

НАУКА В СССР

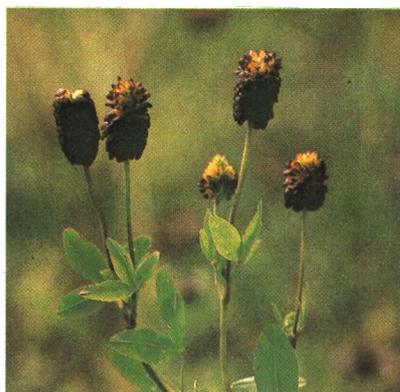
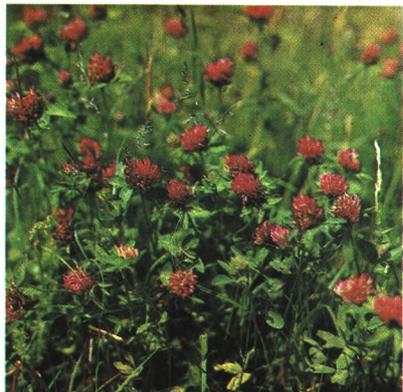
Издание Академии наук СССР

ISSN 0203-4425



МАЙ—ИЮНЬ

3. 1985



ПОЙМАННЫЙ АЗОТ

Основная часть азота находится в природе в свободном состоянии. Общее содержание этого элемента на планете (включая гидросферу и атмосферу) сравнительно невелико — 0,04 процента, но он составляет 78 процентов объема воздуха. Его название происходит от греческого слова "азоос" — безжизненный. Животные, помещенные в атмосферу чистого азота, быстро погибают, но не из-за ядовитости газа, а из-за отсутствия кислорода. Для любой живой клетки он совершенно необходим. В составе сложных органических соединений, в частности белковых веществ, азот присутствует в каждом растении и животном, в том числе в самых важных структурах клеток — протоплазме и ядре,

включающих наследственный аппарат.

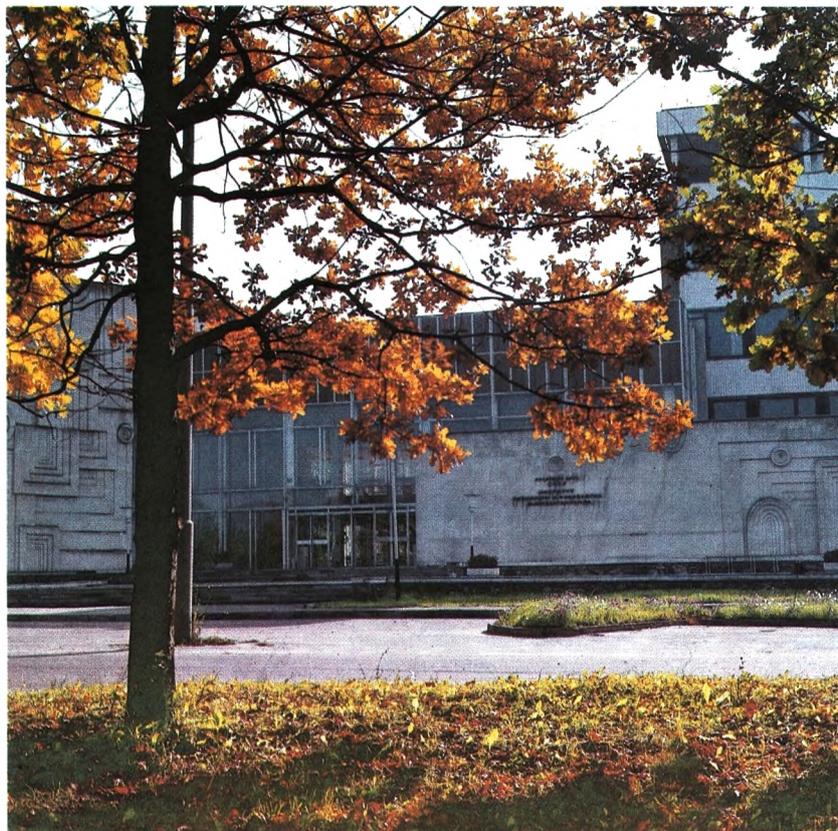
Несмотря на высокое содержание в атмосфере (на каждый квадратный метр земли его приходится 80 т), стоящий в периодической системе под номером 7 элемент для многих организмов абсолютно недоступен. Белковые соединения человек и животные получают преимущественно из растительного мира. Однако и растения не могут использовать свободный азот воздуха. Они усваивают его лишь в связанном состоянии, в виде солей аммония и азотной кислоты и других соединений.

Для повышения плодородия в почву необходимо вносить азотные удобрения. Высокая урожайность зерновых в развитых странах достигается в основном как

Основной вклад в обогащение почвы азотом вносят бобовые растения.

На фото: клевер луговой (слева, вверху) и горошек заборный (слева, внизу); вязель пестрый (справа, вверху) и каштановый клевер (справа, внизу).

Фото А. Бобровича



Фасад здания Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР в г. Пущине.

Здесь проводятся исследования по биологической фиксации азота.

Фото Ю. Беспалова

раз благодаря их широкому применению. В связи с интенсификацией земледелия потребность в азотных удобрениях с каждым годом растет, и в настоящее время производство их достигло гигантских размеров — около 50 миллионов тонн в год. Сможет ли человечество в будущем полагаться только на этот источник связанного азота?

Очевидно, нет. На это есть две веские причины. Первая: как показывают расчеты, на промышленное получение азотных удобрений уже сейчас тратится около 1,6 процента производимой в мире энергии. И эта цифра, по мнению специалистов, в будущем может быть увеличена лишь незначительно.

Вторая: удобрения усваиваются растениями в лучшем слу-

чае наполовину — оставшаяся часть вымывается или разлагается почвенными микроорганизмами до ядовитых окислов азота и становится мощным источником отравления окружающей среды.

ГДЕ ЖЕ ВЫХОД?

Его подсказывает сама природа. Естественным сообществам растений азот поставляют главным образом особые азотфиксирующие микроорганизмы, способные переводить его из воздуха в усвояемую форму (растворимые нитросоединения). Те же бактерии снабжают азотом и сельскохозяйственные угодья, причем "поставляют" его примерно столь-

ко, сколько человек в виде соответствующих удобрений. Следовательно, биологическая фиксация азота (включение атмосферного азота в состав соединений живой клетки) — существенное подспорье в сельскохозяйственном производстве. Львиную долю связанного азота на культивируемых землях дают клубеньковые бактерии, так называемые ризобии, образующие небольшие клубеньки на корнях бобовых растений (горохе, сое, люпине и т.д.). На втором месте после них — синезеленые водоросли — основной источник азота на рисовых посевах.

Фиксированный микробами азот используется растениями практически полностью, а жизнедеятельность бактерий и процессы азотфиксации обеспечиваются энергией солнца. Например, в случае симбиоза ризобий с бобовыми растения получают от бактерий фиксированный азот, а рост бактерий и фиксация ими атмосферного азота всецело зависят от фотосинтеза, происходящего в листьях растений.

Отсюда понятен исключительный интерес к биологической фиксации азота, который наблюдается в последние годы. Общая задача, стоящая перед учеными, сводится к следующему: значительно повысить уровень биологической азотфиксации на сельскохозяйственных угодьях и свести к минимуму применение химических азотных удобрений. Задача сложная и включает по крайней мере три направления: познание биохимических основ биологической азотфиксации; изучение на молекулярном уровне азотфиксирующего симбиоза ризобий с бобовыми растениями; создание искусственных азотфиксирующих симбиозов на злаках и важнейших технических культурах.



В отделе молекулярной биологии института изыскиваются возможности для направленного конструирования хозяйственно-ценных штаммов микроорганизмов с повышенной способностью к фиксации атмосферного азота.

Фото Л. Устинова

В СССР, с его умеренным и холодным климатом в главных зонах земледелия, основной вклад в обогащение почв азотом вносят с помощью симбионтов бобовые культуры: клевер, горох, люцерна, люпин. Поэтому работы, направленные на повышение выхода азотфиксации в земледелии, связаны прежде всего с селекцией, поиском и отбором эффективных штаммов клубеньковых бактерий. В массовом масштабе идет изучение штаммов ризобий, выделяемых из почвы. В нескольких научных центрах страны проводят также конструирование штаммов ризобий с повышенной способностью фиксации атмосферного азота методами молекулярной генетики и геной инженерии.

Мы хотим рассказать об экспериментах, проведенных в отделе молекулярной биологии Института биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР в Пущине. Они были начаты в 1976 году.

Трудности, с которыми сразу же пришлось столкнуться, оказались весьма типичными для того времени. Исследования клубеньковых бактерий еще не вошли в круг вопросов, изучаемых генетиками. Для некоторых видов ризобий не были разработаны приемы выделения мутантов — новых в генетическом отношении форм. Практически отсутствовали сведения о генетическом контроле симбиоза и азотфиксации. Само собой разумеется, что возникла необходимость налаживания техники проверки симбиотических и азотфиксирующих свойств бактерий на выращенных в лабораторных условиях бобовых растениях. В первых попытках мы опирались на уже имеющийся опыт зарубежных коллег. Для постановки и совершенствования экспериментов чрезвычайно полезным и плодотворным оказалось сотрудничество между специалистами СССР, Венгрии и Польши.

В качестве одного из объек-



Молекулярно-генетический механизм симбиоза и фиксации азота отработывался на сое и бактерии ризобии.

Среди различных факторов, вызывающих у бактерий генетические изменения, использовали ультрафиолет. Раствор с ризобиями подвергали облучению, а затем они высевались на питательную среду.

Фото Ю. Беспалова

тов исследований молекулярно-генетических механизмов симбиоза и фиксации азота решено было выбрать бактерию *Rhizobium japonicum*, поселяющуюся на корнях сои. Этой культурой в нашей стране уже сейчас заняты значительные площади в южных районах, и в дальнейшем посевы будут расширяться. Интересный факт — некоторые почвы (например, в Крыму) вообще не содержат азотфиксирующих бактерий для сои, поэтому на корнях высеваемых культур нет и характерных клубеньков, и фиксация атмосферного азота не идет. В этом случае урожай сои всецело зависит от вносимых азотных удобрений!

Значит надо заражать семена сои соответствующими клубеньковыми бактериями, которые давали бы повышенный уровень азотфиксации и обеспечивали дополнительный урожай без внесения химических азотных удобрений. Получить такие бактерии было непросто... Более

**БАКТЕРИИ "ПОСТАВЛЯЮТ" СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫМ
УГОДЬЯМ ПРИМЕРНО СТОЛЬКО АЗОТА, СКОЛЬКО ЧЕЛОВЕК
ВНОСИТ В ВИДЕ УДОБРЕНИЙ**

того, неплохо было бы, чтобы они к следующему году погибли и не составляли конкуренции для последующих штаммов. Разрешима ли сложная задача?

**ПОМОГЛИ
ЭКСПЕРИМЕНТЫ**

Из опубликованных результатов исследований процессов азотфиксации у свободноживущей бактерии *Klebsiella pneumoniae*, а также работ по изучению генетической регуляции

обмена азота в клетках других подобных микроорганизмов можно было почерпнуть очень полезную информацию и для манипулирования с ризобиями. Она касалась существования у бактерий тончайшего генетического механизма, контролирующего общий баланс азотного обмена и сопрягающего его с процессами фиксации этого жизненно важного элемента.

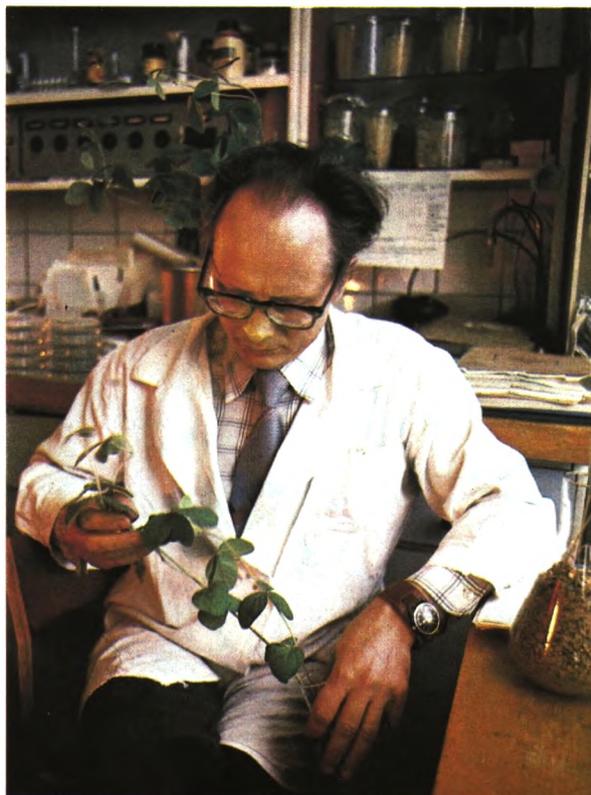
Биологический смысл подобной системы таков: в зависимости от внешних условий "включается" тот или иной способ получения азота. Все дело

в том, что усвоение свободного азота из воздуха бактериями сопряжено с большими энергетическими затратами. Поэтому в процессе эволюции у них и выработался гибкий механизм, позволяющий просто отключать переработку свободного азота, если есть возможность, получать этот элемент другим способом (например, из имеющихся в почве усвояемых нитросоединений). Сейчас достоверно известно, что этот механизм контролируется 3-4 генами, тонко отлаживающих азотный обмен в клетке и предельно рациональ-

В качестве объекта исследований была выбрана соя – представительница семейства бобовых, выращиваемая в лабораторной теплице.

Фото Ю. Беспалова

В круг научных интересов кандидата биологических наук К.М. Злотникова входит изучение азотфиксирующих клубеньковых бактерий. Им совместно с сотрудниками института разрабатываются приемы выделения мутантов – новых в генетическом отношении форм микроорганизмов.



На корнях растений семейства бобовых селятся колонии (клубеньки) бактерий, способных усваивать азот – один из основных компонентов питания растений – из воздуха. Эти же бактерии снабжают азотом и сельскохозяйственные угодья, причем поставляют его примерно столько, сколько человек в виде соответствующих удобрений.

На фото: многолетний гибридный люпин (внизу); чина луговая (вверху); мышиный горошек (справа внизу).

Фото А. Бобровича

но сочетающих с ним азотфиксацию.

Ну а как же заставить гены азотфиксации работать независимо от этой мудрой, с точки зрения природы, но мешающей порой человеку, гибкой системы? Выход пока один: получить такие новые формы бактерий, у которых были бы изменения в генетическом аппарате, не позволяющие "отключать" гены фиксации свободного азота ни при каких внешних обстоятельствах, даже чрезвычайно выгодных в энергетическом отношении для клетки.

Поскольку все сказанное относится и к ризобиям, то наша задача сводилась к тому, что-

бы научиться получать их мутанты с нарушениями в описанной выше системе регуляции азотного обмена. Быть может, среди них удастся найти бактерии с повышенной способностью к азотфиксации в симбиозе с соей? На первом этапе надо было научиться выделять мутанты вообще. Стали испытывать различные факторы. Наиболее ощутимый эффект дали химические воздействия. В частности, органическое вещество нитрозогуанидин. Его добавляли в жидкую питательную среду, где находились молодые, только что начавшие делиться клетки. Нитрозогуанидин свободно проникает в бактерию и, воздей-

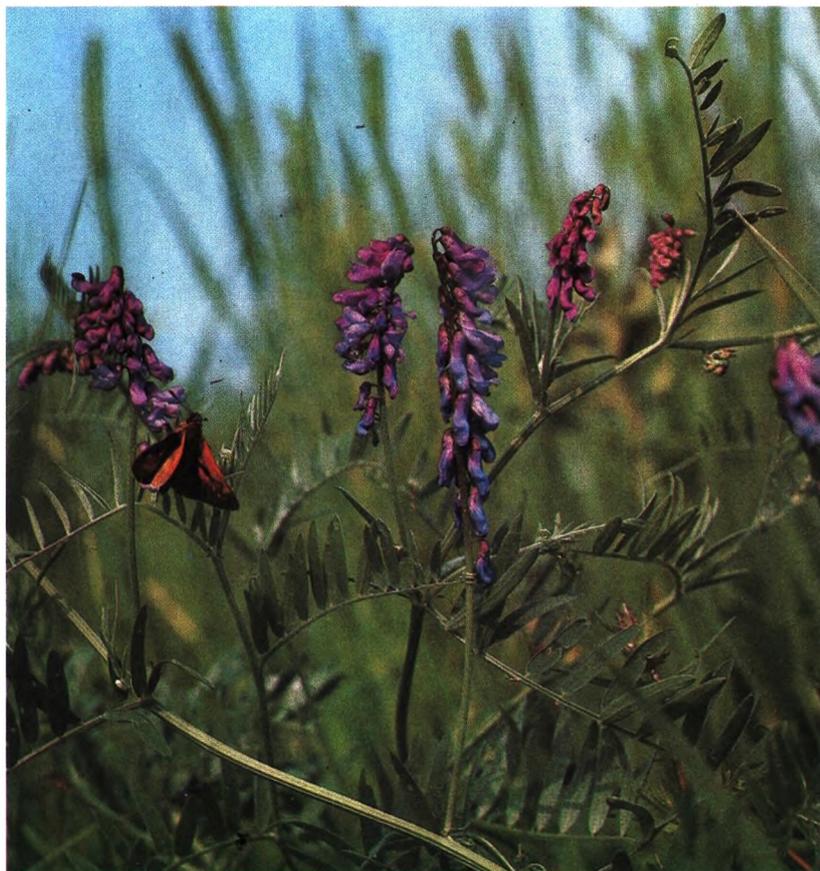
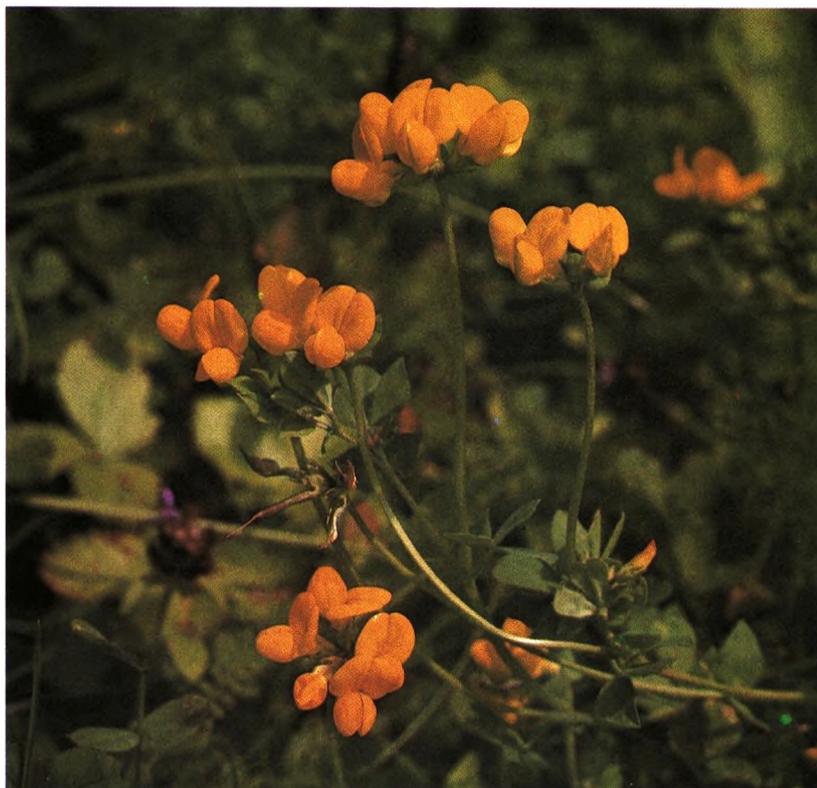
ствуя на ее ДНК, вызывает изменение в генетическом аппарате, которое наследуется и передается следующим поколениям.

Новые формы бактерий получали и с помощью транспозонов – наследственных элементов, способных при определенных условиях отрываться от своего места на молекуле ДНК и встраиваться в любой участок этой же или другой молекулы*. Если они оказываются в пределах какого-то гена, то считывание наследственной информации нарушается. Ген, следо-

* Э.С. Пирузян. В преддверии генетической зеленой революции.— Наука в СССР, 1984, № 4.



вательно, становится поврежденным, т.е. мутировавшим. Как правило, транспозоны придают бактериям устойчивость к различным ядам и антибиотикам, поэтому следить за их переходом и наследованием достаточно легко. Примером получения мутанта с помощью транспозона может служить метод с использованием особого штамма кишечной палочки. На ее плазмиде — небольшой кольцевой молекуле ДНК — есть участок ДНК-транспозон, отвечающий за устойчивость клетки к антибиотику канамицину. Этот же штамм обладает способностью образовывать конъюгативный мостик — своеобразный проток



цитоплазмы, по которому могут перетекать отдельные генетические элементы из одной клетки в другую при скрещивании. Если данную кишечную палочку скрестить с ризобией, то по возникшему мостику в клетку ризобии перейдет плазмиды с описанным выше транспозоном.

Привнесенная плазмиды сама реплицироваться, удваиваться при делении, не может, но транспозон с вероятностью 10^{-3} — 10^{-4} в состоянии "перескочить" с нее в ДНК ризобии. В этом случае и все дочерние клетки ризобии, где произошла перестройка, будут иметь свойства, которые несет транспозон — невосприимчивость к антибиотику. Селекция на устойчивость к канамицину и выявляет клетки ризобий, где транспозон с привнесенной плазмиды перескочил в ее собственную ДНК (на плазмиду или хромосому — структурный элемент, содержащий основную ДНК клетки).

Итак, новые формы у ризобий получать научились. Вслед за этим началась работа уже по



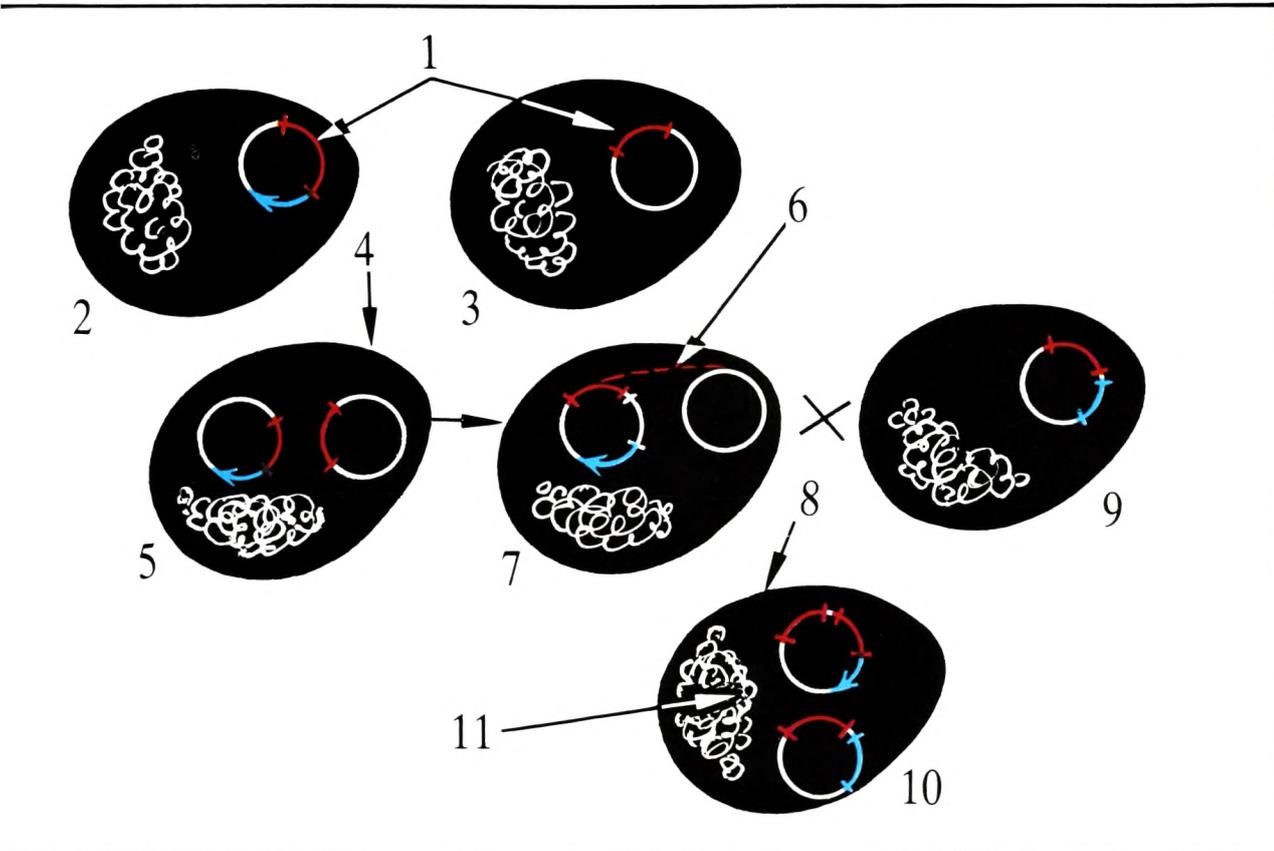


Рис. 1. Схема поэтапного конструирования штамма бактерии-симбионта гороха, несущего три набора азотфиксирующих генов:
 1 – клетки имеют по одному набору азотфиксирующих генов на плазмиде;
 2 – донор (отдающая плазмиду);
 3 – реципиент (принимающая плазмиду);
 4 – скрещивание;
 5 – гибридная бактерия с двумя плазмидами, несущими азотфиксирующие гены;
 6 – рекомбинация генов;
 7 – два набора азотфиксирующих генов на плазмиде;
 8 – скрещивание;
 9 – штамм с геном ферментной (гидрогеназной) активности и азотфиксирующими генами;
 10 – гибридная бактерия с тремя наборами азотфиксирующих генов и одним геном ферментной (гидрогеназной) активности;
 11 – новый штамм бактерии-симбионта гороха, предназначенный для проверки в полевых условиях.



Продолжение.
Начало на стр. 56.

выделению мутантов с нарушениями в азотном обмене. Выделили 17. Все они требовали для роста в качестве источника азота аминокислоты глютамин или глютамат и не росли на других соединениях. При проверке на сое в условиях лабораторной теплицы одни из них показали сниженный уровень симбиотической азотфиксации, другие — нормальный. Наибольший же интерес представляли два мутанта, у которых процесс фиксации азота проходил эффективнее. Они были испытаны на деляночных опытах в полевых условиях в Украинском НИИ земледелия и показали статистически достоверную прибавку в урожае сои. Более строгая оценка количественного вклада полученных мутантов в прибавку урожая будет дана уже после опробования на больших площадях, что сейчас и делается. Для исследователей же крайне важно и ценно то, что найден принципиальный путь получения бактерий с усиленной способностью к азотфиксации. Кроме того, из-за строгой потребности в глютамате или глютаmine они не способны жить в почве и не будут составлять конкуренцию новым более производительным штаммам бактерий, которые, несомненно, будут получены в будущем.

Естественно, что, изучая биохимические механизмы нарушений генетического аппарата у выделенных мутантов, мы сможем понять интимные стороны регуляции процессов азотфиксации в клетке бактерий и соответственно предсказывать возможность получения новых штаммов ризобий с повышенным уровнем симбиотической азотфиксации.

РАСКРЫТЬ МЕХАНИЗМ ПРОЦЕССА ФИКСАЦИИ АЗОТА У БАКТЕРИЙ — ЗНАЧИТ РЕШИТЬ ПРОБЛЕМУ ВЫСОКИХ УРОЖАЕВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ КУЛЬТУР

ГЛАВНОЕ ЗВЕНО — ПЛАЗМИДЫ

Другое направление в работе касается изучения генов, несущих наследственную информацию собственно процесса азотфиксации. Сегодня уже можно считать установленным, что гены, ответственные за способности к азотфиксации и симбиозу с бобовыми растениями, у большинства штаммов ризобий находятся на плаزمиде и сгруппированы на отдельных участках их ДНК. У клубеньковых бактерий плазмиды, как правило, достигают значительных размеров. В клетках их бывает несколько. Генетическая роль большинства плазмид ризобий неизвестна. Изучению их в настоящее время уделяется пристальное внимание во многих лабораториях мира. В некоторых случаях обнаружены конъюгативные свойства плазмид, способность переходить из клетки в клетку при контакте бактерий. Особый интерес представляют случаи, когда на таких плаزمиде находятся гены, контролирующие фиксацию азота и симбиоз. С последними можно манипулировать посредством различных приемов молекулярной генетики и относительно просто передавать в нужные штаммы бактерий.

Мы взяли ризобии, специфичные для гороха, и на первом этапе сконструировали штамм, содержащий две плазмиды с генами симбиоза и азотфиксации. Есть несколько способов заставить бактерию осуществить рекомбинацию (внутриклеточный обмен участками плазмид). Один из них основан на создании неблагоприятных для микроорганизмов условий жизни. Можно, например, выдержать их при низкой температуре. Когда клетка бактерии оказывается на грани гибели, у нее включаются и максимально исполь-

зуются буквально все механизмы приспособления к экстремальным условиям (в частности, перестройка генетического аппарата). Среди выживших после такой обработки бактерий были обнаружены самые разные варианты генетических изменений. Так мы получили штамм бактерий с плазмидой, содержащей два набора генов симбиоза и азотфиксации.

Теоретически ясно, что такой штамм способен фиксировать свободный азот в большем количестве, но совершенно естественно возникала и проблема энергетического обеспечения интенсивной работы азотфиксирующих генов. Ведь живая клетка — это очень сложная и рациональная система: любая потенциальная возможность повышения уровня ее жизнедеятельности может так и остаться потенциальной без подключения необходимого источника энергии. Откуда же его взять?

Многие бактерии, в том числе и некоторые ризобии, могут получать энергию, используя в качестве источника энергии водород. Вот мы и перенесли полученную плазмиду с двумя наборами генов азотфиксации в штаммы, способные усваивать водород и за счет этого обладающие потенциально более высокими энергетическими возможностями. Кроме того, штаммы — реципиенты имели и собственные наборы генов, необходимые для азотфиксации. Соответственно, у новых гибридных форм с привнесенной плазмидой оказалось уже по три набора таких генов. Вопрос о влиянии количества этих генов у ризобий на эффективность фиксации азота в симбиозе с бобовыми растениями и, следовательно, на урожай пока еще не исследован. Исходя из общих соображений, вполне логично ожидать его повышения. Сконструиро-

**БУДУЩЕЕ РАЦИОНАЛЬНОГО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА —
ЗА БИОЛОГИЧЕСКОЙ ФИКСАЦИЕЙ АЗОТА.
ЭТО — ГАРАНТИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СТАБИЛЬНЫХ И ВЫСОКИХ
УРОЖАЕВ**

ванный штамм ризобий сейчас испытывается.

С плазмидами ризобий у нас связано большинство проводимых исследований, поскольку на них находятся практически все гены, отвечающие у бактерий за симбиоз и азотфиксацию. Очень часто в клетках ризобий плазмид несколько. Вполне вероятно, что одни из них так или иначе усиливают симбиотические и азотфиксирующие способности клетки, другие, наоборот, ослабляют. Не исключено, что некоторые присутствующие в клетках ризобий плазмиды нужны для выживания в почве, но они же ослабляют симбиоз с растениями и азотфиксацию.

Вопросы эти чрезвычайно интересны и важны, а единственный способ ответить на них — эксперименты и еще раз эксперименты. Здесь возможно как освобождение бактерий от некоторых плазмид, так и искусственная комбинация плазмид в новых сочетаниях. Работы в этом направлении непочтаты край, но она совершенно необходима и сулит большие выигрыши во всех отношениях.

В ходе экспериментов с ризобиями-симбионтами фасоли в случае одного из штаммов нам удалось изгнать одну большую плазмиду из пяти присутствующих в клетках бактерий. Бактерии, потерявшие ее, практически не отличались по характеристикам роста на различных средах от исходного штамма, но при длительном хранении без посева погибали значительно быстрее. При проверке в лабораторных условиях оказалось, что полученный штамм показывает в 1,5–2 раза более высокую азотфиксирующую активность, чем обычный. Этот штамм отдан для полевых испытаний в Грузии.

Приведенный пример — неплохая иллюстрация к направлению работ с полезными микроорганизмами.

В ИНТЕРЕСАХ БУДУЩЕГО

Широкие горизонты для увеличения накопления азота бобовыми растениями открывает изучение собственно генов азотфиксации и симбиоза ризобий. Оно стало реальным буквально в последние два года, вследствие развития методов молекулярной генетики и генной инженерии. Выяснено уже, что все клубеньковые бактерии имеют очень сходные гены, контролирующие процесс “заражения” корней бобовых и образование клубеньков. За “привязанность” к определенному растению (хозяйскую специфичность) отвечают у ризобий специальные гены. Задача состоит в следующем: надо так изменить гены хозяйской специфичности, чтобы один и тот же штамм бактерий мог осуществлять азотфиксирующий симбиоз с любым бобовым растением (а еще лучше — со злаками, например пшеницей).

Сегодня исследователями выделены и изучаются гены ризобий, контролирующие сам процесс фиксации азота. Будем надеяться, что в конечном счете удастся выяснить интересующие нас тончайшие механизмы регуляции азотфиксации и станет ясно, как заставить клубеньковые бактерии “трудиться” на человека еще более производительно. Вполне реальным в связи с этим представляется прогноз ученых (исходящих из оценок, полученных на основе первых практических результатов) относительно повышения урожайности бобовых на 10–20 процентов.

Небеспочвенная фантазия и создание искусственных азотфиксирующих симбиозов. Практикуемое ныне выращивание злаковых на полях, где до них росли бобовые растения, обогатившие почву связанным азотом, приносит, конечно, свои плоды. Но как заманчиво иметь злаки,

которые сами обеспечивали бы себя азотом из воздуха и почти не нуждались в дополнительном снабжении им почвы. Все направления работ с ризобиями так или иначе закладывают фундамент для решения задачи создания искусственных симбиозов. Но тут не обойтись и без генной инженерии на самих растениях.

Возьмем, к примеру, пшеницу. Гены бобовых растений, ответственные за симбиоз с бактериями, необходимо будет ввести в ее наследственный аппарат. Конечно, это невероятно сложно. Но можно пойти другим путем. Известно, что на корнях злаков (пшеница, рожь, кукуруза и т.д.) живут бактерии азоспириллы. Они тоже обладают возможностью фиксировать азот из воздуха, но взаимодействие их с растениями выражено крайне слабо. Столь необходимая человеку азотфиксация идет на минимальном уровне, и растения практически не получают связанный азот. Заманчивым представляется путь гибридизации азоспирилл с ризобиями — конструирование новой бактерии, которая будет “узнавать” злаки (свойство азоспирилл) и проникать внутрь клеток корешков, вызывая образование клубеньков (свойство ризобий). Перспектива? Не только. Проблемой гибридизации азоспирилл с ризобиями уже занимаются в ряде лабораторий.

Несомненно, будущее рационального сельского хозяйства за биологической фиксацией азота, которая должна обеспечивать высокие урожаи не только бобовых, но и зерновых культур без внесения азотных удобрений или при очень малом их количестве.

*К.М. ЗЛОТНИКОВ,
кандидат биологических наук
В.Ю. ШАРОВ*