

57
А-26

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ МИКРОБИОЛОГИИ

На правах рукописи

Л. Л. ЛИСЕНКОВА

СРАВНИТЕЛЬНОЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЕ
ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОХРОМОВ ХЕМОАВТОТРОФНЫХ
И ГЕТЕРОТРОФНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук А. Б. ЛОЗИНОВ

Москва—1967

57
A26

Работа выполнена в Институте биохимии и физиологии
микроорганизмов АН СССР

Научный руководитель—кандидат биологических наук
А. Б. ЛОЗНОВ

Дата рассылки автореферата « 15 . сентября » 1967 г.

Защита диссертации состоится в Институте микробиоло-
гии АН СССР в ноябре—январе 1967—1968 г.г.

Адрес института: Москва, Профсоюзная ул., д. 7.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Н. С. ГЕЛЬМАН,

доктор биологических наук Г. А. ЗАВАРЗИН

Работа направлена на отзыв в Институт биологической
физиологии АН СССР.

ВВЕДЕНИЕ

Почти 80 лет прошло со времени открытия С. Н. Виноградским явления хемоавтотрофии, но интерес к хемоавтотрофным микроорганизмам не ослабевает. Эта своеобразная группа бактерий привлекает к себе внимание не только в связи с той ролью, которую играют многие ее представители в круговороте веществ в природе, в геологических и почвенных процессах. Изучение специфики обмена хемоавтотрофов имеет существенное значение для решения ряда общих вопросов сравнительной и эволюционной физиологии и биохимии. Большой интерес с этой точки зрения представляет, в частности, энергетический обмен этих организмов.

Как известно, хемоавтотрофные микроорганизмы характеризуются способностью расти и развиваться, используя в качестве единственного источника углерода углекислоту, которая восстанавливается ими до уровня компонентов клеточного тела за счет энергии, освобождающейся при окислении ряда неорганических веществ.

Для ассимиляции CO_2 необходим постоянный приток энергии в виде АТФ и восстановителя на уровне НАДН₂. Этим определяется одна из существенных особенностей энергетического обмена хемоавтотрофов: согласно имеющимся расчетам они расходуют на биосинтез 1 г клеточного тела в несколько раз больше АТФ, чем гетеротрофные микроорганизмы (Заварзин, 1964; Fischer a. Laudelout, 1965).

Дополнительный (по сравнению с гетеротрофами) расход АТФ у некоторых хемоавтотрофов (нитрифицирующих, тионовых, железобактерий) по-видимому связан и с особенностями окисляемых ими субстратов, окислительно-восстановительный потенциал которых (точнее, систем субстрат/продукт окисления) более положителен, чем редокспотенциал системы НАД/НАДН₂. Очевидно, что никотинамидаде-

294722

Центральная научная
БИБЛИОТЕКА
Академии наук Киргизской ССР

ниновые нуклеотиды не могут восстанавливаться непосредственно такими субстратами, как NH_4^+ , NO_2^- , Fe^{++} , в связи с чем для образования НАДН₂ (путем обратного переноса электронов в дыхательной цепи—см. ниже) требуется дополнительная затрата энергии (Aleem et al., 1963).

Кроме того, из указанной выше особенности окисляемых субстратов следует другой важный вывод. Электроны субстрата с высоким редокспотенциалом должны, очевидно, поступать в цепь переноса электронов (ЦПЭ) на уровне ее компонентов, обладающих более высоким потенциалом, чем система НАД/НАДН₂. ЦПЭ в данном случае будет укороченной, а возможное число фосфорилирований в ней—уменьшенным.

Отмеченные выше особенности энергетического обмена должны создавать определенную «напряженность» в работе дыхательной цепи ряда хемоавтотрофных бактерий и очевидно не могут не отражаться на ее структуре.

В связи с этим несомненный интерес представляют появившиеся в последние годы в литературе отдельные сообщения о необычно высоком содержании цитохрома *c* у некоторых хемоавтотрофных бактерий (Заварзин, 1959; Лозинов, Ермаченко, 1960; Aubert et al., 1958; Vernon et al., 1960). Приводимые цифры (1—3,5% цитохрома *c* от сухого веса бактерий) превышают по-видимому во много раз соответствующие величины известные для гетеротрофных микроорганизмов. Однако сведения имеющиеся в литературе о количестве цитохромов не только у хемоавтотрофных, но и у гетеротрофных микроорганизмов настолько отрывочны и ограничены, что не дают возможности делать достаточно обоснованные выводы, тем более, что результаты получены различными методами.

В связи с изложенным, целью настоящей работы являлось сравнительное количественное изучение цитохромов по единой методике у представителей важнейших групп хемоавтотрофных бактерий и большого числа гетеротрофных микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методы исследования

Работа проводилась с чистыми культурами хемоавтотрофных бактерий *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrosomonas europaea*, *Th. ferrooxidans*, *Th. thiooxidans*, *Hydrogenomonas Z-13* (неидентифицированный штамм) и *Th. 70 S* (Заварзин, Жилина, 1964).

Большая часть изучавшихся гетеротрофных микроорганизмов принадлежала к родам *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Bacillus*. Некоторые из них указаны в разделе Б и В табл. 1 и в табл. 3. Выращивание почти всех изучавшихся микроорганизмов проводилось при $t^\circ = 28-30^\circ$.

Культивирование хемоавтотрофных бактерий осуществлялось в колбах объемом на 1—5 л с 0,5—3,0 л среды, аэрируемой на качалке (140—160 об/мин) или продуванием воздуха. Используемые для выращивания этих бактерий синтетические среды указаны в табл. 1. В среду для *Nitrobacter* и *Th. ferrooxidans* окисляемый субстрат добавлялся порциями по мере его окисления.

Большинство гетеротрофных бактерий выращивалось на мясо-пептонном бульоне с 1% глюкозы в эрленмейеровских колбах объемом на 250 мл с 50 мл среды. Аэрация проводилась встряхиванием колб на качалке при 140—160 об/мин. В ряде случаев бактерии рода *Pseudomonas* культивировали на синтетической среде следующего состава (в г на 1 л дистиллированной воды): $\text{MnSO}_4-0,005$; $\text{ZnSO}_4-0,005$; дрожжевой автолизат—3 мл; $\text{K}_2\text{HPO}_4-0,5$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}-0,2$; $\text{NaCl}-0,2$; мочевины—0,2; глюкоза—10; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}-0,01$; *Acetobacter suboxydans* выращивали на дрожжевой воде с 10% сорбита, а *Acetobacter aceti*—на синтетической среде Лойцянской (1959). *Азотобактер* культивировали на синтетической среде Бэрка с сернокислым аммонием или без него. Дрожжи выращивали на среде Ридера.

Чистота культур микроорганизмов проверялась путем их посева на МПА, с/а, к/а, а также микроскопированием. В случае хемоавтотрофных бактерий проводилась дополнительная проверка на специализированных средах для обнаружения сопутствующей микрофлоры.

В работе использовались следующие биохимические и физикохимические методы анализа. Белок определяли в клеточной суспензии по биуретовому методу Ля-Ривьера с модификацией Вильде (Wilde, 1962); сухой вес бактерий—взвешиванием клеток после доведения их до постоянного веса; сульфаты—комплексометрическим титрованием избыточного BaCl_2 трилоном Б по эриохрому Т; тиосульфат—иодометрическим титрованием в присутствии крахмала; Fe^{+++} —титрованием пробы раствором KMnO_4 в кислой среде. Поглощение кислорода измеряли по методу Варбурга. Мутность клеточных суспензий определялась на ФЭК П-56 с фильтром № 11 в кюветах с длиной оптического пути равной 1 мм.

Качественный состав цитохромной системы изучали на спектрофотометре СФ-10 при обычной температуре и температуре жидкого азота. Количественно цитохромы определяли в суспензиях интактных клеток на дифференциальном спектрофотометре типа приборов Чанса (Борисов, Мохова, 1964).

Автор приносит глубокую благодарность канд. физ. мат. наук Е. Н. Моховой за помощь и предоставленную возможность работать на этом приборе.

Восстановление НАД в реакциях обратного переноса электронов в дыхательной цепи бактерий регистрировалось на флуориметре, сконструированном на кафедре биохимии животных МГУ (Виноградов, Евтодненко, 1965). В опытах использовались НАД марки Serva (чистота 99%) и АТФ фирмы Reanal (чистота 95%).

Клетки микроорганизмов разрушали с помощью дезинтегратора высокого давления, сконструированном в Институте микробиологии АН СССР и в ультразвуковом дезинтеграторе системы MSE при частоте колебаний 20 кгц.

Разработка методики количественного спектрофотометрического определения цитохромов в суспензиях микроорганизмов

В связи с тем, что описанные в литературе методы оказались мало пригодными для изучения содержания цитохромов в клетках различных микроорганизмов, одной из основных задач данной работы являлась разработка методики количественного определения цитохромов, приемлемой для таких сравнительных исследований.

Так как полное выделение цитохромов из бактериальных клеток практически не осуществимо, то наиболее подходящим методом определения содержания цитохромов является их спектрофотометрическое определение непосредственно в клеточных суспензиях.

Спектрофотометрическое определение количества вещества в растворе, как известно, основывается на законе Буггера

Ламберта-Бера согласно которому $C = \frac{D_\lambda}{\epsilon_\lambda l}$ (I), где

C — концентрация поглощающего вещества, D_λ — оптическая плотность при длине волны λ , ϵ — коэффициент молярной экстинкции поглощающего вещества, l — длина оптического пути в растворе.

При определении цитохромов, в частности цитохрома c , может быть использовано и другое соотношение:

$C = \frac{\Delta D_\alpha}{\epsilon_\alpha l}$ (II), где ΔD_α — разность между оптической плотностью

в максимуме поглощения при 550 мкм (α -полоса восстановленного цитохрома c) и в соответствующем минимуме поглощения (при 540 мкм), т. е. $\Delta D_\alpha = D_{550} - D_{540}$. Как видно из соотношений (I) и (II) величины D_λ и ΔD_α пропорциональны концентрации поглощающего вещества, что и делает возможным определение его содержания.

При количественном определении веществ в клеточных суспензиях также пользуются приведенными выше соотношениями. Однако в таких неоднородных, мутных средах на поглощение вещества влияет целый ряд факторов, например, рассеяние света, неравномерное распределение исследуемого вещества в клетке и т. д., в связи с чем пропорциональность между концентрацией вещества и оптической плотностью может резко нарушаться.

До сих пор задача количественного определения поглощающих веществ в мутных средах в общем виде не решена. Но экспериментально возможно определить условия, при которых наблюдается относительно небольшая ошибка определения и выяснить ее величину.

Для таких биологических объектов, как сердечно-мышечный гомогенат, суспензии водорослей, эритроцитов, оценивалось влияние мутности и предлагались полуэмпирические формулы расчета концентрации для содержащихся в них пигментов (Сидько, Терсков, 1961; Duysens, 1956; Chance, 1952). Однако нам не удалось найти в литературе аналогичных данных по оценке ошибок при определении количества цитохромов в бактериальных суспензиях.

В связи с вышесказанным, при разработке методики определения содержания цитохромов в суспензиях микроорганизмов нашей задачей являлось: 1) выбрать условия эксперимента, позволяющие определять количество цитохромов с наименьшей ошибкой; 2) оценить, как влияет на поглощение внутриклеточных цитохромов рассеяние света.

Определение величины ΔD_α

Обычно концентрацию цитохромов в мутных суспензиях определяют по дифференциальному спектру (Chance, 1952).

При этом в одной из кювет находится суспензия клеток с восстановленными цитохромами, а в кювету сравнения помещается та же суспензия с окисленными цитохромами.

Однако опыт нашей работы показал, что добиться полного окисления цитохромов в суспензиях интактных клеток большинства бактерий трудно. Поэтому в кювету сравнения вместо суспензии клеток с окисленными цитохромами помещался специально подобранный непоглощающий рассеиватель (суспензия SiO_2 в воде), а в другой кювете цитохромы восстанавливались гидросульфитом (0,5 мг на мл суспензии).

Количество цитохромов определялось по величине ΔD_α , но в расчет были внесены некоторые изменения. При работе с суспензиями имеет место некоторое искажение спектра,

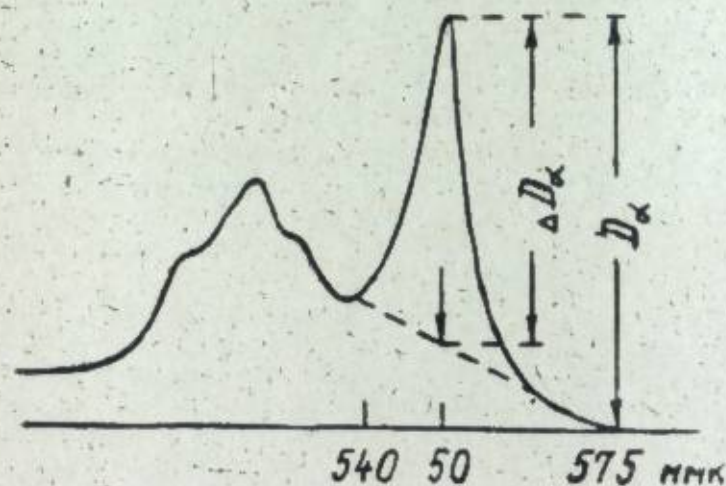


Рис. 1. Определение величины ΔD_α и коэффициента молярной экстинкции по спектру поглощения восстановленного животного цитохрома с

вызываемое в частности различным влиянием светорассеяния на оптическую плотность в области длинных и коротких волн. В связи с этим при определении ΔD_α для цитохрома с учитывались два минимума—при 540 мк и при 575 мк (Chance, 1954); величина ΔD_{550} определялась по отрезку ординаты, заключенному между максимумом поглощения при 550 мк и прямой, соединяющей минимумы при 540 и 575 мк (рис. 1). Аналогичным образом и по тем же минимумам определялась величина ΔD_α для цитохрома в (макси-

мум поглощения при 560 мк). Величина ΔD_α для цитохромов типа а определялась так же по двум минимумам, прилежащим к соответствующим пикам.

Ошибка определения ΔD_α в бактериальных суспензиях связанная с нестабильностью регистрации оптической плотности на использовавшемся нами приборе составляла $\pm 7\%$.

Так как для подавляющего большинства бактериальных цитохромов величина коэффициента молярной экстинкции (ϵ) не известна, то для расчета абсолютного количества цитохромов использовались экстинкции восстановленных животных цитохромов. Но эти коэффициенты были пересчитаны в соответствии с нашим методом расчета величины ΔD_α (см. рис. 1); ϵ (в максимуме α -полосы) после пересчета имели значения 24,0, 17,8, 14,0 ед. опт. плотности для цитохромов типа с, в и а соответственно (Лисенкова, Лозинов, 1966).

Оценка ошибок, связанных с влиянием рассеяния света, при количественном определении цитохромов в бактериальных суспензиях

Для выяснения величины этих ошибок было проведено сравнение значений ΔD_α цитохрома с суспензий интактных клеток и ΔD_α тех же суспензий, но после резкого снижения их мутности путем разрушения клеток с помощью дезинтегратора высокого давления. Опыты проводились на двух культурах *Ps fluorescens* и *Torula utilis*.

На рис. 2 показана зависимость ΔD_α суспензий целых (кривая 1) и разрушенных (кривая 2) клеток от их концентрации. Из рисунка видно, что кривая 2 проходит через начало координат и имеет линейный характер. Иными словами, в суспензиях разрушенных клеток сохраняется прямая пропорциональность между ΔD_α и концентрацией суспензии (а, следовательно, и количеством цитохрома). Оказалось далее, что при внесении в такие суспензии раствора животного цитохрома с известной концентрации, он может быть количественно определен по ΔD_{550} с ошибкой не превышающей 0—10%. Таким образом, кривая 2 с достаточным основанием может рассматриваться как контрольная при определении количества цитохрома в суспензиях интактных клеток.

Кривая 1 на некотором участке почти совпадает с кривой 2, но затем начинает отклоняться от последней. Величина этого отклонения, очевидно, и будет характеризовать ошибку

(связанную с влиянием рассеяния) при определении количества цитохрома в суспензиях интактных клеток. Величина ошибки в % выразится соотношением

$$\frac{\Delta D_x^I - \Delta D_x^{II}}{\Delta D_x^{II}} \cdot 100,$$

где величины ΔD_x^I и ΔD_x^{II} относятся соответственно к суспензиям целых и разрушенных клеток.

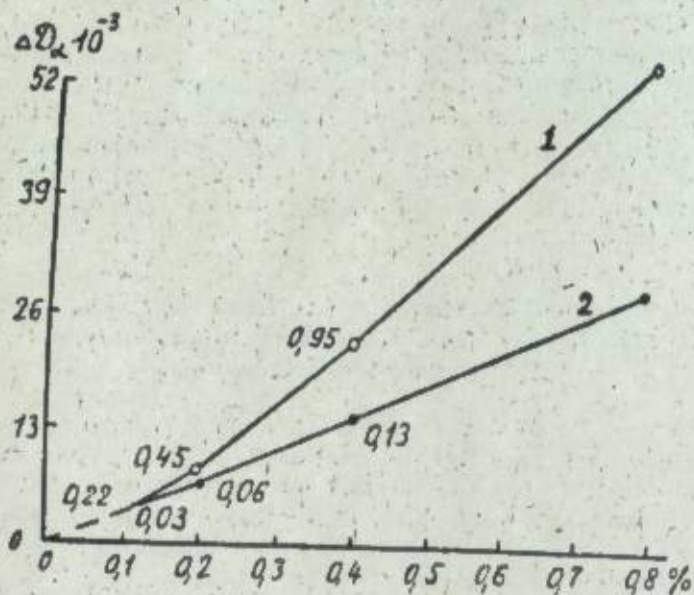


Рис. 2. Зависимость ΔD_x целых и разрушенных клеток от концентрации суспензии *Ps. fluorescens*. 1—интактные клетки; 2—разрушенные клетки. Цифры на кривых—величина мутности суспензии. По оси абсцисс—концентрация суспензий в % на сухой вес

Из представленных данных видно, что в суспензиях с низкой концентрацией интактных клеток (0,1—0,2%) количество цитохрома может быть определено по ΔD_x с относительно небольшой ошибкой, однако при дальнейшем увеличении концентраций суспензии величина ошибки резко возрастает.

Найденная зависимость подтвердилась и в опытах с добавлением раствора животного цитохрома к суспензиям интактных клеток *Torula utilis* и *Ps. fluorescens*. При добавлении цитохрома к суспензиям с низкой концентрацией клеток (до 0,2%) ошибка его определения не превышала 10%. Но она резко возрастала при определении количества

цитохрома в суспензиях с более высокой концентрацией клеток.

Данные, полученные первоначально для двух микроорганизмов, были проверены на суспензиях других бактерий. Эти опыты показали следующее:

1) для суспензий с концентрацией клеток до 0,1% (по сухому весу) ошибка определений как правило не превышает 10—15%; для суспензий с концентрацией клеток до 0,2% ошибка может доходить до 30%;

2) во всех случаях для суспензий интактных клеток были получены завышенные значения ΔD_x , что, по-видимому, связано с влиянием многократного рассеяния света, при котором происходит удлинение оптического пути луча;

3) найдено, что ошибки определения для цитохромов типа *b* и *a* близки по величине приводимым выше ошибкам для цитохромов типа *c*.

Совокупность приведенных данных позволяет сделать вывод о возможности определения концентрации цитохрома по ΔD_x в клеточных суспензиях незначительной мутности с относительно невысокой ошибкой, связанной с рассеянием света.

Следует отметить однако, что при такого рода измерениях ошибки могут возникать и по другим причинам, например, вследствие перекрытия полос поглощения исследуемого цитохрома с полосами других цитохромов и пигментов. Сведения о величине ошибок подобного рода в литературе практически отсутствуют, за исключением отдельных указаний (Williams, 1964; White, 1965).

Ошибки могут возникать и вследствие использования при расчетах количества бактериальных цитохромов величин ϵ животных цитохромов. Однако имеющиеся в литературе данные показывают, что если в молекуле бактериальных цитохромов содержится один гем, то величины их ϵ близки к таковым для животных цитохромов. (Tissieres, 1956; Ambler, 1963; Horio et al., 1960; Yonofani, 1965; Aubert et al., 1958).

Что касается влияния на спектр поглощения связи цитохрома в структурных комплексах клетки, то опыты по частичному выделению цитохрома с из разрушенных клеток *Torula utilis* и *Ps. fluorescens* и последующему сравнению поглощения цитохрома, находящегося в связанной форме и в растворе, показали, что этот фактор не влияет на определение количества цитохрома.

Сравнительное определение количества цитохромов хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов

Для получения по возможности сопоставимых результатов при сравнительном определении содержания цитохромов соблюдались следующие условия:

1. Все изучавшиеся микроорганизмы выращивались на жидких средах, рекомендованных в литературе как оптимальные для соответствующих видов (см. табл. 1).

2. Культивирование проводилось в условиях непрерывной аэрации при температуре 28—30°.

3. Для определения содержания цитохромов клетки собирались в конце логарифмической фазы или в начале фазы замедленного роста, т. е. в период, когда изменение условий, приводящих к переходу культуры в стационарную фазу, еще не оказывало существенного влияния на микроорганизмы.

4. Определение содержания цитохромов в интактных клетках микроорганизмов проводилось по единой методике. Использовались суспензии с минимальной, допустимой методом, концентрацией клеток—от 0,025% до 0,2% по сухому весу, что позволило определить количество цитохромов у хемоавтотрофных бактерий с ошибкой, не превышающей 10—15%, а у гетеротрофных микроорганизмов—15—30%.

Цитохромы хемоавтотрофных бактерий

Для опытов были взяты представители основных физиологических групп хемоавтотрофных бактерий (табл. 1, раздел А), а именно бактерии, окисляющие NH_4^+ , NO_2^- , Fe^{++} , $\text{S}_2\text{O}_3^{--}$, S^0 , H_2 . Результаты качественного и количественного определения цитохромов приведены в табл. 1.

Количество цитохромов, указанное в таблице, является средним из данных 3—4-х опытов, проводившихся при указанных выше условиях.

Качественный состав цитохромной системы изучался как при обычной температуре, так и при температуре жидкого азота (см., например, рис. 3). У всех изученных бактерий обнаружены цитохромы типа *a*, *c*; у *Th. ferrooxidans*, *Th. thiooxidans* и *H. Z-13* найден также цитохром типа *b*. У исследованных штаммов *Nitrosomonas*, *Th. 70 S* цитохром *b* не был обнаружен даже на низкотемпературном спектре.

12

Вопрос о наличии цитохрома *b* у *Nitrobacter* остается неясным.

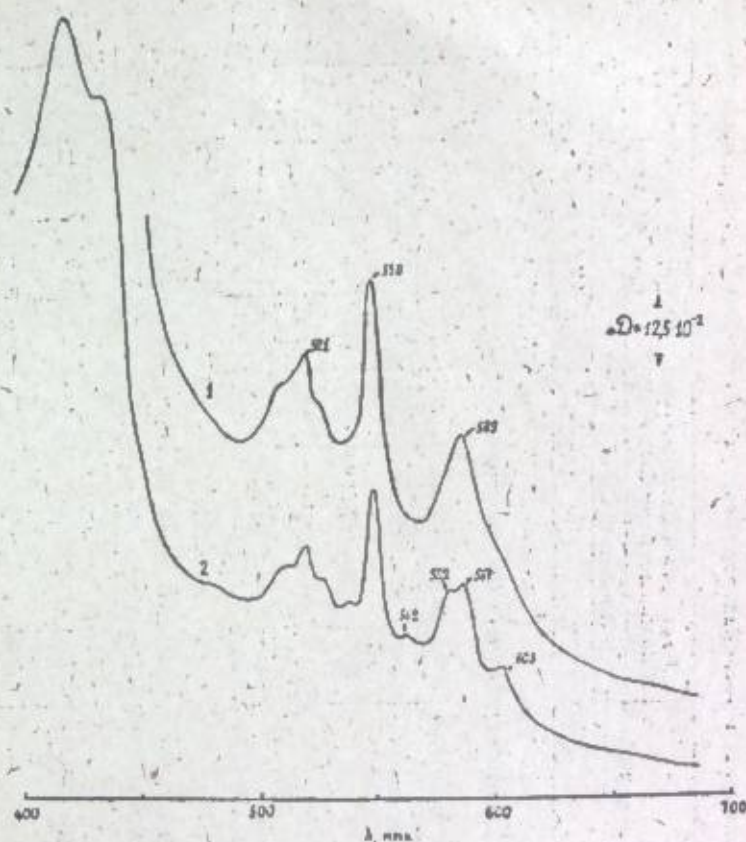


Рис. 3. Спектры клеточной суспензии *Nitrobacter*, снятые на спектрофотометре СФ-10. 1—спектр при обычной температуре. Клетки выращены на среде Виноградского. 2—низкотемпературный спектр тех же клеток. Цифры возле кривых—длины волн в мкм.

Цитохромы гетеротрофных бактерий

В целях сравнения были проведены количественные определения цитохромов у большого числа гетеротрофных микроорганизмов (как отмечалось выше, имеющиеся в литературе данные о содержании цитохромов у последних крайне ограничены). В общей сложности было изучено около 100 видов и штаммов аэробных и факультативно аэробных бактерналь-

13

Сравнение количества пихтозиев у хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов

| Микроорганизмы | Среды | Максимум поглощения α-волос пихтозиев, мкг | | | | Колич. пихтозиев в мМ × 10 ⁻⁴ на 1 мг белка на 1 мг сух. веса | | | |
|---|--|--|-------------------|------------|-------------------|--|------------------------|--|--------------|
| | | типы автотрофов | | | | типы пихтозиев | | | |
| | | с | в | а | д | с | в | а | д |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> <i>Nitrobacter winogradskyi</i> <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> | Скверы и Уокера Виноградского Сальстермана | 552 | не обнаружено | 598 | 57 | 3,4 | 4,1 | — | 2,7 |
| | | 550 | не обнаружено | 589 | 36 | 3,2 | 2,2 | — | 3,2 |
| | | 551 | 562 | 595 | 24 | 1,8 | 1,5 | 4,7 | 1,1 |
| | | 552 | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Thiobacillus</i> 70 S | Этого | 552 | не обнаружено | 610 | 10 | 0,21 | 0,0 | — | 0,12 |
| <i>Thiobacillus thiooxidans</i> | Васманна | 551 | 562 | 619 | 6,6 | — | — | — | — |
| <i>Hydrogenomonas</i> Z-13 <i>Hydrogenomonas</i> Z-13 | Шлегеля МПБ+1% глюкозы | 552 551 551 | 564 564 564 | 615 605 | 1,3 3,6 1,7 | 1,1 3,8 1,5 | 0,47 <0,14 <0,14 | 0,82 не определено не определено | 0,65 0,29 |

А. Хемоавтотрофные микроорганизмы

Б. Гетеротрофные микроорганизмы с наиболее высоким содержанием пихтозиев (> 1,0 × 10⁻⁴ мМ пихтозиев с на 1 мг сухого веса)

| | | | | | | | | | | |
|--|----------------|---------|---------|-----|-----|-----|-------|-----|------|-------|
| <i>Pseudomonas fluorescens</i> № 54 <i>Pseudomonas desmolyticum</i> | МПБ+1% глюкозы | 550—552 | 561—562 | 610 | 1,7 | 1,2 | 0,14 | 1,0 | 0,79 | 0,08 |
| | То же | 550—551 | 560 | 600 | 2,4 | 1,6 | <0,14 | 1,7 | 1,5 | <0,08 |

| | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|------|-------|
| <i>Pseudomonas solantricens</i> | . | 550 | 560 | 600 | 1,8 | 2,0 | <0,14 | 1,1 | 1,2 | <0,08 |
| <i>Bac. circulans</i> | . | 550 | 562 | 615 | 7,7 | 6,3 | 0,7 | 4,6 | 3,8 | 0,42 |
| <i>Bac. steatothermophiles</i> | . | 550 | 562 | 615 | 7,0 | 4,0 | 0,91 | 4,2 | 2,4 | 0,56 |
| <i>Acetobacter suboxydans</i> | Дрожжевая вода + 10% сорбита | 552 | 563 | 580 | 2,9 | 1,9 | <0,14 | 1,4 | 0,96 | <0,08 |
| <i>Aerobacter vinelandii</i> | Среда Берка без азота | 551 | 560 | 630 | 3,2 | 3,1 | 1,1 | 1,6 | 1,5 | 0,6 |
| . | Среда Берка с азотом | 551 | 560 | 630 | 2,2 | 1,7 | 0,3 | 1,1 | 0,9 | 0,15 |

В. Гетеротрофные микроорганизмы со средним содержанием пихтозиев с — (0,1 — 0,5) × 10⁻⁴ мМ на 1 мг сухого веса

| Бактериальные организмы | МПБ+1% глюкозы | Максимум поглощения в области α-волосы пихтозиев типа | | | | не определено | | | |
|---|----------------|---|-----|-----|-----|---------------|---------|---------|---------|
| | | с | | | | | | | |
| | | с | в | а | д | | | | |
| Дрожжи (<i>Kloeckera africana</i> , <i>Torula utilis</i> , <i>Debaryomyces globosus</i> , <i>Saccharom. cerevisiae</i>) | Разера | 550 | 563 | 615 | 615 | 0,1—0,2 | 0,1—0,2 | 0,1—0,1 | 0,1—0,1 |
| | | | | | | 0,5 | 0,7 | 0,2 | 0,17 |

ных организмов (относящихся, в основном, к родам *Pseudomonas*, *Bacterium*, *Bacillus*), а также несколько видов дрожжей. Типичный спектр одной из культур рода *Pseudomonas*, снятый на дифференциальном спектрофотометре, показан на рис. 4.

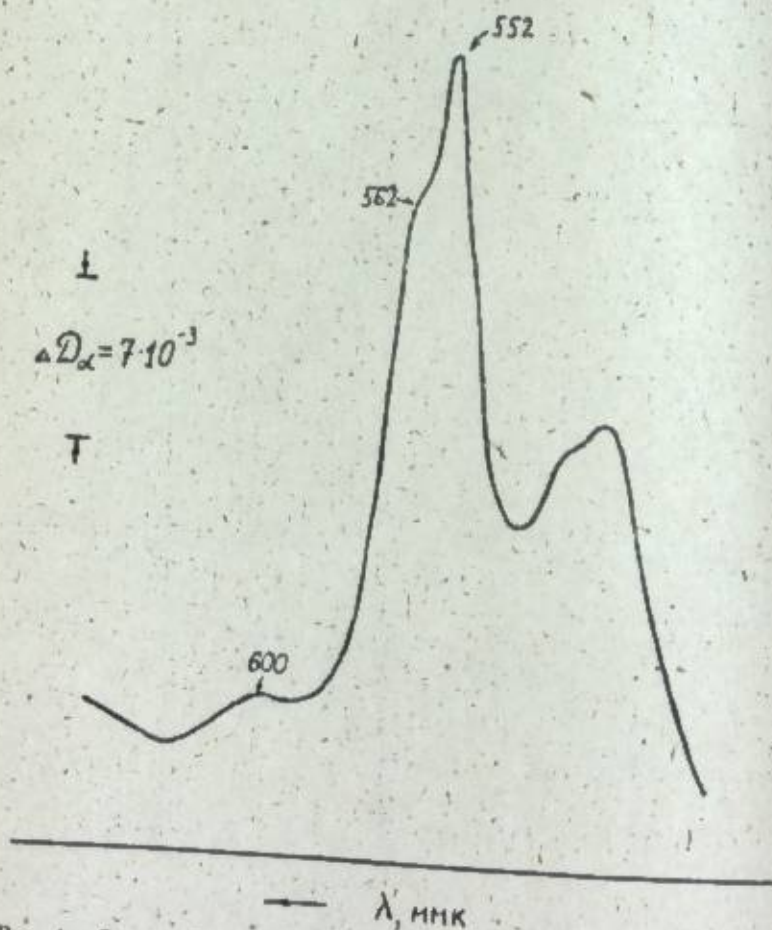


Рис. 4. Спектр 0,4%-ой суспензии клеток *P. fluorescens*, снятый на дифференциальном спектрофотометре. Цифры возле кривых—длины волны в мμ.

Данные о составе и содержании цитохромов у гетеротрофных микроорганизмов приведены в табл. 1, разд. Б и В. Представленные цифры являются средними из 2—3 опытов, проводившихся при указанных, выше условиях (за исклю-

чением термофильных организмов *Bac. circulans* и *Bac. stearothermophilus*, которые выращивались при 65°).

У большинства изученных форм количество цитохромов типов *c* и *a* (на мг сухого веса) лежало в пределах $(0,1—0,7) \times 10^{-4}$ мкМ, а цитохромов типа *a*— $(0,1—0,2) \times 10^{-4}$ мкМ. Однако среди гетеротрофов были обнаружены организмы содержание цитохромов у которых значительно превышало указанные величины. Среди них оказались представители рода *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Azotobacter* и термофильные бактерии (разд. Б, табл. 1).

Все рассмотренные выше опыты ставились при описанных стандартных условиях. Однако в литературе неоднократно сообщалось, что количество цитохромов у микроорганизмов может существенно меняться в зависимости от условий их культивирования. В связи с этим, с целью выяснения возможных пределов, в которых изменяется содержание цитохромов, и с хемоавтотрофными, и с гетеротрофными бактериями проводились дополнительные опыты, в которых варьировались состав среды, условия аэрации и фаза роста, в которую клетки собирались для анализа. Результаты некоторых типичных опытов приведены в табл. 2, 3.

Результаты опытов, представленных в табл. 2, 3, а также данные, полученные в других аналогичных опытах, показы-

Таблица 2

Изменение содержания цитохромов в клетках *Th. thiooxidans* в зависимости от фазы роста и условий аэрации культуры

| № опытов | Фаза роста | Колбы на качалке | | Неподвижные колбы | |
|----------|------------------------|---|----------|-------------------|----------|
| | | содержание цитохромов — (мкМ $\times 10^{-4}$ на 1 мг белка) | | | |
| | | цитохромов типа: | | | |
| | | <i>c</i> | <i>a</i> | <i>c</i> | <i>a</i> |
| 1 | Начало логарифмической | 0,42 | 0,68 | — | — |
| | Конец логарифмической | 0,54 | 1,0 | 0,4 | 0,68 |
| | Начало стационарной | 0,4 | 0,68 | 0,18 | 0,32 |
| 2 | Конец логарифмической | 0,55 | 0,96 | 0,5 | 0,79 |
| | Начало стационарной | 0,31 | 0,9 | 0,33 | 0,33 |
| 3 | Фаза замедления роста | 0,5 | 1,0 | 0,46 | 0,62 |
| | Начало стационарной | 0,4 | 1,0 | 0,4 | 0,54 |

Изменение содержания цитохромов в зависимости от условий аэрации и состава среды

| Микроорганизмы | Среда | Условия культивирования | | | | | |
|---------------------|--|---|--------|--------------------|--------|--------|--------|
| | | колоты на качалке | | неподвижные колоды | | матрац | |
| | | количество цитохромов ($\mu\text{KM} \times 10^{-4}$ на мг сухого веса) | | | | | |
| | | цит. с | цит. в | цит. с | цит. в | цит. с | цит. в |
| Ps. fluorescens № 7 | МПБ с глюкозой Синтетическая МПА | 1,4 | 1,3 | 0,7 | 0,69 | — | — |
| | | 0,7 | 0,68 | 0,8 | 0,7 | — | — |
| Ps. nonliquefaciens | МПБ с глюкозой Синтетическая МПА | 1,4 | 1,6 | 0,4 | 0,5 | — | — |
| | | 0,7 | 0,8 | 0,96 | 1,1 | — | — |
| Ps. species | МПБ с глюкозой Синтетическая МПА | 0,67 | 0,68 | 0,4 | 0,47 | — | — |
| | | 0,33 | 0,34 | 0,38 | 0,41 | — | — |
| Ps. fluorescens № 3 | МПБ с глюкозой Синтетическая | 1,0 | 1,1 | 0,7 | 0,79 | — | — |
| | | 0,7 | 0,70 | 0,96 | 1,2 | — | — |

вают, что количество цитохромов хотя и меняется в зависимости от ряда условий, однако порядок величин остается тем же и соответствует данным, представленным в табл. 1. Очевидно последние достаточно точно отражают содержание цитохромов характерное для нормально разливающихся культур.

Сравнение цитохромов хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов

Сопоставление данных, представленных в табл. 1, позволяет сделать следующие выводы:

1. Хемоавтотрофные бактерии отличаются высоким содержанием цитохрома с. По количеству этого цитохрома исследованные нами культуры этих бактерий отчетливо делятся на две группы. Наиболее высокое его количество $(57-24) \times 10^{-4}$ μKM на мг белка содержат бактерии, окисляющие аммоний, нитриты и закисное железо. Ни у одного из гетеротрофных микроорганизмов ни по нашим, ни по литературным данным не было найдено такого высокого содержания цитохрома с. Даже митохондрии животных, дрожжей и частицы ЦПЭ бактерий содержат в несколько раз меньше цитохрома. У гетеротрофов со средним содержанием цитохрома в 50—140 раз его меньше, чем у этих хемоавтотрофов.

Ко второй группе относятся хемоавтотрофы, окисляющие серу и водород, количество цитохрома с у которых составляет $(1,3-3,6) \times 10^{-4}$ μKM на мг белка, т. е. одного порядка с гетеротрофами, содержащими наиболее высокое количество цитохрома с, но выше, чем у гетеротрофов со средним содержанием цитохрома.

Промежуточное положение между этими двумя группами среди хемоавтотрофов занимает Th. 70 S, содержащий $(6,6-10) \times 10^{-4}$ μKM цитохрома с на мг белка.

Большинство обследованных гетеротрофных микроорганизмов содержали $(0,1-0,5) \times 10^{-4}$ μKM цитохрома с на мг сухого веса и по сравнению с ними все исследованные хемоавтотрофы обладали резко повышенным количеством цитохрома с.

2. Содержание цитохрома типа в у хемоавтотрофных бактерий, в которых он найден (Th. thiooxidans, Th. ferrooxidans, Hydrogenomonas Z-13), сравнимо с его количеством у гетеротрофов, богатых цитохромом. У железобактерий и водородных бактерий содержание этого цитохрома в 5—10 раз выше,

чем у большинства гетеротрофных микроорганизмов (таблица, раздел В).

3. Среди хемоавтотрофов наблюдаются большие различия в содержании цитохрома типа *a* у разных видов (от 0,14 до 52 мкМ на мг белка). У таких хемоавтотрофов, как *Nitrobacter*, *Th. ferrooxidans*, *Nitrosomonas*, количество его резко повышено по сравнению с гетеротрофными формами. В отличие от вышеперечисленных видов содержание цитохрома типа *a* у *Th. 70S* и *Hydrogenomonas Z-13* близко к его количеству, характерному для большинства гетеротрофных микроорганизмов.

4. В заключение следует отметить, что, несмотря на значительную вариабельность цитохромов у микроорганизмов от вида к виду (наблюдались колебания цитохрома *c* в 50 раз), верхний предел в содержании цитохромов у гетеротрофных микроорганизмов не превышал уровня, указанного для наиболее богатых ими бактерий (таблица, раздел Б).

Все эти данные, а также данные, имеющиеся в литературе позволяют заключить, что большинство (если не все) хемоавтотрофных бактерий имеют повышенное содержание цитохромов по сравнению с обычными гетеротрофными микроорганизмами.

Этот вывод подтверждается данными, показывающими, что при выращивании в органической среде ранее культивированного в автотрофных условиях *Hydrogenomonas Z-13* количество цитохромов *c* и *a* уменьшалось более, чем в два раза, (см. табл. 1). Относительно серной бактерии, факультативного автотрофа, *Th. novellus*, было сообщено (Aleem, 1965), что количество цитохромов в клетках, выращенных в гетеротрофных условиях, уменьшалось более чем на 90% по сравнению с автотрофно выращенными клетками, т. е. приблизительно в 10 раз.

Сравнение интенсивности дыхания у ряда хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов

Наиболее естественное объяснение высокого содержания цитохромов у хемоавтотрофных бактерий по сравнению с гетеротрофными формами состоит в том, что они нуждаются в дополнительном расходе энергии (на восстановление CO_2 и, в ряде случаев, НАД—см. ниже) и, чтобы обеспечить необходимую скорость образования АТФ, должны иметь повышенную интенсивность окислительных процессов и более

мощную дыхательную цепь. В связи с этим мы попытались сопоставить интенсивность потребления кислорода (Q_{O_2}) хемоавтотрофными и гетеротрофными микроорганизмами.

Для этой цели были использованы как собственные, так и литературные данные (Винберг, 1946; Гузалус и Шустер, 1963; Bishop et al., 1962; Trudinger, 1961, 1964; и др.) по определению скорости дыхания манометрическим методом у сравниваемых групп микроорганизмов. Мы определяли величину Q_{O_2} у *Nitrobacter winogradskyi*, *Th. 70S*, *Th. thiooxidans*, *Th. ferrooxidans* и у некоторых гетеротрофных бактерий.

В таблице 4 сопоставлены полученные величины Q_{O_2} с количеством цитохромов в клетках ряда хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов. Для одних и тех же бактерий определялась скорость дыхания и количество цитохромов.

Таблица 4

Соотношение интенсивности дыхания (Q_{O_2}) и количества цитохромов у ряда хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов

| Микроорганизмы | Q_{O_2} в мкМ на мг су- хого веса в час. | Количество цитохромов в мкМ $\times 10^{-3}$ на мг сухого веса | | | |
|---|--|---|------|------|---------------------------------------|
| | | цитохромы типа | | | суммарное количество цитохромов |
| | | c (+ c ₁) | b | a | |
| <i>Bac. subtilis</i> | 54 | 0,23 | 0,40 | 0,20 | 0,83 |
| <i>Bac. megaterium</i> | 80 | 0,43 | 0,32 | 0,30 | 1,1 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 55*** | 0,50 | 0,50 | 0,30 | 1,3 |
| <i>Az. vinelandii</i> | 700* | 3,2 | 3,1 | 1,1 | 7,4 |
| <i>Ac. suboxydans</i> | 980 | 1,4 | 0,96 | 0,08 | 2,4 |
| <i>Ps. fluorescens</i> | 310 | 0,96 | 0,79 | 0,08 | 1,8 |
| <i>Ach. venosum</i> | 360 | 0,91 | 0,94 | 0,08 | 1,9 |
| <i>Nitrosomonas europaea</i> | 350** | 43 | — | 2,7 | 46 |
| <i>Nitrobacter winogradskyi</i> | 410 | 22 | — | 32 | 54 |
| <i>Th. ferrooxidans</i> | 1350 | 15 | 4,7 | 11 | 31 |
| <i>Th. 70S</i> | 520 | 4,9 | — | 0,12 | 5,0 |
| <i>Th. thiooxidans</i> | 150 | 0,82 | 0,65 | 0,29 | 1,8 |

* Хмель, личное сообщение.

** Ермаченко, 1966.

*** Лирова, Иерусалимский, 1966.

Полученные нами результаты, а также литературные данные, показали, что хемоавтотрофные бактерии действительно имеют повышенную интенсивность дыхания (Q_{O_2} — от 150 до 1350 мкл) по сравнению со многими гетеротрофными микроорганизмами. Однако эти различия далеко не так велики, как различия в содержании цитохромов. Более того, встречаются гетеротрофы (например, рода *Azotobacter*, *Acetobacter*), интенсивность дыхания которых даже выше, чем у хемоавтотрофов, хотя количество цитохромов по сравнению с последними у них невелико.

Наконец среди самих хемоавтотрофов колебания в интенсивности дыхания очень велики, причем не коррелируют с содержанием цитохромов. Так, наиболее высокое количество цитохромов найдено у *Nitrobacter* и *Nitrosomonas* однако величина Q_{O_2} у них даже ниже, чем у других хемоавтотрофных бактерий.

Все эти данные свидетельствуют о том, что высокое содержание цитохромов, по крайней мере у некоторых хемоавтотрофов, не может быть объяснено только повышенной интенсивностью их окислительных процессов. Возникает предположение, что цитохромная система этих организмов выполняет какие-то дополнительные функции.

Изучение реакций обратного переноса электронов в дыхательной цепи хемоавтотрофных бактерий

Одной из дополнительных функций цитохромной системы ряда хемоавтотрофных бактерий может являться ее участие в процессе образования НАДН₂ путем «обратного переноса электронов» — т. е. переноса электронов за счет энергии АТФ против термодинамического потенциала. Многие из этих организмов окисляют субстраты с окислительно-восстановительным потенциалом более положительным, чем потенциал системы НАД/НАДН₂. Теоретически такие субстраты не могут восстановить непосредственно НАД. В связи с этим вопрос о механизме образования восстановителей для ряда хемоавтотрофов долгое время оставался нерешенным.

В 1963 г. появилась работа Алима с соавторами (Aleem et al., 1963) в которой было показано, что у *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* и *Th. ferrooxidans* образование НАДН₂ происходит в процессе обратного переноса электронов от восстановленного цитохрома с при затрате энергии АТФ. Эта работа была выполнена на бесклеточной системе с добавлением восстановленного животного цитохрома с и

НАД. Используемый авторами спектрофотометрический метод определения НАДН₂ не позволял наблюдать восстановление НАД при добавлении к системе окисляемых субстратов.

Учитывая важность изучения процесса обратного переноса электронов для понимания ряда сторон обмена хемоавтотрофов и, в том числе, для объяснения высокого содержания цитохромов в их клетках, нами, совместно с Г. В. Тихоновой, было начато изучение этого явления у *Nitrobacter* и *Th. ferrooxidans*.

Обратный перенос электронов наблюдали с помощью двух приборов: флюориметра и дифференциального спектрофотометра.

Изменение флюоресценции, указывающее на восстановление НАД, изучалось только у *Th. ferrooxidans*. Наиболее удобными для наблюдения этого процесса оказались клетки, проницаемость клеточных оболочек которых изменялась путем их однократного замораживания (при $t^{\circ} -10 -15^{\circ}$) и оттаивания.

Использовался следующий состав реакционной смеси: бидистиллированная вода (подкисленная серной кислотой до pH 3; клетки, подвергшиеся замораживанию (0,4—4 мг белка); донор электронов ($FeSO_4$ или аскорбат—4—5 мМ); НАД (1 мМ) АТФ (4—20 мМ). Общий объем смеси — 2 мл. При использовании перечисленной выше системы добавок быстрое усиление флюоресценции наблюдалось только при добавлении АТФ. Без АТФ реакция не шла, что указывает на необходимость затраты энергии для образования НАДН₂ у *Th. ferrooxidans*.

Ингибирование амиталом (8×10^{-3} М) АТФ—зависимого образования НАДН₂ указывает на торможение потока электронов на участке флавиин—НАД. Арсенат (5×10^{-3} М) — разобщитель окислительного фосфорилирования — тормозил реакцию на 30%.

Усиление флюоресценции при добавлении АТФ можно было наблюдать и без внесения в реакционную смесь НАД. В этом случае реакция очевидно протекала за счет восстановления внутриклеточного НАД.

Для выяснения участия цитохрома с в процессе обратного переноса электронов на дифференциальном спектрофотометре регистрировалось окисление восстановленного внутриклеточного цитохрома с при добавлении НАД к суспензии интактных клеток *Nitrobacter*. Состав реакционной смеси был

следующий: 0,15 M фосфатный буфер, pH 7,5—целые клетки (2—2,5 мг белка)—донор электронов (NaNO_2 —1 m M)—НАД (2 m M)—АТФ (6 m M). Общий объем смеси—2,5 мл.

Окисление цитохрома *c* наблюдали в анаэробных условиях: в кювету спектрофотометра на поверхность суспензии помещалась полиэтиленовая пленка. Через короткий промежуток времени (около 5 мин) бактерии практически полностью использовали растворенный в жидкости кислород и после этого под пленку осторожно вводили реагенты.

Количество цитохрома *c* определялось из дифференциального спектра: опытная кювета содержала реакционную смесь без НАД, контрольная кювета—рассеиватель. Затем в опытную кювету добавлялся НАД и снова регистрировался спектр. Полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5

Окисление внутриклеточного цитохрома *c* с помощью НАД

| №№ опыта | Количество восстановленного цитохрома <i>c</i> , $\mu\text{M} \times 10^{-3}$ на мг белка | | |
|----------|--|-----------------------|------------------------|
| | донор электронов — NaNO_2 | NaNO_2 + НАД | окисление цитохрома, % |
| 1 | 26 | 21,6 | 17 |
| 2 | 21 | 16,6 | 21 |
| 3 | 21* | 18* | 14* |

* — в этом опыте реакционная смесь содержала CN^- (1×10^{-3} M).

Из представленных данных видно, что при добавлении к вышеописанной системе НАД удается наблюдать частичное окисление бактериального цитохрома *c*. Реакция протекала по-видимому за счет энергии макроэргических соединений, так как при добавлении разобщителя окислительного фосфорилирования—динитрофенола (1 m M) окисления цитохрома *c* не наблюдалось.

Участие цитохромов в процессе обратного переноса электронов было показано и в серии работ Алим у таких хемоавтотрофов как *Nitrobacter* (Aleem, 1965), *Nitrosomonas* (Aleem, 1966a) и *Th. novellus* (Aleem, 1966b). Можно думать, что с этим процессом связано необычайно высокое содержание цитохромов, найденное у ряда хемоавтотрофов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана методика количественного определения цитохромов по дифференциальному спектру суспензий микроорганизмов, снятому относительно непоглощающего рассеивателя.

Показано, что концентрация цитохромов может быть определена с ошибкой (из-за рассеяния света) не более +15% для суспензий с концентрацией клеток 0,1% (по сухому весу), если их мутность не превышает определенной величины (менее 0,4 ед. опт. плот. при определении на ФЭК Н-56 с фильтром № 11 в кюветах с длиной оптического пути равной 1 мм).

2. Проведено качественное и количественное определение компонентов цитохромной системы у следующих видов бактерий, относящихся к основным группам хемоавтотрофных микроорганизмов: *Nitrobacter winogradskyi*, *Nitrosomonas europaea*, *Th. ferrooxidans*, *Th. 70 S*, *Th. thiooxidans*, *Hydrogenomonas Z-13*.

а) Цитохромы типа *c* и *a* найдены у всех указанных видов. Цитохром типа *b* присутствует в клетках *Th. ferrooxidans*, *Th. thiooxidans* и *Hydrogenomonas Z-13*, но не обнаружен (в том числе и при низкотемпературном спектрофотометрировании) у изучавшихся штаммов *Th. 70 S* и *Nitrosomonas*. Четких данных о наличии цитохрома *b* в клетках *Nitrobacter* получить не удалось.

б) Хемоавтотрофные бактерии отличаются высоким содержанием цитохромов. Однако среди обследованных видов наблюдаются значительные колебания в их количестве.

Особенно богаты цитохромами (4,3—1,5 μM цитохрома *c* на г сух. веса) *Nitrobacter*, *Nitrosomonas* и *Th. ferrooxidans*, окисляющие энергетически бедные субстраты—аммоний, нитриты и закисное железо (редокспотенциал—выше +0,4). Водородные и тионовые бактерии, окисляющие энергетически более выгодные вещества (водород и серные соединения), содержат значительно меньше цитохромов—0,5—0,08 μM цит. *c* на г сух. веса.

3. В целях сравнения с хемоавтотрофными бактериями определено содержание цитохромов у большого числа видов и штаммов (около 100) гетеротрофных микроорганизмов.

Количество цитохромов (в μM на г сух. веса) у большинства исследованных форм колебалось от 0,01 до 0,07 для цитохромов типа *c* и *b* и от 0,01 до 0,02 для цитохромов типа *a*.

Наиболее высокое содержание цитохромов (до 0,46 мкМ цитохрома *c* на г сух. веса) было найдено у некоторых представителей рода *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Azotobacter* и у термофильных бацилл.

4. Для ряда гетеротрофных микроорганизмов (рода *Pseudomonas*, *Acetobacter*, *Azotobacter*) и хемоавтотрофных бактерий определялись границы, в которых колеблется содержание цитохромов при изменении условий культивирования (аэрации, состава питательной среды и т. д.).

Найдено, что количество цитохромов в клетках изученных организмов, собранных в поздней логарифмической фазе роста, менялось в зависимости от перечисленных факторов не более чем в два—четыре раза.

5. Сопоставление количества цитохромов у изучавшихся групп микроорганизмов показало, что все хемоавтотрофные бактерии имеют повышенное содержание цитохромов типа *c* и, часто, типа *a* по сравнению с гетеротрофными формами со средним количеством цитохромов.

У хемоавтотрофов особенно богатых цитохромом *c* (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*, *Th. ferrooxidans*) его количество в 50—140 раз выше, чем у большинства гетеротрофов.

6. Сравнение интенсивности дыхания у ряда хемоавтотрофных и гетеротрофных микроорганизмов показало, что исследованные хемоавтотрофные бактерии имеют высокие величины Q_0 , (от 150 до 1350 мкМ при определении манометрическим методом) по сравнению со многими гетеротрофами. Однако различия в интенсивности дыхания не так велики, как разница в содержании цитохромов у этих двух групп микроорганизмов.

7. Установлено наличие зависящего от энергии обратного переноса электронов в дыхательной цепи интактных клеток *Nitrobacter winogradskyi* и в клетках *Th. ferrooxidans*, подвергавшихся замораживанию и оттаиванию. Показано участие цитохрома *c* в этом процессе.

8. Высокое содержание цитохромов в клетках ряда хемоавтотрофных бактерий можно объяснить, по-видимому, дополнительной (по сравнению с гетеротрофными организмами) нагрузкой, которую несет их цитохромная система, участвуя:

а) в образовании восстановителей, необходимых для процессов биосинтеза;

б) в выработке макроэргических соединений, необходимых для фиксации углекислоты и восстановления никотинамиднуклеотидов путем обратного переноса электронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Л. Лисенкова и Е. Н. Мохова. Спектрофотометрическое количественное определение цитохрома *c* в интактных клетках микроорганизмов. Микробиол. 33, 918, 1964.

2. Л. Л. Лисенкова, А. Б. Лозинов. Об ошибках спектрофотометрического определения цитохромов в бактериальных клетках. Прикладная биохимия и микробиол. 2, 175, 1966.

3. В. А. Ермаченко, Л. Л. Лисенкова и А. Б. Лозинов. Количественное определение цитохромов *Nitrosomonas eutrophae*. Микробиол., 35, вып. 2, 242, 1966.

4. Л. Л. Лисенкова, А. Б. Лозинов. Количественное изучение цитохромов хемосинтезирующих и гетеротрофных микроорганизмов. Изв. АН СССР, сер. биол., 4, 532, 1966.

5. А. Б. Лозинов, Л. Л. Лисенкова. Сравнительное количественное изучение цитохромной системы хемосинтезирующих и гетеротрофных микроорганизмов. IX Международный конгресс по микробиологии. Тезисы докладов, 171, 1966.

6. Л. Л. Лисенкова, Е. Н. Мохова. Спектрофотометрическое количественное определение цитохромов в интактных клетках микроорганизмов. В сб. Биоэнергетика и биологическая спектрофотометрия, 186, 1967.

7. Л. Л. Лисенкова, И. Хмель. Влияние условий культивирования на содержание цитохромов в клетках *Azotobacter vinelandii*. Микробиол. 36, 909, 1967.

8. Г. В. Тихонова, Л. Л. Лисенкова, И. Г. Доман, В. П. Скулачев. Пути переноса электронов у железобактерий *Th. ferrooxidans*. Биохимия, 1967, в печати.

Материалы настоящей работы докладывались на Краснодарской конференции по управляемому биосинтезу и биофизике популяций (июль, 1965 г.) и на IX Международном конгрессе по микробиологии (Москва, 1966 г.).

Институт микробиологии, Москва, Профсоюзная ул., д. 7.

T12185 9/IX-67 г.

Объем 1 1/2 п. л.

Заказ 894, тираж 200

Типография МИСиС, Шаболовка, 9.