

Ю. И. СОРОКИН

**ОБ УЧАСТИИ ФОСФАТА В ХЕМОСИНТЕЗЕ
У СУЛЬФАТВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ БАКТЕРИЙ**

(Представлено академиком В. А. Энгельгардтом 4 XII 1953)

Соединения фосфорной кислоты выполняют в клетке очень важную физиологическую функцию, участвуя в осуществлении энергетической взаимосвязи процессов биологического окисления и биосинтеза (1). Фоглер и Умбрейт (2) привели ряд доказательств в пользу того, что фосфорные соединения участвуют в усвоении CO_2 , служа переносчиком энергии окисления серы при хемосинтезе у автотрофной тиобактерии *Thiobacillus thiooxidans*. Они показали, что окисление серы в клетках этой бактерии сопровождается фосфорилированием, причем энергия окисления серы связывается в процессе окисления в виде органических фосфатов. Во второй стадии процесса в отсутствие окисляемого субстрата (серы) эта энергия может использоваться бактериями для усвоения CO_2 . Подобные же данные, демонстрирующие участие фосфатов в хемосинтезе у водородных бактерий, приводятся в работе М. И. Беляевой (3).

В наших предыдущих работах (4, 5) было установлено, что сульфатвосстанавливающие бактерии способны к усвоению CO_2 за счет энергии анаэробного окисления водорода, протекающего при участии сульфатов по уравнению: $4\text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{S}^{0} + 4\text{H}_2\text{O}$. В настоящем сообщении изложены результаты опытов, в которых изучалось фосфорилирование, сопряженное с анаэробным окислением водорода, с точки зрения возможного участия фосфорных соединений в переносе энергии при хемосинтезе у *Vibrio desulfuricans*.

Объектом исследования служила чистая культура *V. desulfuricans*, выделенная из ила, взятого со дна оз. Байкал с глубины 607 м. Предварительно были проведены опыты с азидом натрия — ферментным ядом, который разрывает связь энергетического и конструктивного обмена путем блокирования окислительного фосфорилирования. Опыты показали, что азид в концентрациях 10^{-3} — 10^{-4} М полностью тормозит размножение *V. desulfuricans*, не тормозя при этом, а даже стимулируя восстановление указанными бактериями сульфатов молекулярным водородом. Из этих данных мы сделали вывод, что фосфорилирование играет важную роль в осуществлении энергетической взаимосвязи водородной редукции сульфатов и хемосинтеза у *V. desulfuricans*. С целью прямого доказательства такого вывода были проведены две серии опытов с применением «меченого» фосфата (P^{32}O_4). Для этого была разработана специальная методика применения «меченого» фосфата для изучения фосфорного обмена во взвешях клеток *V. desulfuricans*.

Сущность этой методики заключалась в следующем. Молодая культура *V. desulfuricans*, выращенная на специальной среде без железа, центрифугировалась. Полученный при этом осадок бактерий промывался повторным центрифугированием и взбалтывался в буферном растворе Na_2SiO_3 , нейтрализованном H_2SO_4 . Взвесь бактерий инкубировалась

в атмосфере водорода в присутствии «меченого» фосфата ($50-75 \cdot 10^3$ имп/мин : мл) и обычного фосфата ($3-4$ γ Р/мл). С целью улучшения газообмена склянки со взвесями взбалтывались на качалке. В конце опыта в клетках определялась активность внутриклеточного органического фосфата. Для этого взвесь клеток фильтровалась через мембранные фильтры и осадок бактерий отмывался от «меченого» неорганического фосфата раствором NaH_2PO_4 , подкисленным 0,5% уксусной кислоты. Отмытые фильтры просчитывались под счетчиком. По величине активности внутриклеточного органического фосфата мы судили о скорости фосфорилирования.

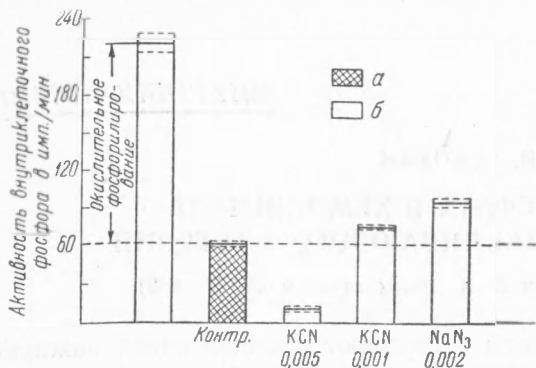


Рис. 1. Окислительное фосфорилирование во взвесьх *V. desulfuricans*. а — атмосфера азота, б — атмосфера водорода, пунктир — активность отдельных фильтров

В опытах с CO_2 взвеси предварительно ставились в термостат на несколько часов для того, чтобы произошло расщепление внутриклеточных органических фосфатов; после этого

клетки повторно отмывались центрифугированием.

В первой серии опытов изучалась зависимость фосфорилирования во взвесьх клеток *V. desulfuricans* от водородной редукции сульфатов и проверялся механизм специфического действия азидов на клетки этого организма.

Зависимость фосфорилирования от водородной редукции сульфатов выяснялась путем сравнения скорости фосфорилирования в атмосфере H_2 и в атмосфере N_2 и путем блокирования водородной редукции сульфатов цианидом.

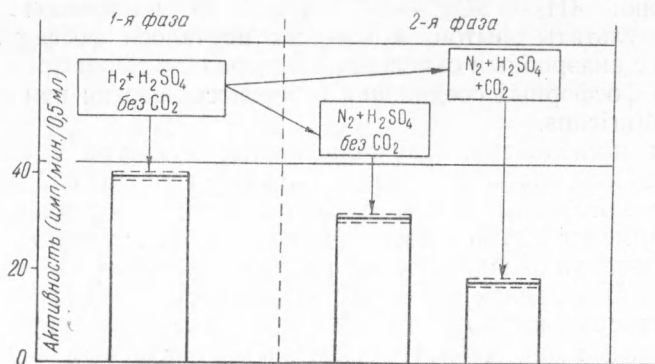


Рис. 2. Влияние CO_2 на фосфорный обмен *V. desulfuricans*. Пунктир — активность отдельных фильтров

Результаты одного из типичных опытов, представленные на графике (см. рис. 1), показывают, что анаэробное окисление водорода за счет сульфатов в клетках *V. desulfuricans* сопровождается интенсивным фосфорилированием. Замена водорода азотом, т. е. исключение окисляемого субстрата, прекращает поступление фосфора в клетки или, иными словами, выключает окислительное фосфорилирование.

Блокирование окисления водорода 0,001 М цианидом почти целиком выключает окислительное фосфорилирование. Более высокая концентра-

ция цианида (0,005 М) убивает клетки и они теряют способность к обменным реакциям, которые ведут к внедрению фосфата в состав клеточных компонентов.

Из данных, представленных на графике, видно также, что окислительное фосфорилирование сильно тормозится азидом натрия. Следовательно, специфическое действие азидов на *V. desulfuricans* связано с его влиянием на фосфорный обмен этого организма.

Таким образом, в первой серии опытов было показано, что в клетках *V. desulfuricans* протекает окислительное фосфорилирование за счет энергии анаэробного окисления водорода кислородом сульфатов.

Для получения данных, показывающих возможность использования энергии окисления водорода, связанной в клетках бактерий при окислительном фосфорилировании в виде органических фосфатов, для усвоения CO_2 была проведена вторая серия опытов. Опыты проводились по схеме, представленной на рис. 2.

Первая фаза опыта соответствовала фазе окислительного фосфорилирования в отсутствие CO_2 , во время которой энергия анаэробного окисления водорода связывалась в бактериальных клетках в виде химической энергии органических фосфатов. Если фосфорные соединения, которые накапливаются в клетках бактерий в первой фазе опыта, участвуют в хемосинтезе, изменения содержания «меченого» фосфата, происходящие во второй фазе опыта, в отсутствие водорода, должны быть неодинаковыми в присутствии и в отсутствие CO_2 , а именно, в этом случае в присутствии CO_2 фосфат должен выходить из клеток в среду вследствие распада органических фосфатов, отдающих свою энергию для усвоения CO_2 . Результаты одного из типичных опытов, приведенные на графике (рис. 2), показывают, что углекислота действительно вызывает резкое дефосфорилирование органического фосфата, накопленного в клетках бактерий во время первой фазы опыта, которое достигает 30—50% от всего фосфора, связанного клетками в процессе окислительного фосфорилирования.

Этот эффект доказывает, что самый процесс хемосинтеза у *V. desulfuricans* может быть разделен на две фазы. Сначала идет окисление водорода кислородом сульфатов и освобождающаяся энергия связывается в органических фосфатах. Во второй фазе идет усвоение CO_2 за счет энергии, накопленной в органических соединениях фосфора.

Результаты наших опытов подтверждают данные других авторов (^{2, 3}) об участии фосфорных соединений в хемосинтезе в качестве переносчиков энергии.

Поступило
4 XI 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. А. Энгельгардт, Изв. АН СССР, сер. биол., № 2 182 (1945).
² К. G. Vogler, W. W. Umbreit, J. Gen. Phys., 27, 157 (1942). ³ М. И. Беляева, Диссертация, М., 1950. ⁴ Ю. И. Сорокин, Тр. Инст. микробиол. АН СССР, 2, 121 (1952). ⁵ Ю. И. Сорокин, ДАН, 90, 897 (1953).