

УДК 631.461.51

ФИКСАЦИЯ АТМОСФЕРНОГО АЗОТА БАКТЕРИЯМИ РОДА CLOSTRIDIUM ПРИ ДОБАВЛЕНИИ В СРЕДУ ПУРИНОВЫХ И ПИРИМИДИНОВЫХ СОЕДИНЕНИЙ

В. Т. ЕМЦЕВ, В. А. БАБАЙЦЕВА, Н. П. ПОКРОВСКИЙ
(Кафедра микробиологии)

Пуриновые и пиримидиновые соединения могут служить для маслянокислых бактерий рода *Clostridium* либо органическими ростовыми веществами [12], либо источником азота [1, 3]. В литературе, однако, отсутствуют данные об усвоении ими молекулярного азота при росте на пуриновых и пиримидиновых соединениях. Между тем в процессе разложения поступающих в почву органических материалов (растительных и животных остатков, навоза и пр.) данные соединения высвобождаются из нуклеиновых кислот и могут оказывать определенное влияние на связывание азота атмосферы *Clostridium*. В этой связи представляло интерес проследить влияние пуриновых и пиримидиновых соединений на размеры фиксации азота *Clostridium*.

Объекты и методы исследований

Объектами изучения служили бактерии рода *Clostridium* из различных почв, выде-

ленные на синтетической среде с урацилом, которая состояла из основной среды (ОС) и урацила 0,01%. В ОС входили следующие компоненты: Na_2HPO_4 — 0,1%; KH_2PO_4 — 0,05, MgSO_4 — 0,05; CaCO_3 — 0,5; FeCl_3 — следы; глюкоза — 0,5; дрожжевой автолизат — 0,002, тиогликолят Na — 0,05; нейтральрот — 0,004%, микроэлементы по Федорову — 1 мл; вода дистиллированная — 1 л.

Культура *Cl. pasteurianum* штамм 138 была выделена из дерново-подзолистой почвы (опытное поле Тимирязевской академии), *Cl. butyricum* штамм 100 — из дерново-подзолистой почвы (с. Чашниково Московской области), *Cl. butyricum* штаммы 1546, 1534 — из типичного чернозема (Стрелецкая степь, Курская область), *Cl. butyricum* штамм 1446 — из лугово-каштановой почвы (Ростовская область), *Cl. acetobutylicum* штаммы 4115 и 2100 — из светло-каштановой почвы (Кировобадская обл.). Одна неидентифицированная

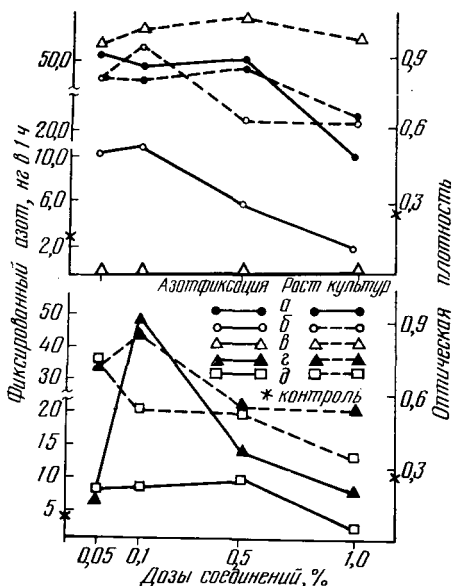


Рис. 1. Влияние различных доз пуриновых и пиримидиновых соединений на рост культур *Cl. pasteurianum* и уровень фиксации азота.

а — оротовая кислота; б — дигидротимин; в — урацил; г — гуанин; д — мочевая кислота; звездочкой обозначен контроль.

культура *Clostridium* sp. штамм 2200 была выделена из серозема (опытное поле Ташкентского сельскохозяйственного института).

Азотфиксирующую способность культур *Clostridium* определяли на ОС с добавлением следующих пуриновых или пиримидиновых соединений (в дозах от 0,05 до 1 %):

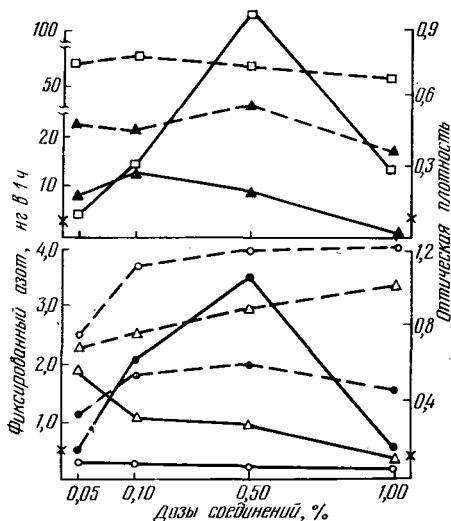


Рис. 3. Влияние различных доз пуриновых и пиримидиновых соединений на рост культур *Cl. acetobutylicum* и уровень фиксации азота.

Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

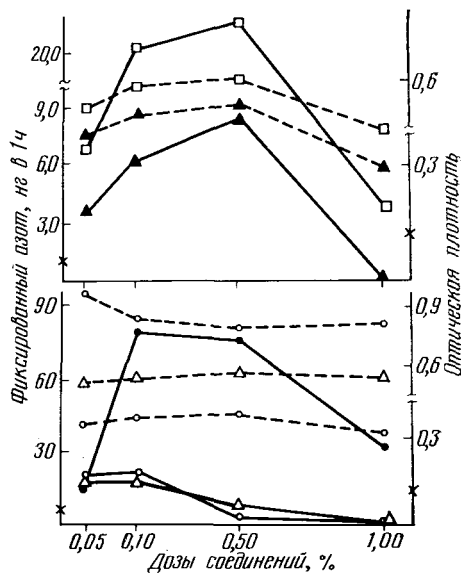


Рис. 2. Влияние различных доз пуриновых и пиримидиновых соединений на рост культур *Cl. butyricum* и уровень фиксации азота.

Условные обозначения те же, что и на рис. 1.

урацил, оротовая кислота, дигидротимин, мочевая кислота, гуанин. pH сред устанавливали на уровне 7,0—7,2.

В опыте использовали пробирки на 30 мл, куда наливали 15 мл питательной среды. Стерилизацию проводили дважды при 50,6 кПа в течение 20 мин.

Для заражения применяли трехсуточный инокулят клеток *Clostridium*, выращенный на среде, состоящей из равных частей ОС и картофельно-морковного отвара и 0,1 % урацила. Через трое суток культуральную жидкость в течение 10 мин подвергали центрифугированию при 7 тыс. оборотов в минуту. Осадок промывали дважды физиологическим раствором и выдерживали от 2 до 12 ч в безазотистой среде Виноградского без мела и глюкозы. Среды, предварительно прогретые и затем охлажденные, заражали 1 мл инокулята. Затем их инкубировали 3 сут. *Cl. pasteurianum* и *Cl. butyricum* выращивали при температуре 30°, *Cl. acetobutylicum* и *Clostridium* sp. — при 37°.

В ходе опыта измеряли pH на ЛПУ-0,1 и оптическую плотность — на ФЭК-56 со светофильтром Л-540 нм в кюветах 30×60. Опыты проводили в 2-кратной повторности.

Способность культур *Clostridium* фиксировать атмосферный азот при росте на пуриновых и пиримидиновых основаниях определяли с помощью ацетиленового метода [11]. Пробирки с трехсуточной культурой *Clostridium* закрывали резиновыми пробками, которые закрепляли специальными металлическими зажимами. Из пробирок дважды откачивали воздух вакуумным насосом и промывали аргоном с последующим вакуумированием и повторным про-

мыванием аргонном. Затем в них вводили очищенный ацетилен в количестве 1,6 % от общего объема пробирки. Культуры инкубировали при указанных выше температурах в течение 1 ч. После инкубации шприцем из них отбирали пробу газа 0,5 мл и на газовом хроматографе Хром-4 с помощью пламенно-ионизационного детектора определяли количество образовавшегося этилена. Контролем служил воздух в пробирках с культурами, в которые не вводили ацетилен. Разделение газов осуществляли в металлической колонке длиной 1,2 м и диаметром 3 мм, заполненной силикагелем АСК (размер частиц от 0,25 до 0,5 мм). В качестве газа-носителя использовали азот, постоянная скорость тока которого была 42 мл/мин. Количество этилена определяли по стандартным пикам калибровочной кривой. При расчете количества фиксированного азота соотношение между восстановленным этиленом и аммиаком было равными 3.

Результаты исследований

Пуриновые соединения при концентрации 0,05—0,5 % стимулировали азотфиксацию всех изучаемых культур (рис. 1—3). Высокий уровень фиксации наблюдался на мочевой кислоте у культур *Cl. butyricum* и *Cl. acetobutylicum* и на гуанине у *Cl. pasteurianum*, а наивысшим он был у большинства *Clostridium* при концентрации этих соединений 0,5 %. Исключение составила культура *Cl. pasteurianum*, для которой концентрация гуанина 0,1 % оказалась оптимальной. Пуриновые соединения в количестве 1,0 % резко снижали уровень азотфиксирующей способности у исследуемых культур.

В вариантах с пиримидиновыми соединениями оптимум азотфиксации большинства изучаемых культур в случаях с оротовой кислотой наблюдался при ее концентрации 0,1—0,5 %. На урациле и дигидротимине некоторые штаммы усваивали азот только при использовании малых их доз (0,05—0,1 %), причем в ряде случаев уровень фиксации был ниже, чем в контроле. Так, на дигидротимине данный процесс наблюдался только у *Cl. pasteurianum*, *Cl. butyricum* штаммов 100, 1534, 1543 и одного штамма *Cl. acetobutylicum* при концентрации 0,05—0,1 %.

Следует отметить также, что пуриновые и пиримидиновые соединения существенно стимулировали рост всех штаммов *Clostridium*, хотя в ряде случаев, как, например, при наличии в средах урацила и дигидротимина, несмотря на существенное накопление биомассы, фиксация азота была незначительной или полностью отсутствовала.

Возникает вопрос, за счет чего происходит стимуляция азотфиксации *Clostridium* при внесении в среду пуриновых и некоторых пиримидиновых соединений. Согласно имеющимся в литературе данным [12], аденин, гуанин, ксантин, урацил и тимин оказывают положительное влияние на рост *Clostridium*. Свободные пурины и пиримидины, образующиеся при распаде нуклеиновых кислот, могут использоваться повторно для синтеза [7].

С этой точки зрения вполне понятна стимуляция азотфиксации *Clostridium* при внесении в среду гуанина, мочевого, а также оротовой кислот, являющихся непосредственным предшественником пиримидинов у многих микроорганизмов.

Кроме того, рядом авторов [3, 4] установлено, что пуриновые и пиримидиновые соединения могут использоваться *Clostridium* как источники азотного питания. Первые, содержащие экзоциклические аминогруппы, дезанимируются без разрыва гетероциклического цикла, и, видимо, высвобождающийся при этом азот используется анаэробами в качестве «стартового». Известно, что на средах со «стартовым» азотом уровень фиксации азота атмосферы *Clostridium* существенно выше, чем на безазотистой среде [5, 6].

Стимулирующее действие урацила на рост исследуемых культур и ингибирование фиксации азота можно, по-видимому, объяснить большей доступностью пиримидинов, чем пуринов, для анаэробов рода *Clostridium* [2, 4, 13, 14].

Установлено, что некоторые анаэробы рода *Clostridium*, как, например, *Cl. utracilicum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. sartagoforum* и маслянокислые анаэробы, способны использовать и трансформировать урацил по восстановительному пути с расщеплением пиримидинового скелета и высвобождением аммония [9, 10]. Возможно, угнетающее действие пиримидинов на азотфиксирующую способность *Clostridium* определяется

Влияние биотина (0,0002 мкг/мл) и никотиновой кислоты (0,5 мкг/мл) на рост и фиксацию азота разными видами *Clostridium*

Культура, штамм	Рост оптической плотности			Фиксация азота, нг/мл·ч		
	контроль	биотин, 0,0002	никотиновая кислота, 0,5	контроль	биотин, 0,0002	никотиновая кислота, 0,5
<i>Cl. pasteurianum</i> , 138	0,39	0,97	0,81	3,1	183,6	9,5
<i>Cl. butyricum</i> , 100	0,29	0,89	0,58	0,4	42,5	2,7
<i>Cl. butyricum</i> , 1546	0,29	0,67	0,19	0,2	13,1	0,5
<i>Cl. acetobutylicum</i> , 4115	0,27	0,93	0,61	4,6	11,7	9,0

наличием значительных количеств связанного азота, выделяющегося в среду при трансформации урацила и дегидротимина.

Влияние пиримидинов на рост и азотфиксирующую способность *Clostridium* имеет много общего с явлением, наблюдаемым при внесении в среду больших доз (0,1 % и выше) связанного минерального и органического азота. При этом отмечается значительный рост клеток *Clostridium*, однако азотфиксирующая способность угнетается частично или полностью [5].

Добавки витаминов в ОС оказали заметное влияние на рост и азотфиксиру-

ющую активность *Clostridium*, причем биотин значительно сильнее активизировал фиксацию азота, чем никотиновая кислота, а у *Cl. pasteurianum*, чем гуанин и оротовая кислота (таблица, рис. 1).

Таким образом, пуриновые и пиримидиновые соединения и их производные способствуют усилению роста *Clostridium*, а также связыванию молекулярного азота атмосферы. Степень стимулирующего воздействия указанных веществ на фиксацию азота *Clostridium* зависит не только от характера соединения, но и от вида и штамма микроорганизма.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дунцис М. Э., Витол М. Я. Трансформация производных пурина анаэробными микроорганизмами рода *Clostridium*. — Уч. зап. ЛГУ им. П. Стучки, 1972, т. 149, с. 49—59. — 2. Дунцис М. Э. Условия культивирования анаэробных микроорганизмов из рода *Clostridium*, выделенных на средах с пиримидиновыми соединениями. — Науч. докл. высшей школы. Биолог. науки, 1972, № 8, с. 100—104. — 3. Емцев В. Т., Бабайцева В. А., Витол М. Я. Трансформация пуриновых и пиримидиновых соединений почвенными анаэробами рода *Clostridium*. — Изв. ТСХА, 1977, вып. 2, с. 107—112. — 4. Емцев В. Т., Бабайцева В. А. Распространение анаэробных бактерий рода *Clostridium*, трансформирующих пуриновые и пиримидиновые соединения в почвах Советского Союза. — Изв. ТСХА, 1978, вып. 2, с. 124—132. — 5. Емцев В. Т., Дзадзая Т. Д., Мергеладзе А. Г. Изменение азотфиксирующей активности бактерий рода *Clostridium* в зависимости от экологических условий. — Изв. ТСХА, 1974, вып. 4, с. 100—110. — 6. Емцев В. Т. Почвенные анаэробные азотфиксаторы рода *Clostridium*. — Успехи микробиол., 1974, вып. 9, с. 153—182. — 7. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1976. — 8. Рубан Е. Л. Пуриновые основания и их роль в обмене веществ бактерий. — Микробиология, 1961, т. XXX, вып. 1, с. 173—180. — 9. Campbell U. — J. Biol. Chem., 1960, vol. 235, p. 2375—2378. — 10. Hilton M. G., Mead G. C., Elsdon S. R. — Archiv f. Microbiol., 1975, vol. 102, p. 145—149. — 11. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. — Plant Physiol., 1968, vol. 43, p. 1185. — 12. Stolp H. — Archiv f. Microbiol., 1955, Bd 21, N 3, S. 273—293. — 13. Schäper R., Schawartz A. C. — Ztb. Bact. Hyd. I Abt., Orig. A. 235, p. 165—172. — 14. Vogels V. D., Van Der Drift. — Bact. Rev., 1976, vol. 40, p. 402—467.

Статья поступила 5 апреля 1980 г.

SUMMARY

Purine and pyrimidine compounds and their derivatives contributed to more intensive growth of *Clostridium* stimulating the process of molecular nitrogen fixation. The extent of their effecting air nitrogen fixation by *Clostridium* depends not only on the nature of the compound, but on the species and the strain of the microorganism as well.