

Purification de l'enzyme nitrogénase d'*Anabaena* sp.

Pierre-Adrien REYNAUD

O.R.S.T.O.M., B.P. 1386, Dakar, Sénégal

RÉSUMÉ

La purification de l'enzyme nitrogénase a été tentée à partir d'un extrait brut de Cyanophycée hétérocystée : *Anabaena* sp. La fraction molybdo-ferrique de cette enzyme a été isolée et un antisérum a été préparé. On a observé : 1° des réactions croisées entre la protéine molybdo-ferrique et les ferro-protéines de *Klebsiella pneumoniae* et d'*Azotobacter chroococcum*. 2° que cette protéine comporte deux sous unités de PM 51 000 et 59 000. 3° l'absence d'analogie antigénique avec les fractions molybdo-ferrique de *K. pneumoniae* et d'*A. chroococcum*, d'une part et avec les extraits bruts de deux Cyanophycées fixatrices : *Gloeocapsa* sp. et *Plectonema boryanum*, d'autre part.

MOTS CLÉS : Purification - nitrogénase - Cyanobactérie - techniques.

ABSTRACT

Partial purification of *Anabaena* sp. nitrogenase is presented. The Mo-Fe protein was isolated and contained two types of subunits of mol. wt. 51 000 and 59 000.

The antigen was prepared, and cross reactions between the *Anabaena* Mo-Fe protein to Fe protein from *Klebsiella pneumoniae* or *Azotobacter chroococcum* were exhibited. No antigenic analogy was found between the Mo-Fe protein from *K. pneumoniae* or *A. chroococcum*, nor with crude extracts from two other nitrogen fixing Cyanobacteria *Gloeocapsa* sp. and *Plectonema boryanum*.

KEY WORDS : Nitrogenase - purification - Cyanobacteria - techniques.

INTRODUCTION

La fixation biologique de l'azote moléculaire, réaction spécifique des procaryotes, est catalysée par l'enzyme nitrogénase. Cette enzyme est un complexe protéique formé de deux ferro-protéines non hémiques dont l'une contient du molybdène.

Les deux composants, bien que difficiles à caractériser, par suite de leur complexité et de leur extrême sensibilité à l'oxygène, ont pu être isolés avec un haut niveau de pureté à partir de diverses Bactéries; la

revue bibliographique de Zumft et Mortenson (1975) fait apparaître le petit nombre de travaux portant sur les Cyanophycées; Smith et coll. (1971) ont démontré l'existence des deux ferro-protéines chez *Anabaena cylindrica* sans toutefois les purifier.

Le présent article décrit les différentes étapes d'une méthode de purification de la nitrogénase que nous avons appliquée à *Anabaena* sp. Cela nous a permis de procéder à une comparaison immunologique de la protéine molybdo-ferrique isolée avec les extraits bruts de deux autres types de Cyanophycées fixatrices : *Gloeocapsa* sp. et *Plectonema boryanum*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL BIOLOGIQUE

Souches algales et méthodes de culture

Trois souches axéniques provenant de la collection du Pr. R. Y. Stanier (Institut Pasteur, Paris) ont été utilisées :

- *Anabaena* sp. 7120.
- *Plectonema boryanum* 73110.
- *Gloeocapsa* sp. 6909, souche LB 795.

Les souches sont cultivées en flacon de 101 sur milieu liquide BG 11 (Allen et Stanier, 1968) privé de NaNO_3 . Les flacons sont gazés par un mélange d'air- CO_2 (99/1, v/v) avec un débit de 0,3 l/h. Cette méthode de culture permet d'assurer un apport optimal de CO_2 aux algues en maintenant un pH stable de 7,4 dans le milieu.

Les flacons sont éclairés par une batterie de 12 tubes fluorescents « cold white » (OSRAM. 40 W), la mise en service des tubes est effectuée progressivement, en fonction de l'augmentation de la densité optique de la culture.

En fin de phase exponentielle de croissance, le mélange air-CO₂ utilisé pour le gazage est remplacé pendant 48 h par un mélange Argon-CO₂; 99/1; v/v) qui évite la formation d'un pool intracellulaire continue d'ammonium, et permet donc une dérépression de la synthèse de la nitrogénase (Neilson et coll., 1971).

Les algues sont récoltées par centrifugation en continu avec le dispositif « KSB » dans une centrifugeuse SORVAL RC2-B à 10 800 xg.

Fractions purifiées de nitrogénase microbienne

Les fractions Kp1 et Kp2 de *Klebsiella pneumoniae* (souche M 5 à 1) et Ac1, Ac2 d'*Azotobacter chroococcum* ont été fournies aimablement par les docteurs R. R. Eady et M. G. Yates (A.R.C. Unit of Nitrogen Fixation, Brighton, Sussex, U.K.).

MÉTHODE DE PURIFICATION

Les différentes étapes de la purification sont regroupées au tableau I. Lorsque, pour une étape, différentes techniques ont été essayées, seule figure celle ayant donné le meilleur résultat. Toutes les manipulations ont été effectuées à la température du laboratoire.

Conditions d'anaérobiose

Les opérations de purification et les essais d'activité *in vitro* ont été conduits en anaérobiose stricte. Les tampons sont préparés à partir d'eau distillée gazée sous un courant continu d'azote; ils contiennent 100 mg de dithionite de sodium et 100 mg de dithiothreitol par litre. Les éluats des colonnes sont recueillis dans des erlens gazés à l'azote. Les fractions protéiques sont manipulées au moyen de seringues connectées à des tubes en chlorure de polyvinyl.

Préparation et purification des extraits bruts

Les culots provenant de la centrifugation des cultures sont suspendus dans un volume égal de tampon glycylglycine 0,1 M pH 7,4 contenant 1 mM d'adénosine triphosphate (ATP) et 0,9 mg/ml de dithionite de sodium (Na₂S₂O₄). La suspension algale homogénéisée par agitation est passée à la French Pressure Cell (American Instrument Co Inc., Silver Spring, Md) à une pression de 20 000 p.s.i. ce qui permet le cassage de plus de 95 % des hétérocystes. Le produit obtenu est conservé dans l'azote liquide jusqu'à l'étape suivante qui consiste en deux centrifugations successives : 40 000 × g pendant 20 min. puis 150 000 × g pendant 4 h qui éliminent les débris membranaires. Le surnageant comporte deux

couches superposées; l'une jaune pâle, est écartée, l'autre très pigmentée, est conservée. On effectue dans cette dernière une précipitation fractionnée en ajoutant des quantités croissantes de protamine sulfate afin d'obtenir successivement une concentration égale à 8,10 et 14 % de celle des protéines contenues dans le surnageant. La protamine sulfate est apportée en solution (50 mg/ml) dans un tampon glycylglycine 0,1 M, pH 7,4. La précipitation élimine d'abord les acides nucléiques, puis les ions SO₄⁻ de la protamine sulfate précipitent la nitrogénase (Mortenson, 1972). Après chaque addition de protamine sulfate on procède à une centrifugation à 10 000 × g pendant 10 min. et à un dosage de l'activité nitrogénasique dans le surnageant (4 s, tabl. I).

Le précipité nitrogénase-protamine sulfate est solubilisé par 7 fois son volume de cellulose phosphate à 10 % (Whatman P 11) dans le tampon tris HCl 0,02 M, pH 8. Une centrifugation à 40 000 × g pendant 60 min. permet de recueillir un surnageant de couleur brune (5 s, tabl. I) dont on détermine la concentration en protéine et l'activité.

Séparation entre *Acy 1* et *Acy 2*

La fraction 5 s est passée sur une colonne (40 × 5 cm) de Sephadex G-200 pH 7,4 dans un chromatographe à colonne K 50/60 (Pharmacia (G.B.) Ltd, London, W.5, U.K.). On élue à un débit de 30 ml/h avec un gradient de MgCl₂ entre 20 et 90 mM.

Une bande brune (6 s tabl. I) est éluée avec MgCl₂, 50 mM; elle présente une activité nitrogénasique avec Kp2 et Ac2; on suppose donc qu'elle comprend la protéine molybdo-ferrique de l'enzyme nitrogénase d'*Anabaena* sp.: *Acy 1*.

Une bande orangée est éluée avec MgCl₂, 90 mM; elle n'a pas d'activité nitrogénasique ni par elle-même, ni après association avec une autre fraction.

La fraction 6 s est concentrée sur membrane Diaflo UM 10 (Amicon N.V., Mechelastraat, Oosterhant (N.B.), Holland) sous une pression d'argon de 1,72.10⁵ N/m². Elle est centrifugée pour éliminer un léger précipité formé durant la concentration; cette opération est répétée deux fois et, à ce stade la pureté de la préparation est testée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide traité au dodécyl sulfate de sodium (SDS).

MESURE DE L'ACTIVITÉ NITROGÉNASIQUE IN VITRO

La réaction est effectuée dans des flacons à pénicilline de 10 ml fermés hermétiquement par des bouchons à jupe rabattable en « gum souple » de 13 mm de diamètre (Société du Thermomètre de précision). Le

TABLEAU I
 METHODE DE PURIFICATION DES PROTEINES DE LA NITROGENASE D'ANABAENA 7120.
 TRIS = TRIS (HYDROXYMETHYL) AMINOMETHANE.

Centrifugation en continu 10800 x g

(1c) culot + volume égal de tampon glycylglycine 0,1 M pH 7,4
 + 1mM d'adénosine triphosphate (ATP)
 + 0,9 mg/ml de dithionite de Sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) Surnageant

cassage 20000 p.s.i. sous N_2
 40000 xg 20 min 15°C.

culot : débris
 cellulaires

(2 s) Surnageant 40 mg protéines/ml
 150000 xg 4 h 10°C

(3) culot : protéines de
 poids moléculaire élevé

(3b) fraction très pigmentée
 du surnageant 30 mg
 protéines/ml

(3a) fraction jaune
 pâle du surnageant

Précipitée par 14 % de Protamine
 Sulfate (50 mg/ml dans tampon
 glycylglycine 0,1 M pH 7,4
 + 0,5 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)

10000 xg, 10 min.

(4c) culot 20 mg protéines/ml
 + 7 volumes cellulose phosphate dans tampon tris HCl
 0,02 M pH8
 + 0,5 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

(4s) Surnageant

agitation 30 min.
 40000 xg, 1 h

culot : cellulose phosphate-protaminesulfate
 + résidus insolubles

(5s) Surnageant brun 4,5 mg
 protéines/ml. Sephadex
 G200 colonne de 5 x 40 cm
 tris HCl 0,025 M pH 7,4
 10 mg/l DL dithiothreital
 + 10 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

(6s) bande brune

MgCl_2 50 mM

MgCl_2 90 mM

bande orange
 sans activité
 nitrogénasique :
 composant 2 ?

Concentration sur Diaflo UM 10

10000 xg, 5 min

culot

Surnageant concentré Diaflo UM10

(7s) composant I

mélange réactif contient pour un volume total de 2 ml :

- 40 μ m de tampon acide 2-(N-2-hydroxyéthyl pipérazine-N'-yl) éthane sulfonique (HEPES) ajusté à pH 7,4 avec NaOH 2N,
- 20 μ m $MgCl_2 \cdot 6H_2O$,
- 8 μ m ATP,
- 12,4 μ m de créatine phosphate,
- 0,2 mg de créatine phosphokinase (EC2.7.3.2.),
- 8 μ m de $Na_2S_2O_4$,
- et la quantité d'extrait brut désirée, sous 0,1 atmosphère d'acétylène dans l'argon.

Toutes les solutions sont préparées dans l'eau distillée soigneusement dégazée par ébullition et barbotage avec l'argon; elles sont toutes stockées à $-25^\circ C$. La solution de dithionite de sodium est préparée au moment de l'expérience en anaérobiose stricte.

Le dithionite de sodium et les extraits bruts préalablement décongelés sous argon, sont injectés à travers les bouchons, après que les flacons aient été gazés pendant 5 mn avec un flot continu d'argon pour obtenir une anaérobiose totale. Le mélange est agité à 100 révolutions par mn à $30^\circ C$. Après 5 mn, la pression dans le flacon est équilibrée avec la pression atmosphérique, en perçant quelques secondes le bouchon avec une aiguille hypodermique. Le mélange est encore agité 5 mn à $30^\circ C$, puis la réaction débute par l'introduction de 0,1 atm. d'acétylène.

La réaction est arrêtée après 15 mn, par injection de 0,1 ml d'acide trichloracétique à 30 %, chaque expérience comporte 3 répétitions.

L'éthylène formé est mesuré dans un chromatographe MICROTEK MT 220 à ionisation de flamme (colonne (2 m \times 1/8 inches) avec PORAPAK R 80/100 mesh; température colonne $75^\circ C$, gaz vecteur : N_2 60 ml/mn). Les mesures sont répétées sur deux échantillons gazeux de 0,25 ml. Les résultats sont exprimés en nanomoles d'éthylène formé par minute et par milligramme de protéine.

ELECTROPHORÈSE

La protéine est préparée suivant la technique décrite par Eady et coll. (1972). L'électrophorèse est réalisée suivant la méthode de Weber et Osborn (1969).

MESURE DES CONCENTRATIONS EN PROTÉINES

Elles ont été mesurées colorimétriquement par la méthode au biuret (Gornall et coll., 1949) et par la méthode de Folin-Ciocalteu (Lowry et coll., 1951).

La protéine de référence est l'albumine de sérum de bœuf.

PRÉPARATION DE L'IMMUNSERUM ANTI Acy 1

Sur deux lapins Bouscat mâles de 2 kg on effectue à 10 j d'intervalle 4 injections intradermiques de la préparation suivante :

- 100 μ g de fraction Acy 1 (0,05 ml)
- + 0,15 ml de NaCl 0,15 M
- + 0,01 ml de serum albumine de bœuf méthylée
- + 0,20 ml d'adjuvant de Freud.

10 jours après la dernière injection, la technique du ring-test permet d'observer une réponse positive du sérum prélevé sur la fraction Acy 1.

On procède ensuite à des injections intra-veineuses tous les 10 jours de 200 μ g de fraction Acy 1

- + 0,3 ml de NaCl 0,15 M
- + 0,02 ml de B.S.A. méthylée.

Le sang est prélevé par ponction cardiaque. Le serum est obtenu après coagulation du sang 1 h à $37^\circ C$ et une nuit à $4^\circ C$. Les immunoglobulines sont précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation à pH 7,8 puis redissoutes dans NaCl 0,15 M.

DOUBLE DIFFUSION EN AGAROSE

Le gel d'Agarose à 1,2 % dans du tampon barbital (Methods in Immunology, p. 429 second ed. 1970, W.A. Benjamin Inc., N.Y.), pH 7,4 est étalé à raison de 5 ml par plaque de verre (5 \times 5 cm) puis préparé suivant la technique d'Ouchterlony. Des photographies sont prises après 24 et 48 h.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

ETAPES DE LA PURIFICATION

La méthode de purification présentée dans le tableau I a permis de préciser quelques caractères particuliers de la fonction réductrice d'acétylène chez *Anabaena* sp. (7120).

Différents processus de conservation des extraits bruts ont été testés : à la température ambiante ($20-25^\circ C$) ou à $-20^\circ C$ dans une atmosphère d' N_2 l'activité nitrogénasique diminue de moitié en 24 h et devient nulle en une semaine. Par contre une congélation immédiate dans l'azote liquide permet de

conserver la même activité spécifique pendant des mois (Kelly et coll., 1967). Nous avons obtenu une stabilité semblable en congelant les extraits dans l'azote liquide puis en les transvasant dans des récipients hermétiquement clos en atmosphère d' N_2 qui sont conservés au congélateur ($-20\text{ }^\circ\text{C}$). Comme l'ont montré Haystead et coll. (1970) et Smith et Evans (1971), la nitrogénase d'*Anabaena* 7120 est une enzyme soluble dans le sens qu'elle ne se sédimente pas lors d'une centrifugation prolongée aux vitesses élevées. Après une centrifugation de 4 h à $150\,000 \times g$ on retrouve une activité maximum dans la fraction contenant les agrégats non dissociés de phycocyanine et de phycoérythrine dont les poids moléculaires varient entre 220 000 et 360 000 (Glazer et Cohen-Bazire, 1971); ces valeurs sont semblables à celles des complexes nitrogénase de *K. pneumoniae* (Eady et coll., 1972), *C. pasteurianum* (Huang et coll., 1973) et *A. vinelandii* (Burns et coll., 1970).

Sur la fraction 3b un essai de précipitation des protéines par la chaleur (Bergersen et Turner, 1970) a été tenté. Après 5' à $60\text{ }^\circ\text{C}$ l'activité nitrogénasique d'*Anabaena* 7120 est nulle; on peut en conclure que l'enzyme a précipité avec la majorité des protéines. Par contre après 5' à $50\text{ }^\circ\text{C}$, toute l'activité nitrogénasique est retrouvée mais peu de protéines ont précipité.

Une purification par précipitation avec des concentrations croissantes de protamine sulfate (Evans et coll., 1973) montre que pour 10 % de protamine sulfate il n'y a plus d'activité nitrogénasique dans le surnageant.

En ajoutant à ce surnageant, 0,13 mg de protéine 2 de *Klebsiella pneumoniae* Kp2 (Eady et coll., 1972) on retrouve 10 % de l'activité spécifique de la fraction 3b. Avec 14 % de protamine sulfate un test avec Kp2 ne donne plus d'activité. On peut en conclure qu'il existe une réaction croisée entre Kp2 et la protéine 1 d'*Anabaena* 7120 Acy 1; Acy 1 n'est pas totalement précipitée par la même concentration de protamine sulfate que la protéine 2 d'*Anabaena* 7120: Acy 2.

La réaction croisée Kp2-Acy 1 permettra, lors de la séparation des 2 protéines d'A. 7120 de retrouver l'activité Acy 1 dans les éluats.

RÉACTIONS CROISÉES

La fraction Acy 1 purifiée a été recombinaisonnée avec la fraction Ac 2 d'*Azotobacter chroococcum* (Yates et Planque, 1975). Avec des conditions expérimentales et des concentrations protéiques identiques, l'activité spécifique obtenue en recombinant Acy 1 et Ac2 est trois fois plus forte qu'entre Acy 1 et Kp2 (Eady et Postgate, 1974).

L'activité spécifique d'un échantillon de Acy 1 (0,2 mg) combiné à 0,13 mg de Kp2 (0,1 ml) est quatre fois plus fortes que dans un extrait brut (tabl. II).

SOUS UNITÉS

L'électrophorèse de la fraction Acy 1 après traitement avec 1 % (v/v) de β -mercaptoethanol et 1 % (p/v) de dedecyl sulfate de sodium (dans les conditions décrites par Weber et Osborn, 1969) met en évidence 2 bandes de densités équivalentes (photo 1). En comparant la vitesse de migration de ces bandes à celles de protéines standard (fumarase PM: 49 000; pyruvate kinase pm: 57 000), les poids moléculaires des 2 sous-unités de la fraction Acy 1 sont voisins de 51 000 et 59 000. Ces valeurs sont en accord avec celles données par Eady et coll. (1972) pour *K. pneumoniae* et Nakos et Mortenson (1971) pour *C. pasteurianum*.

DOUBLE DIFFUSION EN AGAROSE

Chez les Cyanophycées 3 types de fixation algale ont été mis en évidence (Haystead et coll., 1970; Gallon et coll., 1971): en aérobiose avec des hétérocystes, en aérobiose sans hétérocystes, en condition microaérophyles.

Lorsque les mesures d'activité spécifique de chaque type de fixation représentées respectivement par *Anabaena* 7120, *Gloeocapsa* sp. LB 795 et *Plectonema boryanum* ont été optimisées dans les extraits bruts, elles apparaissent comme très similaires (Reynaud, 1976).

Nous avons testé par la méthode de double diffusion en agarose la pureté de la fraction Acy 1 obtenue et la spécificité antigénique de cette protéine par rapport aux constituants des extraits bruts des deux autres Cyanophycées fixatrices.

L'immun-sérum anti Acy 1 est formé de l'ensemble des anticorps de spécificité différente, dirigés contre les déterminants antigéniques de Acy 1: l'immun-sérum est spécifique de la souche d'*Anabaena* 7120 mais la présence de 2 bandes de précipitation montre que la fraction Acy 1 n'est pas immunologiquement pure (photo 2). Il ne donne pas de bande de précipitation contre les extraits bruts de *P. boryanum* et de *G. sp* LB 795.

Les extraits bruts des trois Cyanophycées testés avec les immun-sérum anti-Kp1 et anti-KP2 donnent aussi des résultats négatifs. Les 2 fractions de l'enzyme nitrogénase d'un organisme peuvent donc présenter une activité avec les fractions complémentaires d'autres

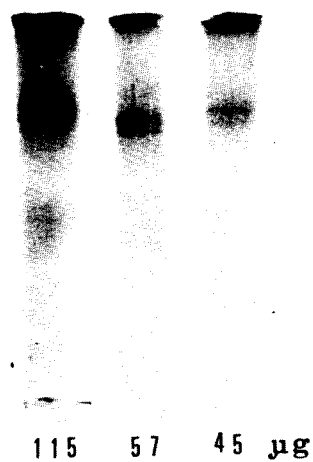


PHOTO 1. — Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de 115,57,45 µg de fraction Acy 1 traitée avec 1 % (pds/v) de dodecyl sulfate de sodium.

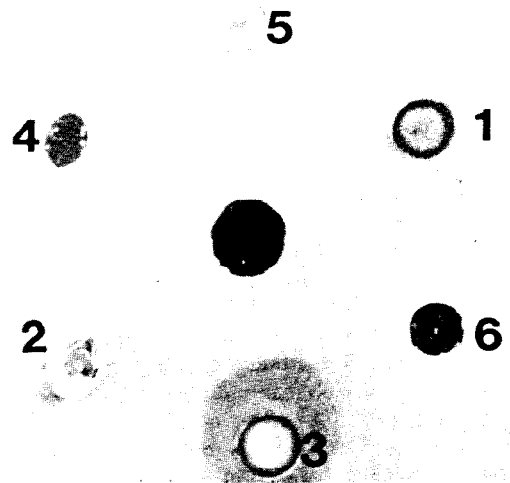


PHOTO 2. — Gel d'Ouchterlony en double diffusion. Le puits central contient l'immunsérum anti Acy 1. Les puits 1 et 2 contiennent Acy 1, 3 : extraits bruts d'A. 7120 sur BG 11, 5 : extraits bruts d'A. 7120 sur BG 11 sans NaNO_3 , 4 : extraits bruts de Plectonema 73110 sur BG 11 sans NaNO_3 , 6 : extraits bruts de Gloeocapsa 6909 sur BG 11 sans NaNO_3 .

TABLEAU II
MESURE DE L'ACTIVITE SPECIFIQUE DE LA NITROGENASE SUR LES EXTRAITS BRUTS A CHAQUE ETAPE DE LA PURIFICATION

Etapas de purification	Vol. ml	Protéines mg	Activité nitrogénase		Pourcentage retrouvé		Taux de purification
			nMC_2H_4 mn^{-1}	nMC_2H_4 $\text{mn}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	Protéines	Activité	
Cellules cassées	110	7300	19700	2,7	100	100	1,00
40000 xg, 20 min. culot 2c surnag. 2s	20	3100	1550	0,5	42	8	—
	100	4150	21000	5,1	58	106	1,88
150000 xg, 4 h culot 3c surnag. 3b surnag. 3a	40	1660	660	0,4	23	3	—
	50	1550	12800	8,25	21	65	3,10
	30	760	0	0	10	0	—
Précipitation par Protamine Sulfate 14 % 5 s	40	180	630	3,5	2,5	3,2	1,30
			Activité spécifique, avec 0,1 ml de KP^2				
5 s	40	180		8,8	2,5		
6 s	20	50		8,8	0,7		
7 s	12	25		9,7	0,35		

organismes sans toutefois posséder une composition protéique identique.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Docteur R.R. Eady pour l'aide qu'il m'a apportée durant ce travail, Monsieur le Professeur J. Postgate qui m'a permis de réaliser cette purification dans son laboratoire de Brighton, Monsieur le Professeur R.Y. Stanier qui m'a constamment guidé de ses conseils.

Manuscrit reçu au Service des Publications le 11 mai 1977

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN (M. B.), STANIER (R. Y.), 1968. — Selective isolation of blue-green algae from water and soil. *J. gen. Microbiol.*, 51 : 203-209.
- BERGERSEN (F. J.), TURNER (G. L.), 1970. — Gel filtration of nitrogenase from soybean root-nodule bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 214 : 28-36.
- BURNS (R. C.), HOLSTEIN (R. D.), HARDY (R. W. F.), 1970. — Isolation by cristallisation of the Mo-Fe protein of *Azotobacter* nitrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39 : 90-99.
- EADY (R. R.), SMITH (B. E.), COOK (K. A.), POSTGATE (J. R.), 1972. — Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*. Purification and properties of the component proteins. *Biochem. J.*, 128 : 655-675.
- EADY (R. R.), POSTGATE (J. R.), 1974. — Nitrogenase. *Nature*, 249, 5460 : 805-810.
- EVANS (M. C. W.), TELFER (A.), SMITH (R. W.), 1973. — The purification and some properties of the molybdenum-iron protein of *Chromatium* nitrogenase. *Biochim. Biophys. Acta*, 310 : 344-352.
- GALLON (J. R.), LARUE (T. A.), KURZ (W. G. W.), 1972. — Characteristics of nitrogenase activity in broken cell preparations of the blue-green alga *Gloeocapsa* sp. LB 795. *Canadian J. Microbiol.*, 18, 3 : 327-332.
- GLAZER (A. N.), COHEN-BAZIRE (G.), 1971. — Subunit Structure of the Phycobiliproteins of Blue-Green Algae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 68, 7 : 1398-1401.
- GORNALL (A. G.), BARDAWILL (C. J.), DAVID (M. M.), 1949. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177 : 751-766.
- HAYSTEAD (A.), ROBINSON (R.), STEWART (W. D. P.), 1970. — Nitrogenase activity in extracts of heterocystous and non-heterocystous blue-green algae. *Arch. Mikrobiol.*, 74 : 235-243.
- HUANG (T. C.), ZUMFT (W. G.), MORTENSON (L. E.), 1973. — Structure of the molybdo-ferredoxin complex from *Clostridium pasteurianum* and isolation of its subunits. *J. of Bacteriol.*, 113, 2 : 884-890.
- KELLY (M.), KLUCAS (R. V.), BURRIS (R. H.), 1967. — Fractionation and storage of nitrogenase from *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. J.*, 105 : 3c-5c.
- LOWRY (O. H.), ROSENBOUGH (N. J.), FARR (A. L.), RANDALL (R. J.), 1951. — Protein measurement with Folin-phénol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265-275.
- MORTENSON (L. E.), 1972. — Purification of nitrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Meth. Enzym.*, 24 B : 446-456.
- NAKOS (G.), MORTENSON (L. E.), 1971. — Purification and properties of hydrogenase, an iron-sulfur protein from *Clostridium pasteurianum* W 5. *Biochimica Biophysica Acta*, 227 : 576-83.
- NEILSON (A.), RIPKA (R.), KUNISAWA (R.), 1971. — Heterocyst formation and nitrogenase synthesis in *Anabaena* sp. *Arch. Mikrobiol. Dtsch.*, 76, 2 : 139-150.
- REYNAUD (P.), 1976. — Comparatives studies on patterns of nitrogen fixation in Cyanobacteria. II Intern. Symp. on N₂ Fixation. Poster C8.
- SMITH (R. V.), EVANS (M. C. W.), 1971. — Nitrogenase activity in cell-free extracts of the blue-green alga, *Anabaena cylindrica*. *J. Bacteriol.*, 105 : 913-917.
- SMITH (R. V.), TELFER (A.), EVANS (M. C. W.), 1971. — Complementary functioning of nitrogenase components from a blue-green alga and a photosynthetic bacterium. *J. Bacteriol.*, 107, 2 : 574-575.
- WEBER (K.), OSBORN (M.), 1969. — The reliability of Molecular Weight Determination by Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 244 : 4406-4412.
- YATES (G.), PLANQUE (K.), 1975. — Nitrogenase from *Azotobacter chroococum*. Purification and Properties of the component proteins. *Eur. J. Biochem.*, 60 : 467-476.
- ZUMFT (W. G.), MORTENSON (L. E.), 1975. — The nitrogen-fixing complex of bacteria. *Biochimica Biophysica Acta*, 416 : 1-52.