

А. А. ГУРЕВИЧ, Т. К. ЗАХАРОВА

**ОБ ОПРЕДЕЛЕНИИ ПОТРЕБНОСТИ АЭРОБНОЙ КЛЕТКИ
В ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА**

(Представлено академиком А. Е. Браунштейном 2 XI 1970)

Было показано ⁽¹⁾, что хлорелла, поврежденная продолжительным голодающим и перенесенная затем на свет и в благоприятные условия минерального питания, выживает и переходит к нормальному состоянию лишь при добавлении к питательной среде небольшого количества перекиси водорода. После менее значительного голодания, в благоприятных условиях питания, выживание и постепенное возвращение к нормальному состоянию значительно ускоряется с введением перекиси водорода. Перекись водорода не оказывает заметного влияния на состояние нормальной хлореллы.

Описанное явление происходит при полной аэрации водоросли продуванием воздуха и, следовательно, обусловлено не разложением внесенной перекиси водорода каталазой растения, а действием перекисного кислорода.

Установленный эффект физиологического действия внесенной извне перекиси водорода на поврежденную голодающим хлореллу становится понятным, если принять во внимание, что перекись водорода является нормальным промежуточным продуктом аэробного дыхания ⁽²⁾, и признать ее жизненную необходимость. В поврежденной резким голодающим хлорелле повреждаются и инактивируются аэробные флавиновые дегидрогеназы, образующие перекись водорода, а внесение последней извне является обязательным условием ее выживания. Действительно, исследование дыхания такой голодающей хлореллы показало, что оно крайне понижено, что соответствует изложенному пониманию данного эффекта.

Представление о жизненной необходимости для аэробного организма перекиси водорода, образуемой при дыхании, согласуется с данными об ее участии в реакциях индуцированного переноса водорода. Последние заключаются в том, что активированная пероксидазным биокатализатором перекись водорода, моновалентно окисляя аскорбиновую кислоту, приводит к образованию ее активного свободного радикала, подвижный водород которого легко переносится на соответствующие биологические акцепторы, в том числе и на молекулярный кислород. Образующаяся в результате этого дегидроаскорбиновая кислота затем в ходе дыхательного цикла вновь подвергается восстановлению в аскорбиновую кислоту. У некоторых аэробных организмов реакции индуцированного переноса водорода, по-видимому, принимают участие в ряде процессов биологического синтеза, связанных с восстановлением ⁽³⁻⁵⁾.

Далее было определено действие перекиси водорода на дыхание хлореллы в зависимости от ее охарактеризованного выше физиологического состояния.

Культуру водоросли хлореллы термофильного штамма выращивали в конических стеклянных колбах емкостью 0,5 л на среде Майерса концентрации 0,3 М, содержащей микроэлементы, при общей освещенности в 10 тыс. лк и температуре 33—35°. Досвечивали культуру лампами ДС-80

и лампой накаливания в 500 вт. Подкармливали суспензию углекислотой 3 раза в день в течение 1 мин. Плотность суспензии, которая учитывалась в камере Горяева и на ФЭК, доводили до 80—100 млн. клеток в 1 мл питательного раствора. Дыхание определялось по поглощению кислорода манометрическим методом Варбурга. В опыте к 2 мл суспензии хлореллы добавлялась 1 капля 1-процентной перекиси водорода, в контроле она не вносилась. Если хлорелла находится в нормальном состоянии, при кото-

Таблица 1*

Действие 1-процентной H_2O_2 (2 капли на 50 мл в первые сутки) на хлореллу, поврежденную голоданием

Срок, сутки	Контроль	Опыт, H_2O_2	Срок, сутки	Контроль	Опыт, H_2O_2
0	0,30	0,30	4	0,44	0,60
1	0,35	0,38	5	0,47	0,68
2	0,38	0,45	6	0,51	0,73
3	0,41	0,52	7	0,54	0,85

* Оптическая плотность суспензии в показаниях ФЭК.

ром внесенная перекись водорода не оказывает влияния на ее развитие, то капля добавленной перекиси водорода вызывает снижение поглощения кислорода по сравнению с контролем. Это объясняется разложением H_2O_2 , оказавшейся в избытке, каталазой водоросли с образованием молекулярного кислорода, что обнаруживается как кажущееся снижение его поглощения при дыхании. Действительно, в этих опытах наблюдается обильное выделение пузырьков газа. Если же такому испытанию подвергается поврежденная голоданием хлорелла, необходимым условием выживания которой является внесение перекиси водорода, то при определении ее дыхания в опыте с перекисью водорода поглощается больше кислорода, чем в контроле без добавления последней. Это объясняется тем, что хлорелла, поврежденная голоданием, испытывает недостаток перекиси водорода, и потому капля последней, внесенная извне, не оказывается избыточной и не разлагается каталазой, а вступает в индуцированные реакции восстановления. В соответствии с вышесказанным это приводит к усиленному поглощению молекулярного кислорода при дыхании. Можно было предположить, что нормальная и длительно голодающая хлореллы сильно различаются между собой по своей каталазной активности. Но определения этой величины, выполненные газометрическим методом, показали, что активность каталазы у испытанных культур водоросли примерно одинакова. Тем не менее пути превращения внесенной извне перекиси водорода оказываются у них резко различными.

Таким же образом была испытана хлорелла, подвергнутая менее продолжительному голоданию, выживающая в благоприятных условиях питания без добавления к среде перекиси водорода (табл. 1). При этом оказалось, что такая хлорелла реагирует на добавление капли 1-процентной перекиси водорода как нормальная, неповрежденная водоросль, т. е. поглощает меньше кислорода, чем в контроле без перекиси. Но при добавлении 1 капли раствора перекиси водорода в концентрации менее 1% эта же хлорелла, напротив, реагирует как поврежденная, т. е. поглощает больше кислорода, чем в контроле. Между тем, действительно, нормальная, не поврежденная голоданием водоросль в данном случае поглощает меньше кислорода, чем в контроле на воде (табл. 2).

Таким образом, по действию внесенной извне перекиси водорода на поглощение кислорода при дыхании можно определить сравнительную потреб-

ность аэробной клетки в перекиси водорода, т. е. выявить степень обеспеченности дыхания клетки перекисью водорода.

Подобная зависимость между потребностью растительной клетки в перекиси водорода и действием последней на поглощение кислорода при дыхании была обнаружена также у проростков листьев пшеницы. Набухшие в воде семена пшеницы прорастали в строго аэробных условиях на влажной фильтровальной бумаге, смачиваемой в контроле водопроводной водой, а в опыте — слабым (0,01—0,005%) водным раствором перекиси водорода. Испытание 3—4-дневных проростков показало, что перекись водорода вызывает увеличение их сухой массы в среднем на 5—10% по сравнению с водным контролем. По-видимому, внесенная извне перекись водорода при свободном доступе кислорода воздуха индуцирует реакции переноса водорода, связанные с процессами биосинтеза клеточных веществ проростка из запасных веществ семени, и вызывает их усиление.

Таблица 2*

Поглощение O_2 хлореллой в различные сроки голодания при действии H_2O_2 , μ л/час на 10^9 клеток

Срок, сутки	Контроль	Опыт, H_2O_2	Концентрация H_2O_2 , %	Число капель H_2O_2 на 50 мл раствора
0	25	38	<1	2
0	31	27	1	2
1	26	21	1	2
2	22,5	28,2	1	2
3	15,2	17,5	1	2
7	13	18	1	2

* Средние данные из 10 опытов.

Таблица 3*

Поглощение O_2 проростками пшеницы при действии H_2O_2 в концентрации 0,01%, μ л/час на 0,5 г сырого веса

Срок, сутки	Контроль	Опыт, H_2O_2
1	84,64	96,93
2	100,00	109,71
3	92,00	101,50
4	100,60	117,70

* Средние данные из 10 опытов.

Данные определения дыхания проростков пшеницы при снабжении их перекисью водорода показали более интенсивное поглощение кислорода, чем у контрольных проростков, выросших на водопроводной воде (табл. 3). Это также объяснимо с точки зрения данных об участии перекиси водорода в окислительно-восстановительных реакциях клетки.

Подобным же образом были исследованы листья пшеницы. Испытанию подвергались срезанные участки листьев. Одни участки были взяты у оснований молодых листьев и находились в состоянии роста, а другие — срезаны вблизи верхушек более старых листьев. Опытные участки листьев весом 0,5 г выдерживались при аэробных условиях в течение 30 мин. на 0,01% водном растворе перекиси водорода, который затем смывался с их поверхности водой, и испытывались в аппарате Варбурга на дыхание. В контроле участки листьев такое же время находились на водопроводной воде. Определения показали, что молодые, растущие участки листьев, поглотившие перекись водорода, потребляют больше кислорода, чем соответствующие участки листьев в контроле на воде. Так, в среднем по данным 10 опытов, растущими участками листьев, обработанных H_2O_2 , поглощается 114 μ л O_2 в 1 час на 0,5 г сырого веса, а в контроле на воде 104 μ л O_2 в 1 час. Напротив, участки более старых листьев, поглотившие перекись водорода, потребляют меньше кислорода, чем соответствующие участки листьев в водном контроле. А именно, в среднем по данным шести опытов, выросшими участками листьев при воздействии H_2O_2 поглощается 80 μ л O_2 в 1 час на 0,5 г сырого веса, а в водном контроле 88 μ л O_2 в 1 час. Это объясняется тем, что молодые, растущие листья, подобно проросткам пшеницы, не обеспечены оптимально перекисью водорода, образуемого при дыхании. Поэтому поглощенная ими извне перекись водорода выступает в реакции

индуцированного переноса водорода и вызывает усиленное поглощение кислорода. Напротив, выросшие, более старые листья пшеницы обеспечены перекисью водорода дыхания. Поэтому последняя, поглощаясь извне, оказывается избыточной и разлагается каталазой растения с выделением молекулярного кислорода, что приводит к кажущемуся снижению его поглощения при дыхании.

Институт физики им. Л. В. Киренского
Сибирского отделения Академии наук СССР
Красноярск

Поступило
28 X 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. А. Гуревич, И. Н. Трубачев, ДАН, 157, № 2, 467 (1964). ² Д. М. Михлин, Биохимия клеточного дыхания, М., 1960. ³ А. А. Гуревич, ДАН, 145, № 2, 443 (1962). ⁴ А. А. Гуревич, И. Н. Трубачев, М. С. Рерберг, ДАН, 156, № 2, 457 (1964). ⁵ Т. В. Хрипач, А. А. Гуревич, Т. В. Горбунова, Сборн. Биология и культура микроорганизмов, Красноярск, 1969.