

Член-корреспондент АН СССР В. Л. КРЕТОВИЧ, З. Г. ЕВСТИГНЕЕВА,
К. А. АСЕЕВА, О. Н. ЗАРГАРЯН, Н. А. МОЧАЛКИНА

ФИКСАЦИЯ АЗОТА БЕСКЛЕТОЧНЫМИ ЭКСТРАКТАМИ ИЗ БАКТЕРОИДОВ КЛУБЕНЬКОВ ЛЮПИНА И СОИ

Работами Бергерсена и Тернера (1), а также Коха, Иванса и Рассела (2, 3) показано, что бесклеточные экстракты из бактериоидов клубеньков сои осуществляют фиксацию молекулярного азота в бескислородных условиях в присутствии АТФ-генерирующей системы и дитионита.

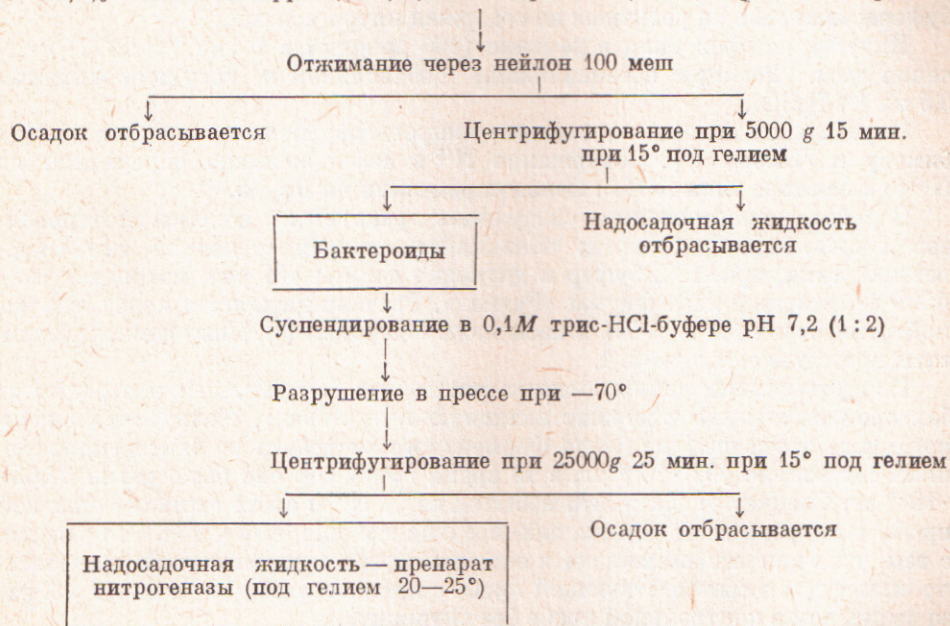
Задачей данной работы было определение азотфиксирующей способности бесклеточных экстрактов из бактериоидов клубеньков люпина по сравнению с экстрактами из бактериоидов клубеньков сои.

Растения люпина и сои выращивали в вегетационных домиках в сосудах с кварцевым песком из семян, предварительно инокулированных эффективными штаммами *Rhizobium lupini* 359a и *Rh. japonicum* 631 соответственно. Перед выращиванием в сосуды вносили питательную смесь Прянишникова с дозой азота, уменьшенной в 30 раз. Она составляла 3 мг азота на 1 кг песка. Для опытов использовали 45—48-дневные растения. Сбор растений и отделение клубеньков проводили непосредственно перед опытом. Более подробно методика сбора растений и отделения клубеньков описана нами ранее (4, 5).

Выделение бактериоидов и получение из них бесклеточных экстрактов производили в соответствии со схемой 1. Растирание клубеньков и выде-

Схема 1

Растирание клубеньков в ступке с калий-фосфатным буфером pH 7,0 в присутствии 1,5% поливинилпирролидона, 0,3 М сахарозы и 0,2 М аскорбината натрия



ление из них бактериоидов проводили при температуре 20—25° в атмосфере и под струей гелия в камере 4Б-ОС-а. После осаждения бактериоидов центрифугированием под гелием надосадочную жидкость удаляли из пробирок шприцем с последующим наполнением их насыщенным гелием буфером. Суспендированные в этом буфере бактериоиды мгновенно замораживали в камере пресса типа Итона (6) и разрушали под давлением 750 атм/см². Все дальнейшие операции получения нитрогеназы проводили также под гелием. Опытная смесь содержала ферментный экстракт 1,0 мл, АТФ 5 μ мол., креатинфосфат 70 μ мол., креатинкиназу 0,4 мг, дитионит 40 μ мол., трис-буфер 0,1 M (рН 7,2) 100 μ мол., MgCl₂ 5 μ мол. Общий объем опытной смеси 2,6 мл. Газовая смесь состояла из 20% N₂ (92,5 ат.% N¹⁵) и 80% гелия высокой чистоты. Газы были очищены от кислорода и примесей по Раппопорту и Ильинской (7).

Таблица 1

Фиксация N₂ экстрактами из бактериоидов клубеньков люпина и сои

Вариант опыта	N—NH ₃ , μ г на сосуд	Белок, μ г на сосуд	Избыток ат. % N ¹⁵	N ¹⁵ фиксир (10 ⁻³ μ г на 1 мг белка)
Лю п и н				
Полная опытная смесь	59,9	4200	0,32	49,5
Опытная смесь без дитионита	31,3	4200	0,0	0,0
Опытная смесь без фермента	0,0	0,0	0,0	0,0
С о я				
Полная опытная смесь	23,6	6600	1,07	31,05
Опытная смесь без дитионита	30,3	6600	0,0	0,0
Опытная смесь без фермента	0,0	0,0	0,0	0,0

Опыт проводили в сосудах типа сосудов Варбурга (8). На дно сосуда, наполненного газовой смесью, шприцем через резиновую эластичную пробку вносили трис-буфер с MgCl₂, затем АТФ и креатинфосфат, затем креатинкиназу, нитрогеназу и в последнюю очередь дитионит. В контрольные опыты вместо дитионита вносили такое же количество (по объему) буфера; контроль на реактивы не содержал нитрогеназы.

Инкубацию проводили в качалке (100 качаний в 1 мин.) при 27° в течение часа. Реакцию останавливали добавлением в сосудики шприцем 0,5 мл 1N H₂SO₄.

Определение аммиака проводили микродиффузионным методом по Любимову и Львову (9). Содержание N¹⁵ в азоте аммиака определяли на N¹⁵-анализаторе типа NOI-3. Белок определяли по Лоури.

В работе использовались следующие реактивы: поливинил-пирролидон и креатинфосфат фирмы «Кох-Лайт», аскорбинат натрия, синтезированный нами, трис-HCl-буфер и дитионит фирмы «Мерк», натриевая соль АТФ и креатинкиназа фирмы «Реанал». Раствор дитионита перед опытом нейтрализовали 0,1 N KOH и насыщали водородом (8). Полученные результаты представлены в табл. 1.

Из приведенных данных можно видеть, что бесклеточные экстракты из бактериоидов люпина содержат активную нитрогеназу. Количество фиксированного азота на 1 мг белка ферментного экстракта из бактериоидов люпина составляло 49,5 · 10⁻³ μ г, в то время как у сои оно было равно 31,05 · 10⁻³ μ г. Следует указать, что избыток ат. % N¹⁵ в азоте аммиака опытной пробы с нитрогеназой люпина значительно меньше, чем у сои. Это связано с тем, что количество аммиака в опытной пробе с нитрогеназой значительно выше, чем в соответствующей пробе с нитрогеназой сои, и почти в 2 раза выше, чем в контрольной пробе без дитионита.

Образование аммиака в опытной пробе с нитрогеназой люпина, по-видимому, протекало не только за счет фиксации азота, но и за счет других процессов, на что указывают данные Кретовича и сотрудников (10). В опытах с нитрогеназой сои этот процесс шел, по-видимому, в значительно меньших пределах и фиксированный азот составлял более значительную часть азота аммиака опытной пробы.

Описанный нами метод позволяет получать хорошо воспроизводимые результаты в опытах по фиксации молекулярного азота с ферментным препаратом нитрогеназы из бактериоидов как люпина, так и сои.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР
Москва

Поступило
2 X 1969

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ F. J. Bergersen, G. L. Turner, J. Gen. Microbiol., 53, 205 (1968). ² В. Koch, H. J. Evans, S. Russell, Plant Physiol., 42, 466 (1967). ³ В. Koch, H. J. Evans, S. Russell, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 58, 1343 (1967). ⁴ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 2, 208 (1969). ⁵ В. Л. Кретович, З. Г. Евстигнеева и др., ДАН, 186, 1198 (1969). ⁶ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Прикл. биохим. и микробиол., 4, 592 (1968). ⁷ Ф. М. Раппопорт, А. А. Ильинская, Лабораторные методы получения чистых газов, М., 1963, стр. 146. ⁸ В. И. Любимов, Н. П. Львов и др., Биохимия, 33, № 2, 364 (1968). ⁹ В. И. Любимов, Н. П. Львов, Б. Э. Кирштейне, Прикл. биохим. и микробиол., 4, 120 (1968). ¹⁰ В. И. Любимов, Н. П. Львов и др., Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 505 (1969).