис. 5. Электронномикроскопический срез бактериальной ткани клубенька люпина (Генерозова, Ягодина, 1969)
 Видны бактериальные формы с максимальными размерами $3 \times 1-0,5 \text{ мк}$. Каждая бактериальная клетка покрыта капсулой, отграниченной снизу и мембраной

и масляной кислот с выделением углекислого газа и молекулярного водорода. В самом начале XX столетия Бейеринком (Beijerinck, 1901) были выделены чистые культуры аэробных азотфиксирующих бактерий *Azotobacter chroococcum* и *Azotobacter agilis*. Используя в качестве источника энергии органическое вещество почвы, эти свободноживущие бактерии фиксируют молекулярный азот.

Сколько расходуется почвенного органического вещества для фиксации азота? По примерным расчетам, на 1 кг углеводов *Azotobacter vinelandii* фиксирует всего лишь 20 г азота. *Clostridium pasteurianum* работает с меньшим коэффициентом действия: на 1 кг использованных углеводов эта бактерия связывает лишь 6—7 г азота. Какой же ежегодный приход азота за счет фиксации его из воздуха дают клубеньковые бактерии при возделывании бобовых трав и свободноживущие почвенные азотфиксаторы? По расчетам Д. Н. Прянишникова (1945) и И. В. Тюрина (1957), клубеньковые бактерии на корнях люцерны связывают в среднем 300 кг азота на гектар; при этом за счет фиксации в почве после уборки урожая остается около 100 кг азота, который используется последующими культурами, высеваемыми в севообороте.

Клевер за счет фиксации накапливает азота 150—160 кг/га, из которых 75—100 кг идет на обогащение почвы. Такие же величины фиксации получаются для люпина. Несколько меньшие величины азотонакопления имеют место у гороха и вики. По сравнению с симбиотическими азотфиксаторами свободноживущие в почве бактерии (*Azotobacter*, *Clostridium*) дают значительно меньшие величины азотонакопления в почве. По данным И. В. Тюрина (1957), за счет использования углеводов корневых и пожнивных остатков после уборки зерновых культур (при урожае 20 ц/га) эти микроорганизмы могут накопить на 1 га лишь 10 кг азота. Однако и эта величина в балансе азота заслуживает серьезного внимания. Способностью усваивать молекулярный азот обладает также ряд других бактерий. К ним относятся фотосинтезирующие бактерии (например, *Rhodospirillum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium*, *Chlorobacterium*), сульфатвосстанавливающие бактерии *Desulfovibrio*, а также ряд синезеленых водорослей из семейства *Nostocaceae* и *Colobryx*. Синезеленые водоросли играют огромную роль в балансе азота на рисовых полях: они могут накапливать 50—150 кг азота на гектар в год. Этот азот используется рисом и другими сельскохозяйственными культурами.

Симбиотическая фиксация молекулярного азота известна и для многих небобовых культур, относящихся к родам *Alnus*, *Sonchitis*, *Mugica* и др. У некоторых растений клубеньки при этом развиваются не на корнях, а на листьях. Растения с листовыми клубеньками из семейства *Rubiaceae* и *Muticaceae* произрастают, например, в тропических районах Африки, Мадагаскара и дру-

гих. Листовые клубеньки также населены бактериями, осуществляющими, возможно, симбиотическую фиксацию азота. Для высших растений без симбиоза с микроорганизмами фиксация молекулярного азота не установлена.

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

Академик Д. Н. Прянишников в своей замечательной книге «Азот в жизни растений и в земледелии СССР» (1945, стр. 75) писал: «Свободный азот, из которого почти на четыре пятых состоит одевающий зеленый мир воздушный океан, является первичным источником для накопления тех резервов связанного азота, которыми располагает растительный (а через последний и животный) мир, причем два пути ведут через ряд этапов от азота воздуха к азоту нервной и мышечной ткани: один путь берет начало в клетках некоторых микроорганизмов, а другой — в колонках синтеза на крупных химических комбинатах». Каким образом мы можем характеризовать молекулярный азот как первичный источник связанного азота? Прежде всего необходимо привести характеристику химической активности молекулярного азота, способности его вступать в химические соединения.

Здесь необходимо отметить, что химически молекула азота является весьма инертной. В молекуле азота два атома связаны тройной связью $N \equiv N$. Эта молекула имеет три электронные пары, общие для двух атомов азота: $N::N$. Энергия диссоциации такой молекулы составляет 224,5 ккал/моль, и в данном случае для двухатомной молекулы она равна энергии связи. Наиболее трудно разорвать первую связь, на что требуется 126,9 ккал/моль. Для разрыва второй связи требуется лишь 59,2 ккал/моль и третьей связи — 38,4 ккал/моль.

Потенциал ионизации молекулярного азота (15,6 эв) почти равен потенциалу ионизации инертного газа аргона (15,76 эв). Каковы пути активации молекулярного азота? Рассмотрим прежде всего возможности окисления и восстановления молекулы N_2 .

Чтобы окислить молекулу азота, с его заполненной орбиты 2 p должен быть удален один электрон с высокой энергией связи — 15,6 эв. В этом случае можно получить положительно заряженный ион азота N_2^+ . Но это имеет место лишь при электрическом разряде. При комнатной температуре осуществить такую

ионизацию азота невозможно. Восстановление молекулы азота осуществить легче, чем окисление. При восстановлении электрон входит на соответствующую орбиту с энергией лишь 7 эв.

В результате получают отрицательно заряженные ионы азота N_2^- , у которых благодаря наличию дополнительных электронов на соответствующей орбите несколько ослаблены связи между атомами азота в молекуле N_2 . Известно, что процесс прямого восстановления молекулярного азота может быть осуществлен щелочными металлами, имеющими потенциалы ионизации порядка 4—5 эв.

Но эти соединения щелочных металлов с азотом крайне не устойчивы и при взаимодействии с водой дают аммиак и гидразин. Они не могут существовать в водных средах.

Совершенно ясно, что в биологических системах при фиксации молекулярного азота прямого окисления или восстановления молекулярного N_2 не наблюдается. Этот процесс может осуществляться лишь при помощи ферментативного катализа с участием металлоферментов, в состав которых входят переходные металлы. Эти металлы могут передавать электроны со своих орбит на симметричные и близкие по энергии орбиты молекулярного азота. При взаимодействии с такими металлоферментами азот восстанавливается или служит акцептором электронов. Это и лежит в основе фиксации молекулярного азота.

В результате соответствующего взаимодействия молекула азота оказывается как бы прикрепленной к иону переходного металла. Все это ослабляет прочность связей в молекуле азота и делает ее более реакционноспособной.

Химики уже найдены химические соединения, у которых азот связан с переходными металлами. Так, в 1965 году Аллен и Сенофф (Allen, Senoff, 1965) впервые сообщили о солях, содержащих в качестве аниона рутений, образующий соответствующие комплексы с азотом $[Ru(NH_3)_5(N_2)]^{2+}$. Авторы отмечают, что в этом соединении два атома азота, хотя и связаны тройной связью, но эта связь ослаблена вследствие присоединения азота к металлу. Азот в соединении с рутением может быть восстановлен до аммиака боргидридом натрия. Таким образом, если соединения рутения с азотом получать непосредственно из атмосферного азота и затем восстанавливать боргидридом натрия, мы могли бы получить модель химической фиксации молекулярного азота в мягких условиях или модель нитрогеназы.

Колман и Кэнг (Collman, Kang, 1966) получили азотиридидные комплексы, а Ямамото с соотр. (Yamamoto et al., 1967) получили непосредственно с молекулярным азотом кобальтогазовые комплексы. Далее Сакко и Росси (Sacco, Rossi, 1967) нашли, что при взаимодействии кобальтгидрида с азотом также образуются азотсодержащие комплексы.

При взаимодействии с ферментом гидрогеназой азот комплексного кобальтового соединения восстанавливается до аммиака. Однако в природе не встречаются комплексы, подобные описанным выше. Но, может быть, существуют природные ферменты с аналогичным расположением в них металлов.

В 1967 году были опубликованы работы Вольпина и Шура, которые указали на возможность активации молекулярного азота при обычных температурах и давлении.

По данным этих авторов, комплексы таких переходных металлов, как Ti, Cr, Mo, W, Fe при взаимодействии с органическими соединениями магния, лития и алюминия способны реагировать с молекулярным азотом при комнатной температуре. Образуется соединение азота с переходным металлом, которое при гидролизе дает аммиак. При этом углеводородный лиганд у атома переходного металла увеличивает активность фиксации N_2 . В качестве восстановителей могут фигурировать и неорганические восстановители, например, $LiAlH_4$, $Mg+MgJ_2(Mg+J_2)$, $Li+LiJ$. Для системы $TiCl_4+Mg+MgJ_2$ в эфирно-бензольном растворе образуется 1,3 моля NH_3 на моль $TiCl_4$ (за 10 часов).

Важное значение может иметь переход электронов металла на свободные орбиты N_2 и образование соответствующих связей в комплексах с азотом. Существенное значение имеют электронно-донорные свойства переходного металла. Прочные комплексы с азотом способны образовывать только те соединения переходных металлов, которые имеют лишь весьма слабые электрические заряды или не имеют их совсем.

ПУТИ СВЯЗЫВАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА У МИКРООРГАНИЗМОВ

Исследователи уже в конце прошлого столетия пытались расшифровать химизм биологической фиксации молекулярного азота. При этом высказывались различные предположения о путях связывания N_2 . Речь шла как об окислении, так и о восстановлении молекулярного азота. Уже в 1888 году (Gautier, Drogin, 1888) было высказано предположение, что азот, включаясь в процессы обмена веществ, сначала окисляется до азотистой, а затем азотной кислоты. Но этот путь фиксации N_2 в последующем не был подтвержден экспериментально. Крупнейший специалист в области азотного питания растений академик Д. Н. Прянишников считал переход от N_2 к NH_3 через окислы азота невозможным

я противоречащим принципу возможной экономии энергии у организмов. Другой путь — восстановительное связывание молекулярного азота до аммиака — был впервые предложен известным русским ученым С. Н. Виноградским в конце прошлого столетия. Так, в своем сообщении 1894 года «Об усвоении микробами газообразного азота атмосферы» С. Н. Виноградский писал: «Механизм процесса усвоения азота представляется в данном случае как действие водорода в момент его выделения на газообразный азот в живой протоплазме клетки. Гипотеза, предполагающая, что синтез аммиака является непосредственным результатом этого процесса, кажется нам обоснованной» (Виноградский, 1952, стр. 340).

Знаменательно, что в 1894 году на IX съезде естествоиспытателей и врачей выступили с докладами К. А. Тимирязев и С. Н. Виноградский. Именно на этом съезде С. Н. Виноградский выступил с докладами о круговороте азота в природе и о бактериях, ассимилирующих азот из воздуха.

Гипотеза о восстановительной фиксации молекулы N_2 поддерживалась и развивалась С. Н. Виноградским в течение всей его жизни. С. Н. Виноградский не имел возможности детально исследовать промежуточные этапы фиксации азота и ферментативные механизмы этого процесса. Этим занимались и занимаются еще и в настоящее время многие исследователи. Биохимические механизмы фиксации молекулярного азота оказались весьма сложными и трудно поддающимися расшифровке.

Однако уже в 1932 году С. Н. Виноградский выдвинул гипотезу, что синтез аммиака осуществляется каталитически при помощи специальной энзимной системы, а в 1941 году им была опубликована статья об энзиматическом синтезе аммиака в почве и воде.

В этой статье С. Н. Виноградский указывает, что «азотобактер в первую очередь образует энзиматическую систему — азогидразу, которая служит катализатором при синтезе аммиака» и что «...молекулярный азот действует как акцептор активного водорода» (Виноградский, 1952, стр. 748).

Теорию Виноградского о фиксации молекулярного азота через аммиак развивал С. П. Костычев с сотрудниками, которые в 1926 году опубликовали свои исследования по вопросу о связывании молекулярного азота микробом *Azotobacter agilis*. Восстановительный путь связывания молекулярного азота при различных вариантах промежуточных этапов принят большинством исследователей и в настоящее время. В этом большая заслуга С. Н. Виноградского как первооткрывателя.

В настоящее время большие успехи достигнуты в изучении бесклеточной фиксации молекулярного азота ферментными системами свободноживущих микроорганизмов — азотфиксаторов, а также клубеньковых бактерий.

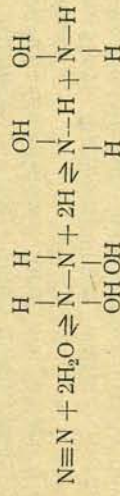
Первые работы в этом направлении были проведены в лаборатории академика А. Н. Баха еще в 1934 году. Бах совершенно правильно считал, что при решении вопроса о бесклеточной фиксации молекулярного азота необходимо изучать сопряженное действие окислительно-восстановительных ферментов. Однако вследствие еще слабого развития энзимологии в начале тридцатых годов А. Н. Бахом не были получены в его опытах достаточные воспроизводимые данные, но идеи А. Н. Баха сыграли огромную положительную роль.

Еще при жизни Виноградского Баррис и Миллер (Burgis, Miller, 1941) в 1941 году применили для изучения фиксации молекулярного азота тяжелый изотоп N^{15} . При помощи этой новой методики было подтверждено, что как у свободных почвенных азотфиксаторов, так и у клубеньковых бактерий, первым устойчивым продуктом фиксации является аммиак, который используется организмами для синтеза аминокислот. В первую очередь меченый азот обнаруживался в составе глутаминовой и аспарагиновой кислот. Баррис и Миллер показали, что такая же картина наблюдается и при использовании микроорганизмами аммиака в качестве единственного источника азота.

Ионы аммония реагируют с α -кетоглутаровой кислотой при участии глутаматдегидрогеназы. В результате в процессе восстановления аминирования образуется глутаминовая кислота. Это было показано для азотобактера в работе Яковлевой, Кретовича и других сотрудников (1964) Института биохимии им. А. Н. Баха АН СССР. А что получается при наличии нитратов? Установлено, что нитраты восстанавливаются при помощи молибденсодержащего фермента нитратредуктазы до аммиака, который используется в процессах биосинтеза аминокислот и белков. В то же время при избытке аммиака азотфиксация подается — нет биологической необходимости фиксировать молекулярный азот, когда для питания может быть использован связанный азот.

Несомненно, что в процессах связывания молекулярного азота до аммиака имеется ряд промежуточных стадий. Процесс этот многоступенчатый. Однако промежуточные продукты реакции неустойчивы, они не накапливаются и поэтому их трудно изучать.

Уже в 1931 году Блом (Blom, 1931) высказал предположение, что молекулярный азот в процессах фиксации подвергается гидролизу с образованием диоксигидрамина, а затем, при последующем восстановлении, и гидроксилламина:



При этом на первых этапах фиксации N_2 азот взаимодействует с железосодержащим органическим катализатором. Блом был недалек от истины: участие железосодержащих белков в фиксации молекулярного азота сейчас доказано другими исследователями. Финский ученый А. Виртанен (Virtapen, 1945, 1947, 1955; Virtapen et al., 1945, 1946, 1947), изучая фиксацию азота бобовыми культурами, также считал, что процесс фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур идет через гидроксиламин, который реагирует со шавелевоуксусной кислотой растения и затем вступает в дальнейшие биохимические реакции.

По мнению Виртанена, синтез гидроксиламина катализируют атомы железа.

Однако точного экспериментального подтверждения гипотезы Виртанена не нашла. Так, Виртанен находил среди корневых выделений бобовых культур и аспарагиновую кислоту, и оксим, но другим исследователям подтвердить это не удалось. Нельзя было также точно установить, что обнаруженный в суспензиях *Azotobacter* гидроксиламин является продуктом азотфиксации, ибо гидроксиламин образуется и при питании как аммиачным, так и нитратным азотом.

В то же время нельзя отрицать, что гидроксиламин может быть промежуточным продуктом азотфиксации. Он легко образуется после того, как разрывается одна из трех связей молекулярного азота. Но в результате воздействия фермента гидроксиламинредуктазы гидроксиламин восстанавливается до аммиака. Фермент гидроксиламинредуктаза активируется при помощи микрэлементов (Mn и др.). Гидроксиламин является химически весьма активным соединением и поэтому не накапливается в виде промежуточного соединения азотфиксации. Добавленный к питательным средам, он токсичен для азотобактера.

Ряд авторов считали, что промежуточными продуктами при фиксации N_2 являются динимид и гидразин. Так, Виланд (Wieland, 1922) впервые выдвинул гипотезу, согласно которой первым продуктом фиксации азота является динимид; последний, восстанавливаясь, переходит в гидразин и аммиак по следующей схеме:



Вильсон и Баррис (Wilson, Burris, 1947) подтвердили основные положения Виланда об образовании динимида и гидразина в качестве промежуточных продуктов азотфиксации. Однако гидразин также токсичен и не может накапливаться в клетках в заметных количествах. Кроме того, он является весьма нестойким соединением.

Профессор М. В. Федоров (1952) также считал, что при восстановлении молекулярного азота образуются производные гид-

разина. Гидразин, по М. В. Федорову, реагирует с кетокислотами и восстанавливает их до аминокислот, а гидроксиламин и аммиак образуются лишь в качестве побочных продуктов реакции. М. В. Федоров, основываясь на косвенных доказательствах, предложил общую схему фиксации азота всеми азотфиксирующими микроорганизмами, по которой процесс катализируется специфическим катализатором (ферментом), содержащим карбонильные группы и реагирующим с молекулярным азотом. Введение в молекулу простегической группы фермента соединений типа борной и молибденовой кислот (через аминную группу) повышает активность фиксации азота.

М. В. Федоров был в известной мере прав, подчеркивая общность механизма фиксации азота всеми азотфиксирующими организмами, указывая, что реакция катализируется каким-то ферментом, активируемым микроэлементами. Но гипотеза М. В. Федорова впоследствии не могла быть подтверждена термодинамическими расчетами, особенно для первичных реакций связывания N_2 , а также для ферментативных механизмов фиксации.

Нельзя не упомянуть также о гипотезе Е. Н. Гапона (1947), который предложил один из вариантов восстановления молекулярного азота до аммиака. По мнению Гапона, молекулярный азот сначала адсорбируется и активируется ферментом, содержащим геминное железо. Затем происходит восстановление N_2 молекулярным водородом.

При адсорбции азота геминным ферментом образуются нитриды, которые восстанавливаются водородом до аммиака, возможно, через стадию динимида.

Е. Н. Гапон сделал лишь физико-химические расчеты, но не представил никаких данных, подтверждающих его гипотезу.

В соответствии с гипотезой Ю. И. Карнаухова (1965) хемосорбция азота осуществляется шавелевоуксусной и α -кетоглутаровой кислотами, которые, по мнению этого автора, служат активными центрами ферментов. Эти центры прикрепляются к белковой части фермента при помощи карбонильных групп и атомов поливалентных металлов. В роли таких металлов может выступать молибден и, возможно, железо и кобальт. Нитрогеназная и гидрогеназная активности могут, по Карнаухову, совмещаться в одном центре фермента. Однако последние экспериментальные данные Мортенсона (Mortenson et al., 1967) не подтверждают этого, и, очевидно, требуются дальнейшие исследования в этом направлении.

В последние годы достигнуты крупные успехи в изучении механизма азотфиксации у свободноживущих почвенных бактерий — азотфиксаторов (*Azotobacter*, *Clostridium*). Проведен ряд исследований по проблеме симбиотической фиксации азота клубеньковыми бактериями бобовых культур. По-видимому, металлостановлению

ферменты, содержащие молибден, железо и кобальт, имеют сходные функции как в процессах активации молекулярного азота у свободноживущих почвенных азотфиксаторов, так и у клубеньковых бактерий бобовых культур.

Несколько лет назад Бален и Ле Комте (Balen, Le Comte, 1966) выделили в составе азотактивирующего комплекса у азотобактера два металлсодержащих белка. Один из этих белков содержит молибден и негеминное железо, а другой — лишь негеминное железо. Только совместное присутствие этих ферментов катализовало азотфиксацию. Взятые в отдельности эти белковые фракции не обладали азотфиксирующей активностью. Р. И. Гвоздев, В. А. Яковлев, В. Р. Линде, Л. В. Воробьев и Е. Я. Алфимова (1969) исследовали компоненты клеток *Azotobacter*, содержащие молибден и негеминное железо. Из белковых комплексов клеток молибденовый компонент выделялся при щелочной реакции (рН 8,5—9,5). Этот компонент имел отрицательный заряд. Негеминное железо в этих условиях оставалось в комплексе с белками и могло быть выделено лишь комплексобразующими реагентами (*o*-фенантролином, 8-оксихинолином).

Авторы высказали предположение, что молибденсодержащие частицы являются азотактивирующим комплексом, состоящим максимум из 6 субъединиц.

В работе В. Л. Ганелина, Н. П. Львова, Б. Э. Кирштейне, В. И. Любимова, В. Л. Креговича (1969) изучались железо- и молибденсодержащие белки азотфиксирующей фракции из клеток *Azotobacter*, выращенных на средах с радиоактивными изотопами Mo^{99} или Fe^{55+59} .

Было показано, что значительная часть Мо и негеминного железа локализована после диализа во фракции, оседающей при 25—50% насыщения сульфатом аммония (фракция 50). Эта фракция при электрофорезе в полиакриламидном геле разделялась еще на 8 фракций, в которых содержалось негеминное железо и, по-видимому, молибденсодержащие переносчики электронов. При рН 6,8 молибденовый комплекс мигрировал отдельной полосой, обгоняя основную массу белков.

Заслуживают внимания недавние работы Мортенсона и сорудников (Mortenson et al., 1967), которые выделили два белковых компонента (фермента), участвующих в фиксации молекулярного азота у *Clostridium pasteurianum*. Это молибдоферредоксин и азоферредоксин. Первый — с молекулярным весом около 100 000, второй — около 40 000. Эти ферменты отсутствовали в экстрактах клеток, растущих на NH_3 . Для азотфиксации требуется одновременное наличие молибдоферредоксина и азоферредоксина.

В составе молибдоферредоксина 1 атом Мо приходится на 1 молекулу фермента. В этот фермент входят также железо и магний. Азоферредоксин молибдена не содержит. По данным

Мортенсона, Мо- и Fe-содержащий белок включается в окислительно-восстановительные реакции фиксации N_2 . Ферредоксин подобный белок, содержащий негеминное железо, найден в нашей лаборатории в клубеньках бобовых культур.

Рассмотрим более подробно роль отдельных металлов и металлоферментов в фиксации молекулярного азота.

ЖЕЛЕЗОСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ, ПРИНИМАЮЩИЕ УЧАСТИЕ В ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА

Как уже упоминалось выше, важная роль железосодержащих катализаторов в процессах фиксации молекулярного азота подчеркивалась еще в ряде ранних гипотез (Блом, Галон, Виртанен). Но такие катализаторы в то время не были выделены. Не удавалось также определить их функции. Лишь в последние годы стала выявляться роль таких железосодержащих белков, как ферредоксин, гемоглобин, каталаза и другие.

ФЕРРЕДОКСИН

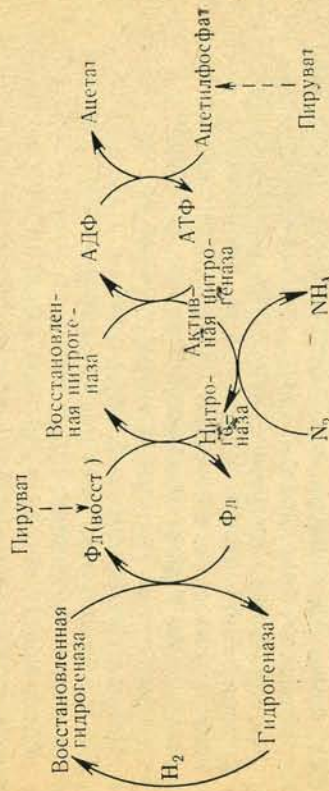
Этот железосодержащий белок, имеющий негеминную природу, был открыт в 1962 году Мортенсоном и сорудниками (Mortenson et al., 1962a, b). Ферредоксин содержится в экстрактах азотфиксирующей бактерии *Cl. pasteurianum* и участвует в переносе электронов.

При участии ферредоксина осуществляется фосфорокластическое расщепление пирувата:



Ферредоксин был найден также в составе других анаэробных бактерий. Он был получен в кристаллическом виде, и молекулярный вес его колебался от 6000 до 12 000. Каждая молекула ферредоксина содержит пять атомов железа и пять атомов серы. Как железо, так и сера входят в состав активного центра фермента. По данным Танака и сорг. (Tanaka et al., 1965), ферредоксин *Cl. pasteurianum* имеет следующую структуру:

Мортенсоном предложена следующая схема участия ферредоксина и АТФ в фиксации азота в бесклеточных экстрактах из *Cl. pasteurianum*:



В соответствии с этой схемой, гидрогеназа взаимодействует с ферредоксином, а последний — с ферментом нитрогеназой, которая катализирует восстановление N_2 до NH_3 . Источником энергии является АТФ. Ферредоксин восстанавливает нитрогеназу, которая активирует молекулярный азот.

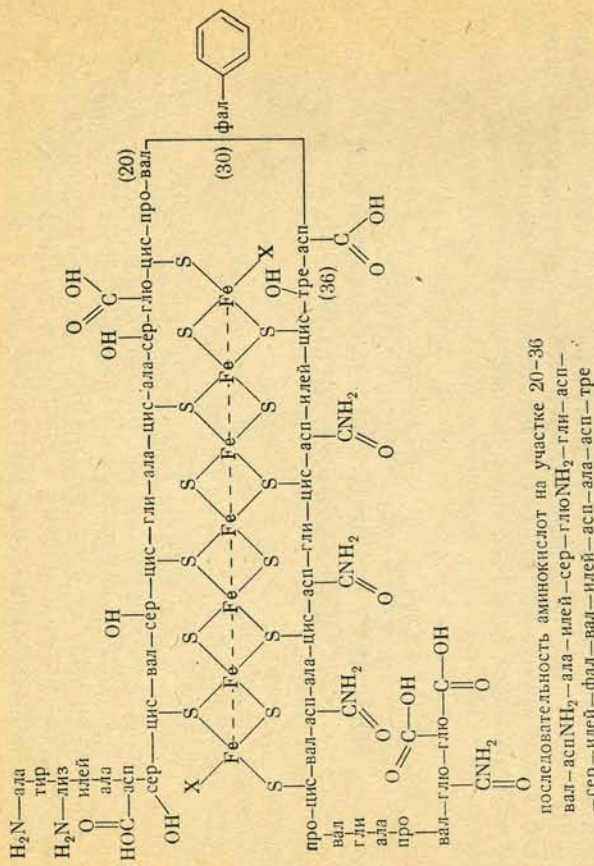
В хлоропластах зеленых растений ферредоксин образует комплекс с содержащим негеминное железо белком — ферредоксин-НАДФ-редуктазой, играющей большую роль в переносе электронов.

В нашей лаборатории Г. Я. Жизневской (1969) изучалось содержание ферредоксина в листьях и клубеньках бобовых культур. Была выявлена тесная связь уровня содержания ферредоксина в листьях с активностью нитратредуктазы. Так, например, листья кормовых бобов имеют в 5 раз более высокое содержание ферредоксина, чем листья люпина, и в то же время в 3—5 раз более высокую активность нитратредуктазы (Пейве, Жизневская, 1961).

Соя по сравнению с кормовыми бобами и люпином имеет в листьях наибольшее содержание ферредоксина. Одновременно клубеньки сои обладают в несколько раз большей активностью гидрогеназы, чем клубеньки люпина и кормовых бобов. Активно фиксирующие азот клубеньки всегда имеют значительную активность гидрогеназы.

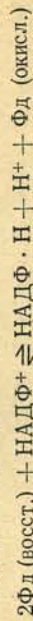
Исследования белков из клубеньков бобовых культур, проведенные Г. Я. Жизневской (1969), позволили обнаружить в клубеньках и другие железосодержащие белки негеминной природы. Негеминный белок клубеньков выделяется при тех же условиях, как и ферредоксин листьев. По-видимому, этот белок участвует в фиксации N_2 в клубеньках бобовых культур.

Характерно, что содержащая негеминное железо белковая фракция из клубеньков бобовых растений имеет общие свойства



В процессах восстановления ферредоксин функционирует между дегидрогеназой пировиноградной кислоты и гидрогеназой. Эта дегидрогеназа переносит электроны от пирувата к ферредоксину. Активность ферредоксина можно в какой-то мере определить по образованию ацетилфосфата и выделению водорода. Для реакции необходимо наличие КоА.

Характерно, что ферредоксин участвует и в восстановительном синтезе пирувата из углеводов, водорода и ацетилфосфата у фотосинтезирующей бактерии Chromatium. При изучении окислительно-восстановительных реакций азотного обмена важно учитывать, что ферредоксин связан также с превращением никотинамидадениндинуклеотидов по схеме



и с восстановлением флавиновых коферментов. В процессах фиксации молекулярного азота ферредоксин участвует также в восстановлении кобамидных соединений, гидроксилamina и нитритов. Теперь встает вопрос, в какой мере ферредоксин непосредственно связан с активацией и фиксацией молекулярного азота? Уже в 1964 году Юстахио и Харди (D'Eustachio, Hardy, 1964) показали, что ферредоксин функционирует в переносе электронов при фиксации N_2 . Он может восстанавливать фермент нитрогеназу, которая, взаимодействуя с АТФ, способна активировать молекулярный азот.

с ферридином азотобактера, выделенным Сырцовой, Яковлевым и Рачек (1968), по условиям осаждения сульфатом аммония, способности к адсорбции на ДЭАЭ-целлюлозе и электролитическому осаждению при возрастающей концентрации солевого раствора. Установлены сходные абсорбционные спектры с одним максимумом при 417—420 мкм и почти одинаковое содержание негеминового железа: в ферридине азотобактера найдено 39 микромолей негеминового железа на 1 г белка (Сырцова, Яковлева, Рачек), а в ферридине сои, по данным Жизневской, — 41 микромоль на 1 г белка. В клубеньках люпина и кормовых бобов «ферридиновая» фракция содержала несколько меньше количество железа на 1 г белка. Выделенные негеминные железосодержащие белки клубеньков являются низкомолекулярными, обладающими высокой электрофоретической подвижностью при электрофорезе в щелочной среде. По-видимому, эти белки клубеньков имеют сходные функции с соответствующими белками *Azotobacter*. Возможно, что они являются разновидностью ферредоксинов.

В нашей лаборатории Г. Я. Жизневской была обнаружена также положительная корреляция между количеством негеминных железосодержащих белков и клубенькового гемоглобина. Низкомолекулярные белки сопутствуют гемоглобину клубеньков. По-видимому, в функциях фиксации эти белки метаболически связаны.

Теперь мы переходим к характеристике гемоглобина или легемоглобина в клубеньках бобовых культур с точки зрения участия этого белка в фиксации молекулярного азота.

КЛУБЕНЬКОВЫЙ ГЕМОГЛОБИН

Гемоглобин — красный пигмент активных клубеньков бобовых культур — является железосодержащим геминным белком, который близок по своему составу к гемоглобину животных (Kubo, 1939; Keilin, Smith, 1947; Е. Федоров, 1955; Ellfolk, 1959, 1969a, b и др.).

Этот удивительный по своим свойствам пигмент связан с фиксацией молекулярного азота. Концентрация гемоглобина в клубеньках бобовых культур находится в прямой корреляции с уровнем азотфиксации. Азотфиксация начинается тогда, когда появляется в клубеньках гемоглобин, и прекращается, когда гемоглобин в клубеньках исчезает.

Клубеньки на корнях бобовых культур — это центры высокой биохимической активности, являющейся результатом симбиоза клубеньковых бактерий *Rhizobium* с высшим растением.

Особенно много гемоглобина синтезируется в клубеньках в период максимального роста растений, когда наиболее энергично протекают процессы фотосинтеза. В этот период гемоглобин клубеньков участвует в процессах фиксации молекулярного азо-

та, осуществляемых оксидоредуктазами при участии микроэлементов. Биохимический механизм этого сложного процесса пока еще окончательно не расшифрован, хотя изучение его представляет большой теоретический и практический интерес.

Большой интерес к клубенькам бобовых культур проявили русские ученые Коссович (Kossowitzsch, 1892), Ф. Крашенинников (1916). Уже в XIX веке было замечено, что ткани внутренней части клубеньков имеют красный или розовый цвет, при этом стареющие клубеньки теряют этот красный цвет, а малоэффективные в смысле накопления азота клубеньки обычно белого или бледно-желтого цвета (Prazmowsky, 1889).

В 1939 году японский ученый Кубо (Kubo, 1939) выделил красный пигмент из клубеньков сои фракционированием сульфатом аммония и, проведя спектроскопические исследования, установил, что полученный им пигмент является гемопротейдом, аналогичным гемоглобину животных. Клубеньковый гемоглобин при азрации давал две полосы поглощения — при 540 и 575 мкм. После восстановления гидросульфитом эти максимумы поглощения заменялись одним максимумом — при 555 мкм. Кубо предположил, что гемоглобин клубеньков действует как резервуар или переносчик кислорода аналогично гемоглобину животных и человека. Баррис и Хаас (Barriss, Haas, 1944) подтвердили данные Кубо о принадлежности красного пигмента клубеньков к гемопротейдам, но доказательств того, что клубеньковый гемоглобин способен к обратимому окисгенированию, ими получено не было. Они сделали вывод, что гемоглобин клубеньков не является переносчиком кислорода и функции его отличны от функций гемоглобина крови животных.

В 1945 году по вопросу о природе геминного комплекса из клубеньков появилось два важных исследования: Кейлина и Уонга (Keilin, Wang, 1945) в Англии и Вирганена (Virtanen, 1945) в Финляндии.

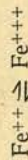
В работе Кейлина и Уонга с клубеньками сои показано, что красный раствор пигмента имеет два максимума поглощения — при 540 и 574 мкм; приводятся данные о способности клубенькового гемоглобина образовывать с кислородом воздуха лабильное соединение — оксигемоглобин — и о наличии в гемоглобине двухвалентного железа.

Авторы нашли, что выделенный ими гемоглобин обладает свойствами обратимого окисгенирования и что ни сама растительная клетка, ни отдельно культивируемые на питательной среде бактерии не способны к синтезу гемоглобина. Процесс синтеза гемоглобина в клубеньках бобовых осуществляется только при симбиотическом развитии *Rhizobium* с высшими растениями.

Виртанен и сотрудники (Virtanen, 1945; Virtanen, Laine, 1946; Virtanen et al., 1945, 1947) обнаружили корреляцию между

концентрацией гемоглобина в клубеньках и количеством молекулярного азота, фиксированного во время симбиотического роста, и установили, что наличие и уровень гемоглобина являются одним из критериев того, относится ли данная раса *Rhizobium* к эффективной, неэффективной или паразитической.

Обсуждая биохимическую роль гемоглобина в клубеньках, Виртанен (Virtanen, Laine, 1946) отметил, что участие гемоглобина в окислительно-восстановительных реакциях связано с обратимыми изменениями валентности железа:



Виртанен обнаружил, что в клубеньках бобовых кроме гемоглобина, содержащего железо в восстановленной форме (Fe^{2+}), присутствует бурый пигмент — метгемоглобин с трехвалентным железом (Fe^{3+}) и предположил, что в клубеньках существует равновесие между этими формами гемоглобина.

Максимальное освещение, обеспечивающее активный фотосинтез, является необходимым условием для поддержания достаточного количества гемоглобина в клубеньках. При недостатке света клубеньки теряют красный пигмент и зеленеют. По мере старения клубеньки также зеленеют и теряют свою способность фиксировать азот.

Источниками водорода и электронов для восстановления активированного азота служат продукты неполного окисления углеводов, поступающие из растения и частично окисляемые бактериями в процессе дыхания. Затем эти продукты неполного окисления, в том числе и кислоты, входящие в цикл Кребса, служат акцепторами аммиака при образовании аминокислот бактерийами. Синтезированные аминокислоты поступают в ткани растения. Природа связи между гемопротеидами бактерий и гемоглобином и между гемоглобином и активированным азотом пока еще не выяснена. Не выяснена также роль цитохромов в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с фиксацией азота.

Чини и Ивенс (Cheniae, Evans, 1960) обнаружили положительную корреляцию между активностью нитратредуктазы бактерий сои, содержанием гемоглобина в клубеньках и накоплением азота в надземной части растений.

Каково химическое строение клубенькового гемоглобина и как осуществляется его биосинтез?

Гемоглобин, как известно, состоит из белковой части — глобина и простетической группы, представленной гемом. На рис. 6 приведена структурная формула гема, который является ферропорфирином. Гемоглобин является железопорфирином и содержит в своем составе двухвалентное железо. Характер связи атомов железа с азотом ионный. При окислении ионная связь

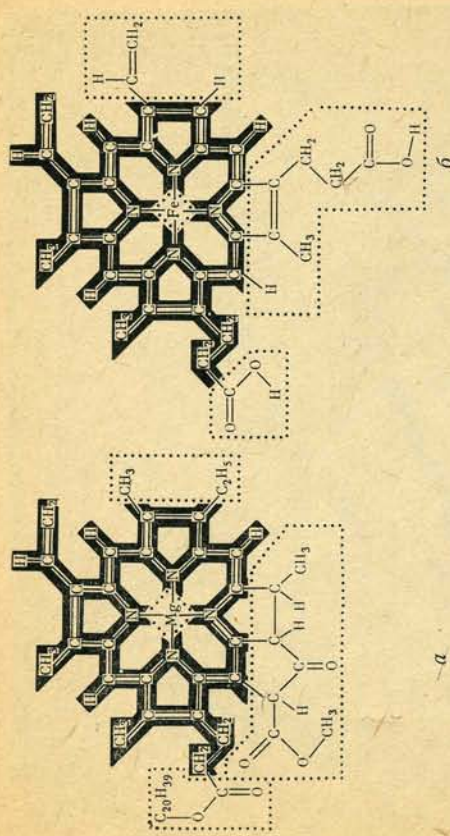


Рис. 6. Структурные формулы металлопорфиринов — хлорофилла (а) и гема (б)

между железом и пиррольными кольцами переходит в ковалентную.

Несомненно, что гемоглобин принимает участие в азотфиксации в клубеньках бобовых культур в комплексе с другими железосодержащими белками. На синтез гемоглобина оказывают влияние микроэлементы — медь, молибден, кобальт.

Кроме гемоглобина в бобовых растениях существуют и другие железопорфириновые белки — это каталаза, пероксидаза, цитохромоксидаза и цитохромы. Цитохромы и цитохромоксидаза являются необходимыми составными звеньями цепи переноса электронов в растениях.

В чем же заключается функции самого гемоглобина? Эти функции точно еще не выяснены. Не исключена возможность, что молекулярный азот может образовывать какие-то нестабильные комплексы с гемоглобином (Abel, Bauer, Sprengel, 1963) и что гемоглобин принимает косвенное участие в активации молекулярного азота. Железо гемоглобина может участвовать в передаче электронов в окислительно-восстановительной цепи от ферментов водород-донорной системы (дегидрогеназ, гидрогеназ) к молекулярному азоту (Bergeresen, Wilson, 1959).

Вполне вероятно также, что функции гемоглобина в клубеньках связаны с биохимическим механизмом, обеспечивающим приток дыхания клубеньковых бактерий и выработки АТФ, с одной стороны, и механизмом, защищающим от избытка кислорода анаэробную азотактивирующую систему бактерий — с другой.

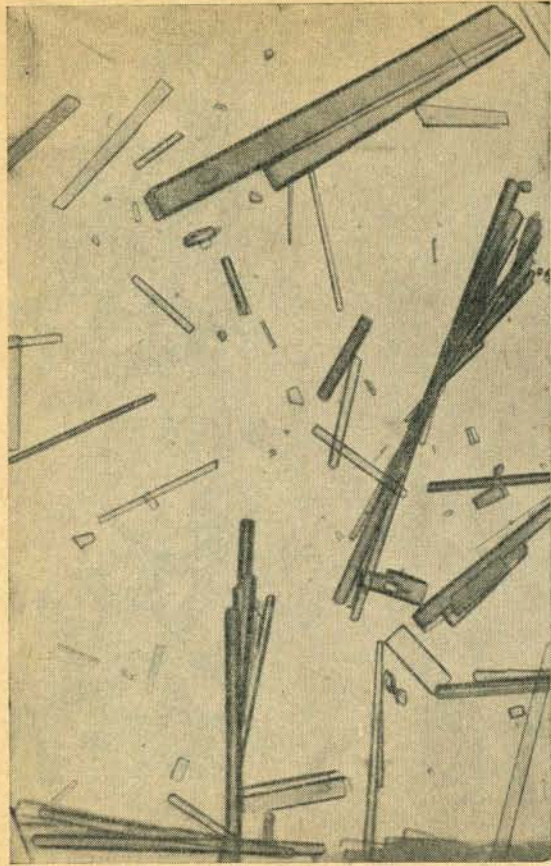


Рис. 7. Кристаллы «однокомпонентного» гемоглобина из клубеньков желтого люпина сорта Белорусский 6

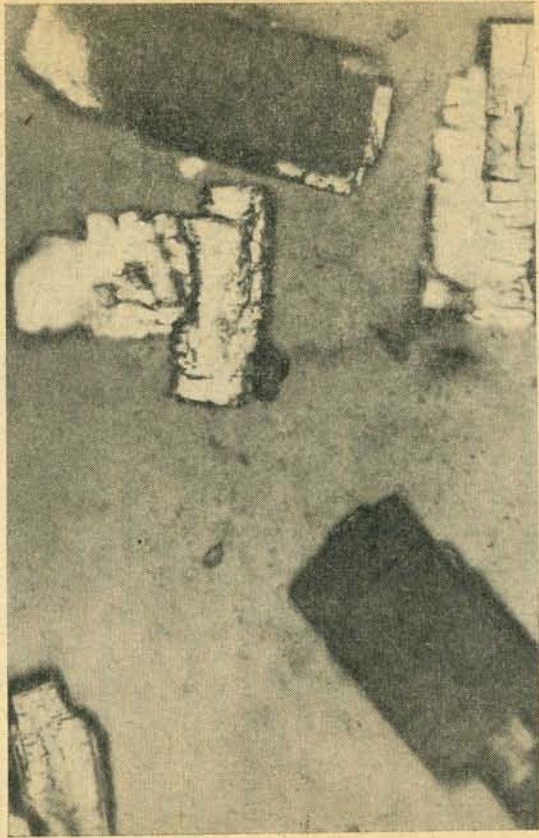
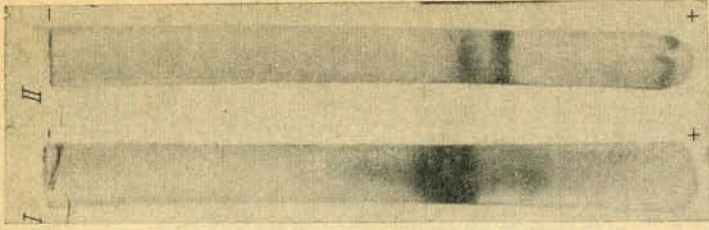


Рис. 8. Кристаллы «двухкомпонентного» гемоглобина из клубеньков узколистного люпина сорта Белорусский 155

Рис. 9. Электрофоретические спектры кристаллических препаратов «однокомпонентного» (I) и «двухкомпонентного» (II) гемоглобина из клубеньков люпина различных видов



Можно полагать, что синтез гемоглобина осуществляется в клетках растений, в то время как фиксация молекулярного азота осуществляется в бактериоидах. Бактериоиды с их ферментными системами находятся в тесном взаимодействии с гемоглобином, который содержится в растворе, окружающем или омывающем бактериоиды.

Нами установлена видовая специфичность и гетерогенность гемоглобинов из клубеньков сои, кормовых бобов и люпина. Методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле показано наличие пяти белковых макрокомпонентов у гемоглобина, выделенного из клубеньков кормовых бобов, двух макрокомпонентов у сои и узколистного люпина и одного макрокомпонента у желтого люпина (Пейве, Жизневская, Ливанова, Сафонов, 1967). Гемоглобин из клубеньков различных сортов люпина был нами получен в кристаллическом состоянии (Пейве, Жизневская, Ливанова, 1967). Оказалось, что и форма кристаллов зависит от сортовых особенностей и белкового состава гемоглобина (Пейве, Ягодин, Жизневская, Бороденко, 1970). У люпина, имеющего гемоглобин с одним макрокомпонентом, кристаллы представляли собой пучки из моноклинических призм, а у «двухкомпонентного» гемоглобина кристаллы образуются в форме наложенных друг на друга прямоугольных пластинок параллельного роста (рис. 7, 8, 9).

Исследования показали, что гемоглобин из клубеньков желтого люпина является низкомолекулярным белком с молекулярным весом порядка 17 000. Он электрофоретически подвижен и растворим в воде.

Характер абсорбционных спектров оказался сходным для гемоглобинов сои, люпина и кормовых бобов и указывал на присутствие оксигемоглобинов (максимумы поглощения при 540 и 570 мкм) (рис. 10).

Таким образом, видовая специфичность и гетерогенность гемоглобинов проявляются при наличии общих наиболее характерных биохимических свойств.

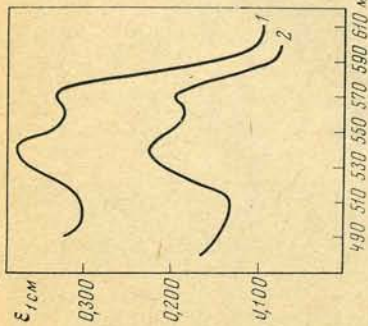


Рис. 10. Абсорбционные спектры растворов оксигемоглобина из клубеньков сои (1) и кормовых бобов (2)

Важное значение имеет проблема стабилизации гемоглобина или продления сроков активной деятельности клубеньков. Нами было показано, что «однокомпонентный» (с одним белковым макрокомпонентом) гемоглобин из клубеньков люпина отличается большей лабильностью и меньшей прочностью связи гема с глобином, чем гемоглобин сои и кормовых бобов. При стабильности гемоглобина прочность связи гема с глобином также ослабевает. Внесение меди способствует сохранению более высокого уровня гемоглобина в клубеньках бобовых растений. При этом увеличивается период активной фиксации молекулярного азота в клубеньках и сохраняется более высокая активность сукцинатдегидрогеназы. По-видимому, медь участвует в поддержании конформации клубенькового гемоглобина. Кобальт задерживает распад гемоглобина и повышает энергию его биосинтеза.

ГЕМОПРОТЕИДЫ КАТАЛАЗА И ПЕРОКСИДАЗА В КЛУБЕНЬКАХ БОБОВЫХ

В клубеньках бобовых культур, кроме низкомолекулярных негеминных белков и гемоглобина, содержатся также гемопротеиды каталаза и пероксидаза. В соответствии с разработанной в лаборатории методикой фракционирования белков (Жизневская, 1969), гемоглобин может быть отделен от других гемопротеидов, а также от железосодержащих белков негеминной природы. Высокая активность каталазы в клубеньках находится в прямой зависимости от активности пероксидазы и согласуется с повышенным содержанием гемоглобина. К концу вегетации активность каталазы в клубеньках резко снижается.

Каталаза, как известно, катализирует разложение перекиси водорода по схеме:



Пероксидаза катализирует аналогичную реакцию. Пероксидаза катализирует не только разложение перекиси водорода, но и окисление первичных спиртов до альдегидов по уравнению:



У каталазы простетическая группа не может обратимо отделяться от фермента и трудно поддается восстановлению. На 1 моль каталазы приходится 4 атома железа, и этот фермент имеет молекулярный вес около 250 000. В то же время пероксидаза на 1 моль содержит 1 атом железа, и молекулярный вес этого фермента около 44 000. Мы не знаем пока, в чем заключаются функции каталазы и пероксидазы в процессах фиксации молекулярного азота. Но можно сделать общий вывод, что в клубеньках, активно фиксирующих молекулярный азот, действует комплекс железосодержащих ферментов, и в этом комплексе определена роль играют ферменты, обладающие пероксидазной и каталазной активностью.

МОЛИБДЕН И ЕГО РОЛЬ В ПРОЦЕССАХ АЗОТФИКСАЦИИ

За последние годы молибденовые микроудобрения находят все более широкое применение для повышения урожайности бобовых культур. Это объясняется тем, что молибден в сильной степени влияет на процессы симбиотической фиксации азота в клубеньках этих культур, а также положительно влияет на фиксацию азота свободноживущими в почве азотфиксаторами (*Azotobacter*, *Clostridium* и др.).

В тридцатых годах Бортельс (Bortels, 1930, 1936) опубликовал первые работы, показавшие, что молибден играет катализаторную роль в процессах биологической фиксации азота микроорганизмами *Azotobacter chroococcum* и *Clostridium pasteurianum*.

Несколько позже появились работы Бортельса (Bortels, 1937) и других авторов, в которых показано положительное действие молибдена на урожай бобовых культур (Дмитриев, 1938; Бобко, Саввина, 1940). Это связано с симбиотической фиксацией N_2 клубеньковыми бактериями бобовых культур. Однако из проведенных упомянутыми выше авторами опытов не всегда можно было получить надежные выводы.

В 1943 г. были опубликованы работы Х. Г. Виноградовой о содержании молибдена в растениях семейства Leguminosae. Следует упомянуть исследования Мюльдера (Mulder, 1948, 1950) о значении Mo в азотфиксации у бобовых. В 1952 г. появились работы Виноградовой, Дробкова, Чернавиной, в которых приводились новые данные о роли молибдена в жизни растений и о действии этого элемента на урожай бобовых культур.

За последние годы многие авторы изучали действие молибдена на урожай и качество сельскохозяйственных культур. Молибден сейчас широко внедряется в практику сельскохозяйственного хозяйства, прежде всего для предпосевной обработки семян бобовых культур. Это мероприятие весьма эффективно. От внесения молибдата аммония 100 г/га урожай зерна гороха, кормовых бобов, люпина и вики повышаются на 2,5—3,5 ч/га, а урожай клеверного сена — на 8—10 ч/га. При этом в зерне, листьях и стеблях бобов резко увеличивается содержание белков. Молибден оказался также эффективным при внесении его под небольшие растения (салат, цветную капусту, кукурузу, сахарную свеклу и некоторые другие культуры), что указывает на положительную роль этого элемента не только в процессах биологической фиксации молекулярного азота, но и в других физиологических процессах.

Биохимические процессы с участием молибдена можно разбить на три большие группы:

- 1) действие молибдена на процессы восстановления нитратов, нитритов и гидроксилamina до аммиака и биосинтез аминокислот;
- 2) участие молибдена в биохимических процессах, связанных с фиксацией молекулярного азота свободноживущими почвенными микроорганизмами и клубеньковыми бактериями в симбиозе с бобовыми культурами;
- 3) влияние молибдена на биосинтез нуклеиновых кислот и белков.

Совершенно очевидно, что все эти процессы взаимосвязаны. Так, известно, что процесс восстановления нитратов связан с биосинтезом аминокислот и белков. Молекулярный азот, который восстанавливается до аммиака, также используется на построение белков и других азотсодержащих соединений у микроорганизмов и высших растений. При восстановлении молекулярного азота до аммиака действует комплекс ферментов оксидоредуктаз. В начале цепи окислительно-восстановительных реакций находятся ферменты так называемой водород-донорной системы. Это дегидрогеназы, содержащие в качестве простетических групп НАД (никотинамидадениндинуклеотид) и НАДФ (никотинамидадениндинуклеотидфосфат). Дегидрогеназы отнимают водород и электроны непосредственно от окисляемого вещества и переносят их на ФАД (флавинадениндинуклеотид). От ФАД

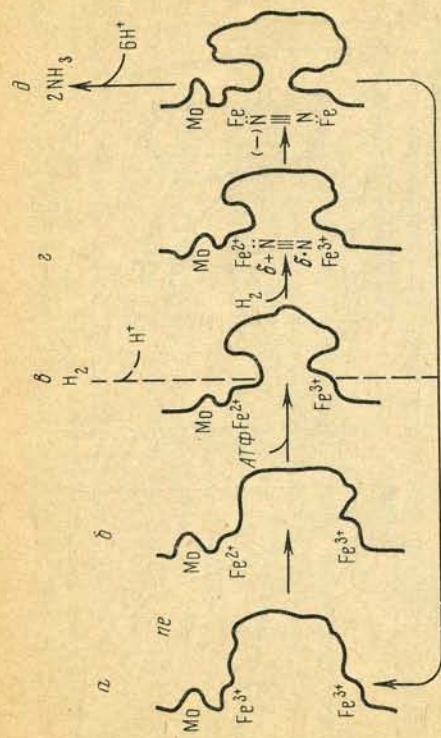
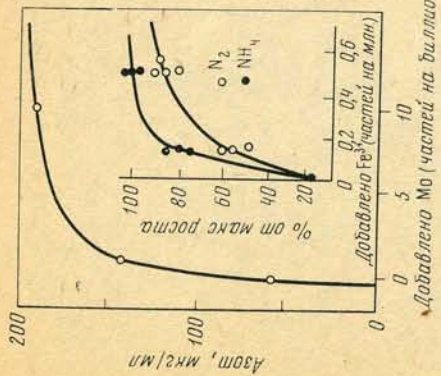


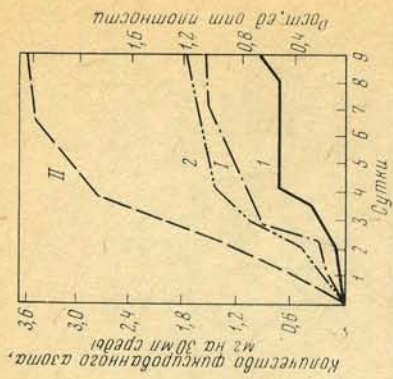
Рис. 11. Предполагаемый механизм участия молибдена и железа в процессах азотфиксации с участием нитрогеназы
Объяснение в тексте

электроны передаются на молибден. Конечным акцептором электронов и водорода является молекулярный азот. Механизм участия молибдена и железа в процессах азотфиксации с участием нитрогеназы представлен на рис. 11 (Vulep et al., 1965). На первом этапе действия ($a \rightarrow b$) один атом трехвалентного железа восстанавливается до двухвалентного. Молибден здесь служит в качестве одноэлектронного переносчика, источником электронов могут служить различные органические соединения, подверженные окислению. Далее, при переходе к следующему этапу ($b \rightarrow c$) в действие вступает АТФ, создающая напряженное, реакционноспособное состояние нитрогеназы (этап c), при котором атомы железа способны реагировать с молекулярным азотом (этап d). На последнем этапе (d) нитрогеназа готова вновь вступать в цикл упомянутых выше реакций. В реакциях окисления восстановления дегидрогеназы могут отнимать электроны и водород у различных органических веществ: органических кислот, глюкозы, спиртов и др. Активной частью дегидрогеназ является никотинамид (витамин РР). Пиридиновое кольцо амида никотиновой кислоты подвергается восстановлению и окислению при изменении валентности азота, входящего в это кольцо. У флавиноклеотидных ферментов активной частью являются флавины (рибофлавин (витамин В₂), Флавиннуклеотидные ферменты катализируют очень важные для организма окислительно-восстановительные реакции, как, например, окислительное дезаминирование аминокислот, дегидрирование оксикислот, окисление



12

Рис. 12. Влияние железа и молибдена на рост и азотфиксацию у *Azotobacter vinelandii*



13

Рис. 13. Рост и азотфиксация у *Azotobacter agile* при добавлении к среде молибдена

I — рост без добавок; 2 — рост при добавлении 5,0 мг/л Na_2MoO_4 ; I — фиксировано азота без добавок; II — фиксировано азота при добавлении 5,0 мг/л Na_2MoO_4 .

восстановленных форм $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$. С металлами ФАД образует комплексы. Например, восстановленный ФАД может реагировать с Mo^{5+} , образуя при этом Mo^{5+} и два водородных иона по схеме:



Таким образом, молибден повышает активность флавиновых ферментов, связанных с азотным обменом. Обратимое восстановление ФАД осуществляется водородом, получаемым от дегидрогеназ.

Действие молибдена и других микроэлементов на рост, размножение и фиксацию молекулярного азота микроорганизмами изучалось многими исследователями. Так, например, Эспозито (Esposito, 1955) в питательных средах, очищенных от железа и молибдена, получил при добавлении оптимальных количеств этих элементов резкое увеличение роста и фиксации азота у *Azotobacter vinelandii* (рис. 12). Высокая эффективность молибдена в процессах фиксации азота у *Azotobacter agile* была получена также в опытах Градовой-Крыловой (1967) (рис. 13).

32

Особенно важное народнохозяйственное значение имеет увеличение фиксации молекулярного азота под влиянием молибдена у бобовых культур. Только за счет этого элемента фиксация атмосферного азота у клевера, гороха и люпина возрастает на 45—65%. Этот азот накапливается в урожае главным образом в форме белков, что увеличивает питательную ценность бобовых растений для человека и животных.

Так, в ряде полевых опытов, проведенных Институтом биологии АН Латвийской ССР в колхозах и совхозах республики, в результате молибденовых подкормок урожай и содержание белков в клеверном сене значительно возрастали (табл. 1).

Таблица 1

Место проведения опытов и почва	Без молибдена		С молибденом	
	урожай, ц/га	содержание белков, % на сухое вещество	урожай, ц/га	содержание белков, % на сухое вещество
Колхоз «Адажи» Рижского района, суглинок	46,7	13,7	54,9	17,5
Колхоз «Парижская Коммуна» Цесисского района, супесь	27,0	14,9	42,3	17,8
Совхоз «Лубзаерс», легкий суглинок	300,5 (зеленая масса)	16,0	346,8 (зеленая масса)	18,7

Влияние молибдена на урожай клеверного сена и содержание в нем белков

Из приведенных данных следует, что в производственных условиях колхозов и совхозов молибден повышает содержание белков в клеверном сене на 2,9—3,8% (абсолютных). Лабораторные исследования показали, что молибден увеличивает также в листьях бобовых культур содержание аскорбиновой кислоты, каротина и хлорофилла. В опытах Института биологии Академии наук Латвийской ССР внекорневая подкормка лугов молибденом аммония способствовала повышению содержания белка в луговом сене. Например, в колхозах Рижского района луговые травы без молибденовой подкормки содержали 11,5% белка, а после подкормки — 13,8%. Зерно гороха, не получившего молибденового удобрения, содержало 24,2% белка, а удобренное молибденом — 32,1%.

В работе И. А. Буркина (1968) приводятся следующие данные о содержании общего и белкового азота в листьях и стеблях красного клевера (табл. 2).

Под влиянием молибдена содержание белкового азота в листьях и стеблях клевера значительно возросло.

При внесении молибдена (150 г/га) под кормовые бобы был получен дополнительный сбор белка в зерне 50 кг/га. Таким

3 Я. В. Пейве

Таблица 2

Влияние молибдена на содержание общего и белкового азота в листьях и стеблях клевера

Варианты	Содержание азота, % от сухого веса		Белковый азот, % от общего	Увеличение азота, % от	
	общего	белкового		общего	белкового
В листьях клевера					
Контроль (фон P)	3,22	2,48	77	—	—
Фон + Mo, 15 г/га	3,66	3,04	83	13,7	22,6
Фон + Mo, 150 г/га	4,20	3,63	87	30,4	46,4
В стеблях клевера					
Контроль (фон P)	1,68	0,95	57	—	—
Фон + Mo, 15 г/га	1,86	1,42	76	10,7	9,7
Фон + Mo, 150 г/га	2,42	2,04	86	30,1	117,9

образом, каждые 3 г Mo/га обеспечивали дополнительно 1 кг белка/га (в семенах). Если же взять блок общего урожая, то каждый грамм Mo обеспечивал синтез примерно 1 кг белка на гектар. В ряде других опытов также было показано значительное увеличение содержания белка в клеверном сене в результате внесения гранулированного молибденизированного суперфосфата.

В работе Е. И. Ратнера (1964) под влиянием молибдена в листьях и клубеньках клевера увеличивалось содержание тиамина и пиридоксина. Комплекс витаминов группы В оказывал весьма благоприятное действие на урожай и процессы фиксации азота у сои. Растения, удобренные молибденом, становятся богаче витаминами и хлорофиллом.

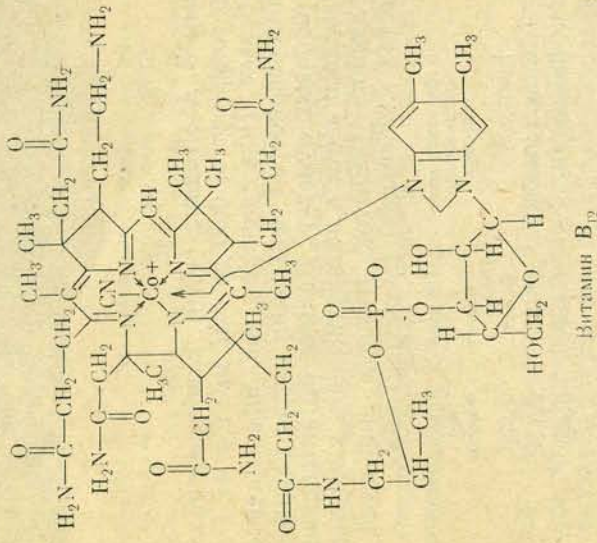
МИКРОЭЛЕМЕНТЫ, ОКАЗЫВАЮЩИЕ КОСВЕННОЕ ДЕЙСТВИЕ НА АЗОТФИКСАЦИЮ

Такие элементы, как кобальт, бор, медь, марганец, по-видимому, не входят в состав ферментов, непосредственно катализирующих активацию и связывание молекулярного азота. В то же время они играют важную общебиологическую роль в жизни

растений и микроорганизмов. Это определяет их косвенное участие в фиксации N₂. Поэтому классификация микроэлементов по этому признаку носит несколько условный характер.

КОБАЛЬТ

Известно, что кобальт является составной частью витамина B₁₂.



Кобальт способствует синтезу витамина B₁₂ и гемоглобина в клубеньках (рис. 14). Между симбиотической фиксацией N₂, содержанием витамина B₁₂ и гемоглобина наблюдается определенная положительная корреляция. Кобальт необходим также для синтеза ряда кобамидных коэнзимов в клубеньках и свободной живущих азотфиксирующих бактерий. Кобальт повышает активность гидрогеназы, трансметилазы, глутаматизомеразы и некоторых других ферментов. Комплексные соединения кобальта, по-видимому, принимают участие в первичной активации N₂ (хемосорбция на металлосодержащих белковых комплексах). Особенно важную роль играет кобальт в жизни бобовых растений, растущих в симбиозе с клубеньковыми бактериями (рис. 15).

В клубеньках кобальтовые коэнзимы синтезируются активными штаммами клубеньковых бактерий (Kieweg, Evans, 1962, 1963; Шемаханова, Бунько, 1967).

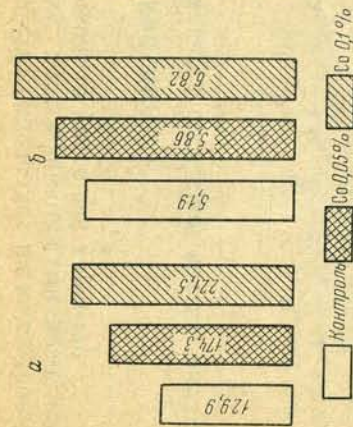


Рис. 14. Сравнительное влияние предпосевной обработки семян растворами сернокислого кобальта на фиксацию азота клубеньками кормовых бобов (на 1 г сырого вещества клубеньков) (по Ягодину, 1970)

По данным Б. А. Ягодина (1970), клубеньки различных бобовых культур содержат от 0,30 до 1,07 мкг Со на 1 г сухого вещества клубенька. Под влиянием кобальта значительно увеличилась интенсивность фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур. Данные по интенсивности фиксации молекулярного азота в неразрушенных клубеньках и срезах клубеньков люпина (избыток атомных процентов N¹⁵ на 5 г сырого вещества клубеньков) приведены ниже:

Инфильтрация соединений кобальта	Целье клубеньков	Срез клубеньков
Контроль	0,044	0,036
Соли кобальта	0,124	0,134
Витамин B ₁₂	0,066	0,087

При инфильтрации растворов солей кобальта и витамина B₁₂ в целые клубеньки или срезы клубеньков лучшее действие оказывал ионный кобальт, который использовался клубеньковыми бактериями для биосинтеза различных кобальтсодержащих коферментов.

Нами (Пейве, Ягодин, Троицкая, 1969) изучались соединения витамина B₁₂ в клубеньках кормовых бобов, люпина и сои. При выделении микролиществ кобамидов электрофореграммы или хроматограммы этих соединений проявлялись с использованием в качестве тест-организма бактерий *Escherichia coli*. Было показано, что дополнительное обеспечение растений кобальтом способствует синтезу кобамидных соединений в клубеньках. При электрофорезе кобамиды из клубеньков разделяются на три фракции. Одна из них нейтральная, а две другие электроположительны. Электронейтральные соединения являются истинным витамином B₁₂—5,6-диметилбензимидазолкобамидом. Одна из электроположительных фракций, вероятно, представлена псевдо-

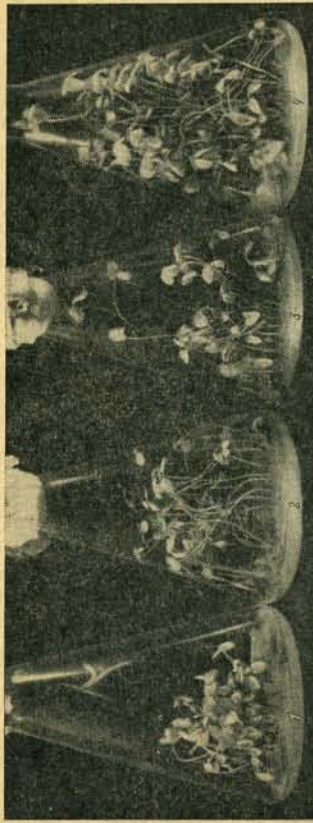


Рис. 15. Влияние кобальта и клубеньковых бактерий на рост клевера в стерильных культурах (по Ягодину, 1970)

1 — без инокуляции; 2 — без инокуляции + Со; 3 — инокуляция; 4 — инокуляция + Со

витамином B₁₂—аденилкобамидом, а другая — лишенной нуклеотида формой витамина B₁₂.

Положительное влияние кобамидных коэнзимов на азотфиксацию связано, по-видимому, с их действием на биосинтез гемоглобина и вхождением в состав фермента метилмалонил-изомеразы, который принимает участие на одном из этапов превращения пропюнага в сукцинат.

БОР

Еще в 1925 году Бренчли и Торнтон (Brenchley, Thornton, 1925) показали, что при недостатке бора в клубеньках бобовых нарушается развитие сосудистых пучков, образование бактериодов и фиксации N₂. Положительное действие бора на урожай бобовых культур и накопление ими азота было доказано многими полевыми и вегетационными опытами. Наряду с молибденом бор рекомендуется вносить под различные бобовые культуры. Бор образует различные боруглеводные комплексы, а также комплексы с окисислотами, многоатомными спиртами и рибофлавином. Бор повышает активность каталазы и оксидазы индолилуксусной кислоты. В растении бор влияет на дифференциацию клеток, необходим для образования меристематических тканей и проводящей системы, участвует в биосинтезе нуклеиновых кислот и окислительном фосфорилировании, усиливает передвижение углеводов и их биосинтез.

МЕДЬ

Входит в состав различных ферментов оксидоредуктаз и участвует в окислительно-восстановительных реакциях, связанных с дыханием растений и азотным обменом. Как показали иссле-

дования ряда авторов, в том числе и данные нашей лаборатории, медь повышает активность биосинтеза аминокислот и фиксации N_2 , влияет на биосинтез хлорофилла и образует комплексы с ДНК; способствует биосинтезу гемоглобина и повышает активность нитрат- и нитритредуктаз, а также дегидрогеназ. Недостаток меди задерживает образование полноценных клубеньков на корнях бобовых растений.

МАРГАНЕЦ

Марганец принимает участие в процессах фотосинтеза и восстановления нитратов; повышает скорость обмена фосфата в ДНК и РНК; участвует в регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетках (неспецифическая активация ферментов цикла Кребса: карбоксилазы, декарбоксилазы, дегидрогеназ); повышает активность (неспецифически) ферментов фосфорилирования и углеводного обмена (глюкокиназы, фосфо-глюкомутаза, енолазы и др.).

В хлоропластах Mn существует в ионной и хелатной формах. Положительно влияет на азотфиксирующую активность клубеньков.

МАГНИЙ

Этот элемент играет важную роль в процессах фотосинтеза, превращения фосфатсодержащих соединений, энергетическом обмене и дыхании; необходим для нормального функционирования рибосом; влияет на формирование репродуктивных органов растений. Магний — составная часть хлорофилла и необходимый компонент рибосом. Он повышает активность ряда ферментов: цитохромоксидоредуктазы, нуклеозиддифосфатазы, карбоксидисмутаза, а также различных трансфераз, переносящих фосфат.

ЦИНК

Входит в состав ряда ферментов (карбоангидразы, некоторых дегидрогеназ, карбоксипептидазы); катализирует выделение CO_2 в хлоропластах; участвует в регуляции редокс-потенциала клеток.

Zn влияет на фосфорный, углеводный и белковый обмен, а также плодоношение растений.

ВАНАДИИ

Ванадий играет положительную роль в процессах фиксации молекулярного азота микроорганизмами (*Azotobacter*, клубеньковые бактерии) и в какой-то мере при этом может частично

заменять молибден. Однако полностью заменить молибден ванадием не удается. При наличии молибдена положительное действие ванадия не проявляется. В клубеньках бобовых растений ванадий содержится в количествах 3—10 мг/кг. По данным А. В. Петербургского и его сотрудников (1968), ванадий не только дополняет и усиливает действие молибдена, но и самостоятельно повышает фиксацию молекулярного азота бобовыми и их урожаем. По-видимому, в процессах фиксации азота клубеньковыми бактериями между этими двумя металлами существует определенная взаимосвязь. Вопрос о роли ванадия в биохимии фиксации N_2 подлежит дальнейшему изучению.

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ И ФЕРМЕНТЫ ВОДОРОД-ДОНОРНОЙ СИСТЕМЫ АЗОТФИКСАЦИИ

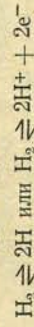
В процессах биологической фиксации молекулярного азота требуется непрерывное поступление извне активированного водорода. На каждую молекулу газообразного азота при синтезе аммиака расходуется 6 атомов водорода. Ферменты гидрогеназа и различные дегидрогеназы как раз и выполняют функцию, связанные с поставкой для азотфиксации необходимых количеств электронов и водорода. Активность этих ферментов зависит от наличия в азотфиксирующей среде микроэлементов. В первую очередь действие этих ферментов связано с железом, молибденом, кобальтом и медью.

ГИДРОГЕНАЗА

Этот фермент, осуществляя активацию водорода, играет важную роль в процессах фиксации молекулярного азота всеми азотфиксирующими микроорганизмами (Shug, Hamilton, Wilson, 1956).

Наличие гидрогеназы в составе микроорганизмов было показано Стефенсон и Стикландом (Stephenson, Stickland, 1931) еще в 1931 г.

Гидрогеназа катализирует реакцию:



При этом активированный водород может участвовать не только в реакциях восстановления азота, но и в других окислительно-восстановительных процессах. Акцепторами водорода

могут служить кислород, нитраты, фумараты, метиленовый синий и другие.

Характерно, что железо повышает активность фермента гидрогеназы, а все комплексобразователи, связывающие железо, снижают активность этого фермента. Очевидно, железо входит в состав простетической группы фермента. В то же время активность очищенных препаратов гидрогеназы в ряде опытов восстанавливалась и при добавлении MoO_3 .

Было показано (Pesch, Gest, 1956), что железо содержится в активном центре фермента и участвует в первичной активации H_2 , а молибден участвует в переносе электронов, связанных с действием фермента. В составе высокоочищенных препаратов гидрогеназы молибден найден не был. Из металлов в их состав входило лишь железо (Riklis, Rittberg, 1962).

В лаборатории биохимии микроэлементов Института физиологии растений АН СССР нами совместно с Б. А. Ягодиным и др. (1967) было показано положительное действие Mo , Co и меди на активность фермента гидрогеназы в клубеньках бобовых растений.

Данные по действию молибдена, кобальта и меди на активность гидрогеназы в клубеньках кормовых бобов (активность в единицах оптической плотности) приведены ниже:

Вариант	Внекорневая подкормка растений	Предпосевная обработка семян
Контроль	0,156	0,185
Молибден	0,188	0,245
Кобальт	0,262	0,299
Медь	0,202	0,225

Наибольшую активность, как это видно из приведенных данных, проявил кобальт. В связи с этим с кобальтом были проведены дополнительные исследования.

В этих опытах активность гидрогеназы учитывалась одновременно как в гомогенате из целого клубенька, так и в остаточной растительной ткани клубенька, и в бактериоиде, выделенных из клубеньков кормовых бобов. Результаты одного из таких определений приведены в табл. 3.

Приведенные данные позволяют заключить, что основная активность фермента сосредоточена в бактериоидах. Активность гидрогеназы в остаточной растительной ткани клубенька почти в 18 раз ниже активности в бактериоидах. Кобальт и в этом опыте оказывал заметное положительное действие на активность гидрогеназы.

Дальнейшими исследованиями, проведенными в нашей лаборатории, было показано, что фермент гидрогеназы, находящийся в клубеньках бобовых культур, состоит из ряда изоферментов.

Таблица 3

Влияние предпосевной обработки семян кобальтом на активность гидрогеназы в клубеньковой ткани и бактериоидах (в мг формазана на 1 г сырого веса)

Вариант	Гомогенат из целого клубенька	Остаточная растительная ткань	Бактериоиды
Контроль	1,24	0,097	1,86
Сернокислый кобальт, %			
0,1	1,80	0,180	2,42
0,01	2,12	0,104	2,36

По-видимому, в клубеньках бобовых культур в процессах фиксации молекулярного азота бактериоидами гидрогеназа проявляет свою активность в сочетании с другими железосодержащими белками и, в частности, ферредоксином. Значение изоэнзимов подлежит дальнейшему изучению.

ДЕГИДРОГЕНАЗЫ

В процессах фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур участвует несколько дегидрогеназ (сукцинат-дегидрогеназа, малатдегидрогеназа и другие).

Ферменты дегидрогеназы обеспечивают непрерывный приток активированного водорода, необходимого для восстановления атмосферного азота. Клубеньки бобовых культур характеризуются специфически высокой активностью ферментов дегидрогеназ.

Одной из причин стимуляции фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур под влиянием молибдена, меди и других микроэлементов является повышение активности ферментов дегидрогеназ (табл. 4). В наших опытах наибольшая активность дегидрогеназ в клубеньках бобовых культур наблю-

Таблица 4
Действие молибдена и меди на активность малатдегидрогеназы в клубеньках кормовых бобов

Вариант	1963 г.			1964 г.		
	опыт 1	опыт 2	опыт 3	опыт 1	опыт 2	опыт 3
Контроль	15,5	19,3	5,9	8,6	7,4	7,4
Молибден	27,7	26,7	10,7	10,5	11,7	11,7
Медь	16,5	20,3	7,5	9,5	11,1	11,1

далась в фазе бутонизации (Пейве, Жизневская, Ягодин, Дубово, 1964; Пейве, Жизневская, Тенисоне, 1965).

В отношении активности дегидрогеназ и нитратредуктазы в клубеньках бобовых культур наблюдается видовая специфичность: так, по сравнению с клубеньками кормовых бобов клубеньки люпина характеризуются наименьшей активностью дегидрогеназ и в то же время повышенной активностью нитратредуктазы. Это указывает на известную сопряженность активности данных ферментов.

Нами было показано наличие малат- и сукцинатдегидрогеназ в клубеньках кормовых бобов и люпина, причем максимум активности этих ферментов находился в прямой зависимости от интенсивности симбиотической фиксации азота.

При этом оказалось, что дегидрогеназная активность клубеньков определяется дегидрогеназами бактериоидов. В растительной ткани активность этих ферментов незначительна (Пейве, Ягодин, Овчаренко, Хайлова, 1968). Некоторые данные по этому вопросу представлены в табл. 5.

Таблица 5

Распределение активности сукцинатдегидрогеназы и малатдегидрогеназы в клубеньках бобовых культур

Растение	Гомогенат клубеньков	Растительная ткань	Бактериоиды
Бобы	0,30	0,015	0,621
Соя	2,08	0,011	2,286
Люпин	0,40	0,066	0,843

Сукцинатдегидрогеназа (в мг формазана на 1 г сырого вещества)

Малатдегидрогеназа (относительная активность по восстановлению метиленовой сини)	Бобы	Соя	Люпин
	6,9	13,4	16,2
	2,3	3,4	3,8
	7,0	45,0	66,6

Работами нашей лаборатории было также показано, что каждая дегидрогеназа состоит из ряда изоферментов. Функции этих изоферментов подлежат дальнейшему изучению.

Наши исследования показали, что источником водорода и электронов, необходимых как для восстановления нитратов, так и фиксации N_2 в клубеньках бобовых культур, служат (кроме яблочной кислоты) лимонная, янтарная и пировиноградная кислоты.

Образование и поступление органических кислот в клубеньки бобовых культур тесно связано как с фотосинтезом и образованием углеводов, так и с циклом Кребса.

Дикарбоновые кислоты могут реагировать с продуктами фиксации молекулярного азота и являться основой для образования различных аминокислот. Энергия макроэргических связей АТФ используется для активации инертной молекулы N_2 .

Связь фиксации молекулярного азота с фотосинтезом заключается также в том, что атомы водорода и электроны, образующиеся в результате фотолиза воды, поступают к какому-либо их общему акцептору при низком окислительно-восстановительном потенциале и используются для восстановления азота. В том же направлении действуют дегидрогеназы органических кислот, катализирующие отрыв электронов и атомов водорода от этих кислот.

СХЕМА ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА В КЛУБЕНЬКАХ БОБОВЫХ КУЛЬТУР

Фиксацию азота в клубеньках бобовых культур изучали многие исследователи (Виртанен, Ф. В. Турчин, М. В. Федоров, Бергерсен и др.). Однако многие стороны симбиотической фиксации молекулярного азота остаются еще невыясненными. По-

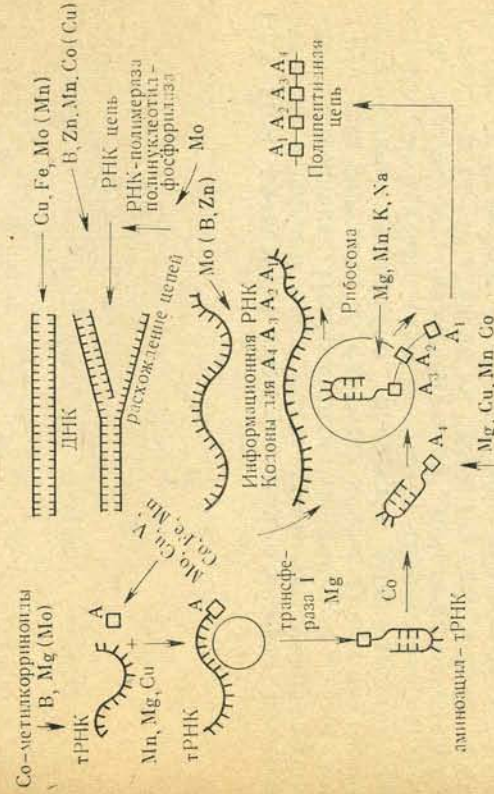


Рис. 16. Микроэлементы и биосинтез белка

их в состав белков; он взаимодействует с ДНК, РНК и нуклеотидами и оказывает влияние на рибосомы, которые непосредственно осуществляют биосинтез белка при участии информационной РНК и активированных аминокислот.

Вступая в клетках растений во взаимодействие с фосфатами, молибден оказывает положительное влияние на биосинтез нуклеиновых кислот и белков.

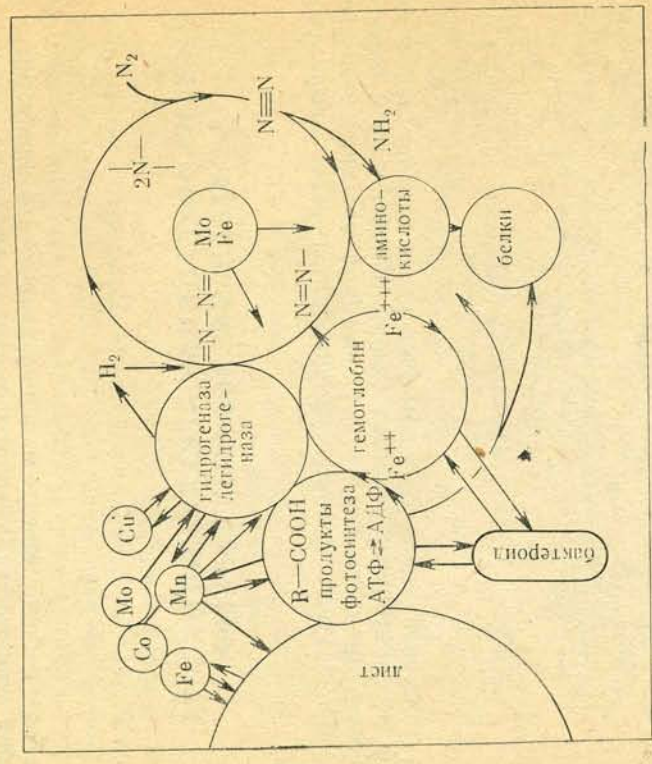
Магний играет важную роль в повышении активности ферментов — аминоксил-тРНК-синтаз; он является также необходимой составной частью рибосом.

* * *

В заключение можно отметить, что дальнейшее изучение роли металлов-микроэлементов и металлоферментов в процессах биологической фиксации атмосферного азота имеет существенное теоретическое и практическое значение. Применяя в растениеводстве микроудобрения, мы можем регулировать активность ферментов, связанных с фиксацией молекулярного азота, повышать накопление биологического азота в почве, поднимать урожай и качество бобовых и других растений.

этому многие схемы механизма этой фиксации носят пока гипотетический характер. Наиболее разработанной является схема Бергерсена (Bergetsen, 1960; Бергерсен, 1966), которая исходит из того, что первичные реакции активирования и фиксации N_2 осуществляются ферментами бактерий и фиксации N_2 ханализ фиксации N_2 в клубеньках сходен с таковым у свободноживущих азотфиксаторов. Роль клубенькового гемоглобина и в схеме Бергерсена все еще остается недостаточно ясной.

На основе работ различных авторов, а также собственных исследований нами составлена следующая общая схема фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур при участии молибдена, железа, кобальта, меди и марганца:



При этом происходит сложное взаимодействие процессов фотосинтеза в зеленом листе и окислительно-восстановительных реакций в клубеньках. Необходимыми участниками весьма сложного процесса фиксации N_2 являются клубеньковые бактерии и клубеньковый гемоглобин, продукты фотосинтеза и ферменты оксидоредуктазы (дегидрогеназы, гидрогеназа, нитрогеназа и, по-видимому, нитратредуктазы). Комплекс микроэлементов оказывает также влияние на биосинтез белков (рис. 16).

На биосинтез белков особое влияние оказывают молибден и магний. Молибден ускоряет синтез аминокислот и включение

Костычев С. П., Рыскальчук А. Т., Швецова О. И. 1926. Химические исследования над связыванием молекулярного азота микробом *Azotobacter agilis*.—Труды Отдела с. х. микробиологии Гос. ин-та опытной агрономии, 1, 91—96.

Крашенинников Ф. Н. 1916. Ассимиляция газообразного азота корневыми клубеньками бобовых растений.—Юбилейный сб. в честь 70-летия К. А. Тимирязева, стр. 307.

Пейве Я. В., Жизневская Г. Я. 1961. Действие молибдена и меди на активность нитратредуктазы в растениях.—В сб. «Микроэлементы и урожай», Рига, стр. 257.

Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Ливанова Г. И. 1967. Кристаллический гемоглобин из клубеньков желтого люпина *Lupinus luteus* L.—Докл. АН СССР, 177, № 5.

Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Ливанова Г. И., Сафонов В. И. 1967. Исследование гемоглобинов из клубеньков сои, кормовых бобов и люпина мелкотомом диск-электрофореза в полиакриламидном геле.—Докл. АН СССР, 173, № 4, 956.

Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Тенисоне И. В. 1965. Сравнительное изучение активности нитратредуктазы и дегидрогеназ в клубеньках люпина и кормовых бобов.—В сб. «Микроэлементы и продуктивность растений», Рига, «Зинатнез», стр. 27.

Пейве Я. В., Жизневская Г. Я., Ягодина Б. А., Дуброво П. Н. 1964. Изучение активности дегидрогеназ в клубеньках кормовых бобов в связи с проблемой участка микроэлементов в азотфиксации.—Агрохимия, № 12.

Пейве Я. В., Ягодина Б. А., Жизневская Г. Я., Бороденко Л. И. 1970. Полиморфизм кристаллов гемоглобина из клубеньков различных видов люпина.—Физиология растений, 17, вып. 2.

Пейве Я. В., Ягодина Б. А., Овчаренко Г. А., Хайлова Г. Ф. 1968. Локализация дегидрогеназ в тканях клубеньков бобовых культур.—Докл. АН СССР, 179, № 6.

Пейве Я. В., Ягодина Б. А., Полазова А. Д. 1967. О роли кобальта, меди и молибдена в повышении активности гидрогеназы в клубеньках кормовых бобов.—Агрохимия, № 1.

Пейве Я. В., Ягодина Б. А., Троицкая Г. Н. 1969. Соединения группы витаминов В₁₂ в клубеньках бобовых растений.—Докл. АН СССР, 185, № 6.

Петербургский А. В., Торماسова Е. Е. 1968. О значении ванадия для бобовых культур.—В сб. «Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине», Улан-Удэ, Бурятское книжное изд-во.

Прянишников Д. Н. 1945. Азот в жизни растений и в земледелии СССР. М.—Л., Изд-во АН СССР.

Ратнер Е. И. 1964. Молибден и проблемы биологического азота в земледелии.—Изв. АН СССР, серия биологическая, № 1, стр. 223—243.

Сырцова Л. А., Яковлев В. А., Рачек В. Ф. 1968. Химические свойства ферридина.—Биохимия, 33, вып. 4.

Тимирязев К. А. 1872. О вероятном значении цинка в экономии растения.—Труды Санкт-Петербургского общества естественных наук, т. 1, стр. 223—243.

Тимирязев К. А. 1948. Земледелие и физиология растений.—Избранные сочинения в четырех томах. Т. II, М., Сельхозгиз.

Тимирязев К. А. 1949. Жизнь растения.—Избранные сочинения в четырех томах. Том III, М., Сельхозгиз.

Турич Ф. В. 1959. Новые данные о механизме фиксации атмосферного азота в клубеньках бобовых растений.—Почвоведение, № 10.

Тюрин И. В. 1957. Плодородие почв и проблема азота в почвоведении и земледелии.—Советские вопросы эффективных способов использования удобрений. М., Изд. Мин. с. х. СССР.

Федоров Е. А. 1955. О роли гемоглобина в клубеньках бобовых растений. М., Канд. дисс.

ЛИТЕРАТУРА

Бах А. Н., Ермольева З. В., Степанин М. П. 1934. Связывание атмосферного азота при обыкновенной температуре и давлении при посредстве энзимов, извлеченных из азотных бактерий.—Докл. АН СССР, 1.

Бергерсен Ф. 1966. Азотфиксация в корневых клубеньках бобовых.—IX Международный конгресс по микробиологии. Симпозиумы, стр. 69—73. М., Бобко Е. В., Савина А. Г. 1940. Значение Mo для развития растений.—Докл. АН СССР, 29, № 7.

Буркин И. А. 1968. Молибден, его физиологическая роль и сельскохозяйственное значение. М., «Колос».

Виноградова Х. Г. 1943. О содержании молибдена в растениях семейства Leguminosae.—Докл. АН СССР, 40, № 1.

Виноградова Х. Г. 1952. Молибден и его биологическая роль.—В сб. «Микроэлементы в жизни растений и животных», М., Изд-во АН СССР.

Виноградский С. Н. 1952. Микробиология почв. Проблемы и методы. М., Изд-во АН СССР.

Вольпин М. Е., Шур В. Б. 1967а. Химическая фиксация азота соединениями переходных металлов.—В кн. «Механизмы дыхания, фотосинтеза и фиксации азота», М., «Наука».

Вольпин М. Е., Шур В. Б. 1967б. Комплексообразование как путь активации молекулярного азота.—Журн. Всес. хим. общества им. Менделеева, № 1.

Ганелин В. Л., Львов Н. П., Кириштейн Б. Э., Любимов В. И., Кретиович В. Л. 1969. Железо- и молибденосодержащие компоненты азотфиксирующей системы *Azotobacter vinelandii*.—Докл. АН СССР, 185, № 5.

Ганон Е. Н. 1947. Теория фиксации азота атмосферы микроорганизмами.—Докл. АН СССР, 58, вып. 2.

Гвоздев Р. И., Яковлев В. А., Линде В. Р., Воробьев Л. В., Алфилова Е. Я. 1969. Исследование компонентов клеток азотобактера, содержащих молибден и негеминное железо.—Изв. АН СССР, серия биологическая, № 2.

Генерозова И. П., Ягодина Б. А. 1969. Ультраструктура азотфиксирующей системы в условиях симбиоза у бобовых.—7-я Всесоюзная конференция по электронной микроскопии. Киев. Тезисы докладов. М., стр. 171.

Градова-Крылова Н. Б. 1967. Влияние молибдена на фиксацию атмосферного азота некоторыми свободноживущими микроорганизмами.—В кн. «Биологический азот и его роль в земледелии», М., «Наука».

Дмитриев К. А. 1938. Новый прием повышения семенной продукции Красного клевера.—Проблемы животноводства, 7, № 5.

Дробков А. А. 1952. Роль молибдена в жизни растений.—В сб. «Микроэлементы в жизни растений и животных», М., Изд-во АН СССР.

Жизневская Г. Я. 1969. Медь, молибден и железо в азотном обмене растений. Автореф. докт. дисс. М.

Карнаухов Ю. И. 1965. О механизме биологической фиксации молекулярного азота.—Изв. АН СССР, серия биологическая, № 5.

Eilfjolk N. 1960a. Crystalline Leghemoglobin.—Acta chem. scand., 14, 609.
Eilfjolk N. 1960b. Crystalline Leghemoglobin. II. The Molecular Weight and Shapes of the two main components.—Acta chem. scand., 14, 1819.
D'Eustachio A. J., Hardy R. W. 1964. Reductants and electron transport in nitrogen fixation.—Biochem. et Biophys. Res. Commun., 15, N 4, 319—323.
Esposito R. 1955. Trace metals in nutrition of Azotobacter vinelandii.—Master's thesis, Univ. Wisconsin.
Gautier A., Drouin C. 1888. Recherches sur la fixation de l'azote par le sol et les végétaux.—C. r. Acad. sci., 109.
Keilin D., Smith J. D. 1947. Haemoglobin and Fixation in the root Nodules of Leguminous Plants.—Nature, 159, N 4047, 692.
Keilin D., Wang Dr. 1945. Haemoglobin in the root nodules of leguminous plants.—Nature, 155, N 3930, 227.
Kiewer M., Evans H. J. 1962. B₁₂ coenzyme content of the nodules from legumes, alder and of Rhizobium meliloti.—Nature, 194, N 4823, 108.
Kiewer M., Evans H. J. 1963. Cobamide Coenzyme Contents of Soybean Nodules. Nitrogen fixing Bacteria in Relation to Physiological Conditions.—Plant Physiol., 38, N 1, 99.
Kossowitsch P. 1892. Durch welche Organe nehmen die Leguminosen den freien Stickstoff auf.—Bot. Z. Soc., 697.
Kubo H. 1939. Über Hämoprotein aus den Wurzelknöllchen von Leguminosen.—Acta Phytochim., 11, 195.
Mortenson L. E., Morris J. A., Jeng D. J. 1967. Purification, metal composition and properties of molybdoferredoxin and azoferredoxin, two of the components of the nitrogen fixing system of Cl. pasteurianum.—Biochim. et biophys. acta, 141, N 3, 516—523.
Mortenson L., Mower H., Carnahan J. 1962a. Nitrogen fixation by enzyme preparations.—Bacter. Rev., 26.
Mortenson L. E., Valentine R. C., Carnahan J. E. 1962b. An electron transport factor from Clostridium pasteurianum.—Biochem. Biophys. Res. Commun., 7, N 6.
Mulder E. G. 1948. Importance of molybdenum in the nitrogen metabolism of microorganisms and higher plants.—Plant and Soil, 1, N 1.
Mulder E. G. 1950. Molybdenum in relation to nitrogen fixation of leguminous crops.—Trans. 4th Int. Congr. Soil Sci., 2, 124.
Peck H. D., Gest H. 1956. Role of iron, molybdenum and flavin in activity of Cl. butylicum hydrogenase.—Federat. Proc., 15, N 1.
Prazmowsky A. 1889. Das wessen und die biologische Bedeutung der Wurzelknöllchen der Erbsen.—Bot. Zbl., 39, 356.
Prazmowsky A. 1890. Die Wurzelknöllchen der Erbsen Landwirtschaft.—Vers. Stot., 37.
Riklis E., Rittenberg D. 1962. Some observation on the enzyme hydrogenase.—J. Biol. Chem., 236, N 9.
Sacco A., Rossi M. 1967. Hydride and nitrogen complexes of cobalt.—Chem. Commun., N 7, 316.
Shug A. L., Hamilton P. R., Wilson P. W. 1956. Hydrogenase and nitrogen fixation.—Sympos. on inorganic nitrogen metabolism. Baltimore.
Stephenson M., Stickland L. H. 1931. Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. The properties of the enzyme.—Biochem. J., 2, N 2.
Tanaka M., Benson A. M., Mower H. F., Yasunobu K. T. 1965. A proposed structure of Cl. pasteurianum ferredoxin.—In «Nonheme iron proteins: role in energy conversion». A San Pietro (Ed.), Ohio, Antioch Press.
Yamamoto A., Kitanume S., Ru L. S., Ikeda S. 1967. Study of the fixation on nitrogen. Isolation of Tris (triphenylphosphine) cobalt complex, coordinated with molecular nitrogen.—Chem. Commun., N 2, 79—80.
Virtanen A. J. 1945. Symbiotic nitrogen fixation.—Nature, 155, N 3947, 747.

Федоров М. В. 1952. Биологическая фиксация азота атмосферы. М., Сельхозгиз.
Чернавина И. А. 1952. Влияние молибдена на урожай и химический состав бобовых растений.—В сб. «Микроэлементы в жизни растений и животных», М., Изд-во АН СССР.
Шемаханова Н. М., Вульфо Я. П. 1967. Содержание кобаламина и рибофлавина в клубеньках *Phaseolus vulgaris*, бактерилизованной активными и малоактивными штаммами клубеньковых бактерий фасоли.—Изв. АН СССР, серия биологическая, № 3.
Ягодина Б. А. 1970. Кобальт в жизни растений. М., «Наука».
Яковлева В. И., Любимов В. И., Лосева Л. П., Крегович В. Л. 1964. Глутаматдегидрогеназа *Azotobacter vinelandii*.—Докл. АН СССР, 158, № 6.
Abel K., Bauer N., Spence J. T. 1963. A nitrogen complex of ferrolegohaemo Arch. Biochem. Biophys., 100, 339—340.
Allen A. D., Senoff C. V. 1965. Nitrogenpentammineruthenium (II) complexes.—Chem. Commun., N 24, 621—622.
Appleby C. A. 1967. Soluble haemoprotein P₄₅₀ from nitrogen fixing Rhizobium bacteroids.—Biochim. et biophys. acta, 147, N 2, 399—402.
Appleby C. A. 1969. The nature of a supposed N₂-complex of ferrolegohaemoglobin.—Biochim. et biophys. acta, 180, N 1.
Beijerinck M. W. 1901. Über oligonitrophile Mikroben.—Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. und Hyg. Abt., 2, 22, 443.
Bergersen F. J. 1960. Biochemical pathways in legume root nodule fixation.—Bacteriol. Rev., 24, N 2, 246.
Bergersen F. J. 1962. Oxygenation of leghaemoglobin in soybean root nodules in relation to the external oxygen tension.—Nature, 194, N 4833, 105.
Bergersen F. J., Wilson P. M. 1959. Spectrophotometric studies of the effects of nitrogen on soybean nodule extracts.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 45, N 11, 1641.
Blom J. 1931. Eine Versuch, die chemischen Vorgänge bei der Assimilation des molekularen Stickstoffs durch Mikroorganismen zu erklären.—Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. und Hyg., Abt. 2, 84.
Bortels H. 1930. Molibdän als Katalisator bei der biologischen Stickstoffbindung.—Arch. Microbiol., 1, H. 3.
Bortels H. 1936. Weitere untersuchungen über die Bedeutung von Molybdän, Vanadium, Wolfram and anderen Erdschenstoff für stickstoffbindende und andere Mikroorganismen.—Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde, Infektionskrankh. und Hyd., Abt. 2, B. 95.
Bortels H. 1937. Über die Wirkung von Molybdän — and Vanadiumdüngungen auf Leguminosen.—Arch. Microbiol., 8, H. 1, 13.
Brenchley W. E., Thornton N. G. 1925. The relation, the development, structure and functioning of the nodules on Vicia faba as influenced by the presence or absence of boron in the nutrient medium.—Proc. Roy. Soc., Ser. B., 98.
Bulen W. A., Burns R. C., Le Comte J. R. 1965. Nitrogen fixation: hydrosulfit as electron donor with cell-free preparations of Azotobacter vinelandii and Rhodospirillum rubrum.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 53, N 3, 532.
Bulen W. A., Le Comte J. R. 1966. The nitrogenase system from Azotobacter: two enzyme requirement for N₂ reduction, ATP-dependent H₂ evolution, and ATP hydrolysis.—Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 56, N 4, 979.
Burriss R. H., Haas E. 1944. The red pigment of leguminous root nodules.—J. Biol. Chem., 155.
Burriss R. H., Miller C. F. 1941. Application of N¹⁵ to the study of biological nitrogen fixation.—Science, 93, N 2405, 114.
Chenitae G., Evans H. 1960. Physiological studies on Nodule—Nitrate Reductase.—Plant. Physiol., 35, N 4, 454.
Collman J. P., Kang J. W. 1966. Iridium complexes of molecular nitrogen.—J. Amer. Chem. Soc., 88, 3459.
Eilfjolk N. 1959. Crystalline Leghemoglobin.—Acta chem. scand., 13, 596.

- Virtanen A. J. 1947. The biology and chemistry of nitrogen fixation by legume bacteria.— Biol. Revs., 23, 239—269.
- Virtanen A. J. 1955. Biological nitrogen fixation.— 3me Congress International Biochimie. Bruxelles.
- Virtanen A. J., Laine I. 1946. Red, Brown and Green Pigments in Leguminous root nodules.— Nature, 157, N 3975, 25.
- Virtanen A. J., Jorma J., Laine I. 1945. The iron and haemin content of Leghaemoglobin.— Suomen Kemistilehti, B 18, 49.
- Virtanen A. J., Jorma J., Linkola H., Linnasalmi A. 1947. On the relation between nitrogen fixation and Leghaemoglobin content of leguminous root nodules. II.— Acta chem. scand., 1, 90.
- Wieland H. 1922. Über den Verlauf der Oxydationsvorgänge.— Ber. Dtsch. chem. Ges., 55, N 11, 3639.
- Wilson P. W., Burris R. H. 1947. The mechanism of biological nitrogen fixation.— Bacteriol. Revs., 11.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	3
Биохимическая характеристика молекулярного азота	41
Пути связывания молекулярного азота у микроорганизмов	43
Железосодержащие белки, принимающие участие в фиксации молекулярного азота	49
Ферредоксин	49
Клубеньковый гемоглобин	22
Гемопротеиды каталаза и пероксидаза в клубеньках бобовых	28
Молибден и его роль в процессах азотфиксации	29
Микроэлементы, оказывающие косвенное действие на азотфиксацию	34
Кобальт	35
Бор	37
Медь	37
Марганец	38
Магний	38
Цинк	38
Ванадий	38
Микроэлементы и ферменты водород-донорной системы азотфиксации	39
Гидрогеназа	39
Дегидрогеназы	41
Схема фиксации молекулярного азота в клубеньках бобовых культур	43
Литература	46

Ян Вольдемарович Пейве
Микроэлементы и биологическая фиксация
атмосферного азота
XXXI Тимирязевское чтение

Утверждено к печати
Ордена Трудового Красного Знамени
Институтом физиологии растений им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР

Редактор Л. Н. Кузьмина
Технический редактор И. Н. Журкина

Сдано в набор 30/X 1970 г. Подписано к печати 22/XII 1970 г.
Формат 60×90^{1/8}. Усл. печ. л. 3.25. Уч.-изд. л. 3.1
Тираж 1300 Бумага № 2. Тип. зак. 4356. Т-19819. Цена 24 к.

Издательство «Наука»
Москва, К-62, Подосенский пер., 21

2-я типография издательства «Наука»
Москва, Г-99, Шубинский пер., 10

О П Е Ч А Т К А

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
31	Рис. 11, этап в	H ₂	N ₂

Я. В. Пейве