

И. В. ЗАХВАТАЕВА, Е. Н. КОНДРАТЬЕВА

**ФИКСАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИМИ  
БАКТЕРИЯМИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ НАЛИЧИЯ СВЕТА, АТФ  
И ХАРАКТЕРА ЭКЗОГЕННОГО СУБСТРАТА**

(Представлено академиком А. Н. Белозерским 24 IV 1970)

Исследования фиксации молекулярного азота бесклеточными препаратами таких микроорганизмов как *Clostridium pasteurianum* и *Azotobacter vinelandii* (<sup>1-4</sup>), а также фотосинтезирующих бактерий *Rhodospirillum rubrum* (<sup>5</sup>) и *Chromatium* sp. штамм D показали, что этот процесс требует наличия АТФ или генерирующей ее системы и восстановителя, которым может быть дитионит, боргидрат, НАД-Н, Н<sub>2</sub> или пируват. Показано также, что во всех случаях, кроме использования дитионита, для азотфиксации необходимо добавление к реакционной смеси переносчика электрона в виде ферредоксина, флаводоксина (для *Cl. pasteurianum*) или метилвиологена.

В целых клетках фотосинтезирующих бактерий азотфиксация либо только наблюдалась на свету, либо резко стимулировалась в его присутствии (<sup>6-9</sup>). Однако возможные связи азотфиксации и фотосинтеза изучены мало.

Таблица 1  
Азотфиксация у фотосинтезирующих бактерий  
в зависимости от наличия света

Субстрат	<i>Chl. ethylica</i>		<i>Ect. shaposhnikovii</i>	
	свет	темнота	свет	темнота
Пируват	0,035	0,001	—	—
Этанол	0,039	0	—	—
Ацетат	0,029	0	2,725	0,325
Оксалацетат	0,069	0,008	2,900	0,104
Малат	—*	—	4,145	0,100
Без субстрата	0	0	0	0

\* Знак минус означает, что данного варианта опыта не было.

В задачу настоящей работы входило выяснение зависимости азотфиксации у зеленых серобактерий *Chloropseudomonas ethylica* штамм ЗС и пурпурных серобактерий *Ectothiorhodospira shaposhnikovii* штамм № 1 от наличия света, а также присутствия некоторых экзогенных субстратов. Для проведения опытов бактерии выращивали в условиях азотфиксации по методике, описанной в другом сообщении (<sup>10</sup>). Клетки из культур в экспоненциальной фазе роста отделяли центрифугированием и промывали 0,15 M фосфатным буфером (рН 7,0 для *Chl. ethylica* и 8,2 для *Ect. shaposhnikovii*). Реакционная смесь содержала: клетки (около 15 мг по белку) и субстрат в количестве 100 μмол. Дитионит и сульфид натрия вносили в количестве 0,025—0,05%. В некоторых случаях добавляли АТФ, АДФ, ро-



тенон или атебрин в концентрациях, указанных в табл. 2 и 4. Общий объем смеси доводили до 5 мл соответствующим фосфатным буфером. Опыты ставили в сосудах Варбурга на качалке в люминистате при освещенности около 1000 лк и 30°. Предварительно из сосудов откачивали воздух и заполнили их N<sub>2</sub> (90 ат. % N<sup>15</sup>). Продолжительность опытов до 20 час.

Таблица 2

Азотфиксация у фотосинтезирующих бактерий в присутствии АТФ

Субстрат	Chl. ethylica		Ect. shaposhnikovii	
	свет	темнота	свет	темнота
Этанол	0,035	0,005	—	—
» + 1,5·10 <sup>-3</sup> М АТФ	—	0,033	—	—
» + 3,0·10 <sup>-3</sup> М АТФ	—	0,039	—	—
Малат	—	—	0,045	0,023
» + 1,5·10 <sup>-3</sup> М АТФ	—	—	—	0,076
» + 3,0·10 <sup>-3</sup> М АТФ	—	—	—	0,095

Таблица 3

Азотфиксация фотосинтезирующих бактерий в зависимости от восстановителя в присутствии света

Субстрат	Chl. ethylica	Ect. shaposhnikovii
Дитионит	0,033	2,050
Малат	—	0,200
Этанол	0,035	—
Сульфид натрия	0	0,005
Оксалацетат	0,070	0,255
Оксалацетат + сульфид натрия	0,065	0,208
Без субстрата	0	0

Реакцию восстанавливали добавлением к смеси 1 мл концентрированной серной кислоты. Определение N<sup>15</sup> в клетках проводили после сжигания на масс-спектрометре МИ-1305. Результаты выражали избытком ат. % N<sup>15</sup>. Белок определяли по методу Лоури (14).

Из табл. 1 видно, что при наличии использованных в опытах субстратов Chl. ethylica фиксируют N<sub>2</sub> только при освещении, а Ect. shaposhnikovii и в темноте. Однако в присутствии света процесс идет значительно интенсивнее.

При добавлении к реагирующей смеси АТФ клетки Chl. ethylica фиксировали N<sup>15</sup> в темноте с такой же интенсивностью, как на свету, а у Ect. shaposhnikovii азотфиксация в присутствии АТФ происходила в темноте даже с большей интенсивностью, чем при освещении (табл. 2).

В отличие от АТФ, АДФ не стимулировала азотфиксацию Ect. shaposhnikovii в темноте.

Исследование фиксации N<sub>2</sub> в зависимости от характера экзогенного субстрата показало, что кроме органических соединений значительную азотфиксацию обоих видов бактерий обеспечивает дитионит, тогда как сульфид не активен (табл. 3).

Было исследовано также действие на азотфиксацию таких ингибиторов переноса электрона на уровне флавопротеинов, как ротенон и атебрин. Ротенон резко ингибировал этот процесс как у зеленых, так и у пурпурных бактерий в концентрации 10<sup>-4</sup> М, а атебрин полностью подавлял его при концентрации 10<sup>-3</sup> М (табл. 4).

Таким образом, опыты с целыми клетками фотосинтезирующих бактерий подтверждают, что для азотфиксации этим микроорганизмам требуется



Таблица 4

Действие ротенона и атэбрина на азотфиксацию фотосинтезирующих бактерий в присутствии света

Вариант опыта	<i>Chl. ethylica</i> (среда с этанолом)	<i>Ket. shaposhnikovii</i> (среда с малатом)
Без ингибитора	0,037	0,055
Ротенон		
$10^{-5}$ M "	0,037	0,041
$10^{-4}$ M	0,013	0,019
$10^{-3}$ M	0,010	0,015
Атэбрин		
$10^{-5}$ M	0,045	0,071
$10^{-4}$ M	0,037	0,045
$10^{-3}$ M	0	0,005

участвует ферредоксин, присутствие которого установлено у всех исследованных представителей данных микроорганизмов (<sup>12</sup>). Подавление азотфиксации ротеноном и атэбрином свидетельствует об участии в этом процессе флавинов.

Московский государственный университет  
им. М. В. Ломоносова

Поступило  
31 III 1970

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> R. W. F. Hardy, J. D'Eustachio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 4, 314 (1964). <sup>2</sup> A. J. D'Eustachio, R. W. F. Hardy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **15**, 4, 319 (1964). <sup>3</sup> W. A. Bulen, R. C. Burns, J. R. Le Comte, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **53**, 3, 532 (1965). <sup>4</sup> R. W. A. Hardy, R. C. Burns, *Ann. Rev. Biochem.*, **37**, 331 (1968). <sup>5</sup> D. I. Arnon, M. Losada et al., *Nature*, **190**, № 4776, 601 (1961). <sup>6</sup> D. C. Pratt, A. W. Frenkel, *Plant Physiol.*, **34**, 3, 333 (1959). <sup>7</sup> M. D. Kamen, H. Gest, *Science*, **109**, 2840, 560 (1949). <sup>8</sup> E. S. Linstrom, J. W. Newton, P. W. Wilson, *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **38**, 5, 392 (1952). <sup>9</sup> И. Д. Иванов, Н. С. Демина, *Микробиология*, **36**, 1 (1967). <sup>10</sup> Н. В. Захватаева, И. В. Малофеева, Е. Н. Кондратьева, *Микробиология*, **39**, в. 5, 761 (1979). <sup>11</sup> Л. М. Гиподман, В кн.: *Современные методы в биохимии*, М., 1964, стр. 37. <sup>12</sup> L. Vernon, *Bacteriol. Rev.*, **32**, 3, 243 (1968).