

УДК 581.131

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

Д. А. ЗАКРЖЕВСКИЙ, Ю. Е. КАЛАШНИКОВ

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДЕЛЬНОГО АНАЭРОБНОГО
ПОТЕНЦИАЛА И ЭЛЕКТРОДНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК
РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ, СТОЯЩИХ НА РАЗНЫХ
ЭТАПАХ ЭВОЛЮЦИИ***(Представлено академиком А. И. Опариным 13 X 1972)*

Фотосинтез с выделением молекулярного кислорода современных растений возник в результате длительной эволюции различных типов обмена веществ. Первые биохимические процессы были анаэробными, протекали в восстановительной среде, и доминирующая роль среди ферментов, катализирующих их метаболизм, принадлежала редуктазам (¹⁻³). Напротив, фотосинтез зеленых растений является строго аэробным процессом, протекает в окислительной среде, и в их обмене существенную роль играют оксидазы. Предполагается, что в некоторых случаях возникающие в процессе эволюции новые биохимические реакции не исключали полностью прежние звенья обмена, а, дополняя, как бы наслаивались на них (^{1, 4, 5}). Действительно, большинство низкоорганизованных фотоавтотрофов, какими являются, например, водоросли, кроме фотосинтеза способны в определенных условиях и к фоторедукции — восстановлению двуокиси углерода по типу обмена, близкому к бактериальному фотосинтезу (⁶). Таким образом, они сохранили как рудимент ферментативную систему, характерную для эволюционно более древнего типа обмена. Не случайно способность к фоторедукции впервые наблюдали на синезеленых водорослях (⁷), наиболее древних в эволюционном отношении и, по-видимому, в большей степени сохранивших предшествующий тип обмена по сравнению с зелеными растениями.

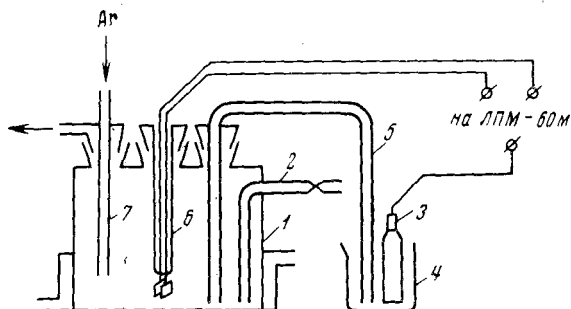
Эволюция фотосинтетического аппарата сопровождалась изменением окислительно-восстановительных свойств внешней среды, что, в свою очередь, могло сказаться и на окислительно-восстановительных свойствах растительных организмов. Поэтому представляло большой интерес в качестве первого шага исследования сравнить восстановительную способность организмов, принадлежащих к различным эволюционным группам.

Работа проведена на нефотосинтезирующем микроорганизме клостридии (*Clostridium pasteurianum*), синезеленой водоросли анацистисе (*Anacystis nidulans*), зеленых водорослях хламидомонасе (*Chlamydomonas reinhardi*) и хлорелле (*Chlorella* sp. K) и высшем растении горохе (*Pisum sativum* L.). Критерием выбора объектов исследования была их способность к фоторедукции. Кроме того, учитывалась длительность инкубационного периода, необходимого для анаэробной адаптации организмов. Так, все синезеленые водоросли легко переходят на фоторедукцию, а среди зеленых лишь отдельные представители (⁸). Вопрос об анаэробной адаптации высших растений в настоящее время окончательно не выяснен (^{9, 10}). Период, необходимый для адаптации к анаэробизму, колеблется от десятка минут (хламидомонас) до десятков часов (хлорелла).

Приемы культивирования микроорганизмов и водорослей заимствованы из работ (¹¹⁻¹⁴). Клетки собирали в логарифмической фазе роста. Затем их отделяли от среды центрифугированием при 4000 g в течение 30 мин.

и ресуспендировали в 0,067 М фосфатном буфере (рН 7,2), содержащем 0,08 М КСl. Эту операцию повторяли дважды. Полученную таким образом суспензию клеток использовали в опытах. В эксперименты с высшими растениями брали листья 12–14-дневных проростков гороха. Для получения гомогената листья растирали в ступке с 0,067 М фосфатным буфером и отжимали через двойной слой плотной полотняной ткани. Пробы бактерий и водорослей выравнивали по числу клеток, зеленых водорослей и гомогената листьев — по хлорофиллу.

Рис. 1. Схема потенциометрической ячейки. 1 — корпус ячейки с рубашкой охлаждения; 2 — боковой отросток с краном для введения проб; 3 — каломельный электрод; 4 — стакан с насыщенным раствором КСl; 5 — электролитический мостик из агар-агара; 6 — платиновый электрод; 7 — трубка для продувки ячейки аргоном



Окислительно-восстановительные свойства организмов характеризовали по величине предельного анаэробного потенциала (п.а.п.), который устанавливается в суспензии клеток в темноте (¹⁵). Перед началом измерений исследуемые образцы освобождали в специальной кювете от кислорода с помощью форвакуумного насоса и последующей продувки очищенным аргоном марки «А». Затем образцы помещали в измерительную ячейку установки (рис. 1). В этой ячейке также поддерживали анаэробные условия за счет непрерывной продувки аргона. Величину п.а.п. определяли методом потенциометрии (¹⁶). Выбор именно этого метода обусловлен тем, что, в отличие от полярографического, калориметрического, а также метода поляризационных кривых, потенциометрический метод позволяет вести исследования и в тех случаях, когда неизвестно, какая из окислительно-восстановительных систем определяет потенциал среды. Только применение этого метода позволяет получить интегральную величину потенциала. Возможность непрерывной регистрации изменений потенциала во времени позволяла получить два параметра — конечное значение потенциала платинового электрода в изучаемой системе и время, за которое этот потенциал устанавливается. Последняя величина характеризует электродную активность системы (э.а.с.). Разность потенциалов между платиновым и каломельным электродами измеряли на ламповом потенциометре ЛМП-60, скоординированном с самописцем КСП-4. Для стабилизации активности клеток во времени опыты проводили при пониженной температуре (8–10°).

Для выявления различий в окислительно-восстановительных свойствах клеток организмов, стоящих на разных этапах эволюции, были созданы анаэробные условия в нейтральной газовой среде (Ar). Величины предельных анаэробных потенциалов, которые устанавливаются в суспензиях целых клеток клостридиума, анаэробного хламидомонасы, хлореллы и в гомогенате листьев гороха в темноте в атмосфере аргона, представлены на рис. 2.

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, п.а.п. суспензии клеток микроорганизма клостридиума, для которого характерны восстановительные условия обитания, имеет величину порядка — 630 мв. Напротив, у фотосинтезирующих растений, обитающих в окислительных условиях среды, устанавливается гораздо менее отрицательный потенциал. У всех исследо-

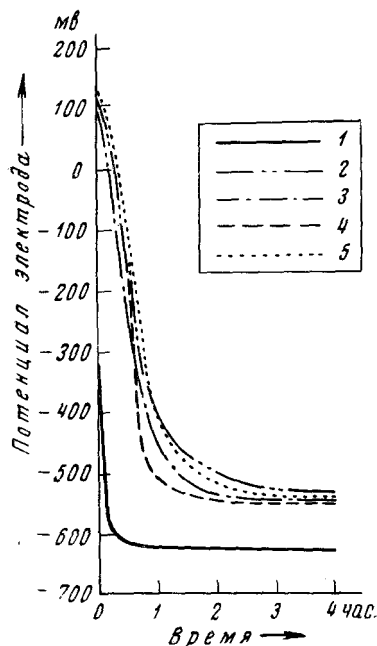


Рис. 2. Предельные анаэробные потенциалы различных растительных организмов. 1 — *Clostridium Pasteurianum*; 2 — *Anacystis nidulans*; 3 — *Chlamydomonas reinhardtii*; 4 — *Chlorella* sp. K.; 5 — *Pisum sativum* L.

ванных фотосинтезирующих форм, независимо от их эволюционного положения, величина п.а.п. практически одинакова и равна приблизительно -530 мВ. Таким образом, переход от анаэробного типа питания к аэробному сопровождается перепадом в величинах п.а.п., равным приблизительно -100 мВ. Из кривых, представленных на рис. 2, также видно, что клетки фотосинтезирующих растений значительно менее электродиоактивны, чем клетки нефотосинтезирующих бактерий. Так, п.а.п. в суспензии клеток клостридиума устанавливается практически сразу же после начала измерений. Величина п.а.п. в суспензиях клеток водорослей и высших растений выходит на плато только через 3–4 часа после начала измерений. Среди фото-

синтезирующих растений выбранная методика измерений не позволила выявить значительных различий в характере изменений э.а.с. во времени.

Полученные данные о различии э.а.с. нефотосинтезирующих и фотосинтезирующих форм были подтверждены результатами опытов по восстановлению метиленовой сини (МС) в темноте клетками этих организмов. Ниже представлены результаты экспериментов (мин):

Степень восстановления метиленовой сини, %	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Клостридиум	2,1	2,8	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,2	6,8	10
Хламидомонас	56	112	155	190	220	250	275	305	354	480

Как видно из результатов опытов, клетки клостридиума уже через 10 мин. восстанавливают краситель полностью. Суспензиям же клеток хламидомонасы для того, чтобы обесцветить МС лишь на 10%, требуется около 1 часа, а на 50% — приблизительно 4 часа. Для полного восстановления МС клетками хламидомонасы в условиях эксперимента было необходимо 8 час. Эти данные свидетельствуют о том, что клетки фотосинтезирующих автотрофов почти в 50 раз менее электродиоактивны, чем клетки облигатных анаэробных гетеротрофов.

Таким образом, целые клетки растений, развивающихся за счет фотосинтеза в окислительных условиях, существенно отличаются по своим окислительно-восстановительным свойствам от клеток нефотосинтезирующих гетеротрофов, обитающих в восстановительных условиях среды. Эволюция при переходе от анаэробного к аэробному типу обмена сопровождалась уменьшением отрицательного предельного анаэробного потенциала системы и ее электродной активности.

Авторы выражают глубокую благодарность В. М. Кутюрину за ценные советы и внимание к работе.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. И. Опарин, Возникновение и начальное развитие жизни, М., 1966.
- ² Бернал, Возникновение жизни, М., 1969.
- ³ М. Кальвин, Химическая эволюция, М., 1971.
- ⁴ M. Flogkin, Biochemical Evolution, N. Y., 1949.
- ⁵ Flogkin, H. Messon, Comparative Biochemistry, N. Y., 1949.
- ⁶ Е. Рабинович, Фотосинтез, 1, М., 1951.
- ⁷ Д. И. Сапожников, Биохимия, 2, 5, 730 (1937).
- ⁸ М. В. Удубекова, Усп. совр. биол., 61, 2, 294 (1966).
- ⁹ Д. А. Закржевский, Особенности фиксации двуокиси углерода ($C^{14}O_2$) листьями высших растений в атмосфере молекулярного водорода. Автореф. кандидатской диссертации, Бот. инст. им. В. Л. Комарова АН СССР, 1968.
- ¹⁰ Д. А. Закржевский, Л. Н. Розопова, В. М. Кутюрин, Физиол. раст. 19, 6, 1208 (1972).
- ¹¹ В. Т. Емцев, Некоторые вопросы морфологии и физиологии азотфиксирующих Clostridium., М., 1959.
- ¹² М. В. Гусев, М. М. Теличенко, В. Д. Федоров, В сборн. Биология синезеленых водорослей, М., 1964, стр. 55.
- ¹³ В. Г. Ладыгин, Пигментные мутанты как модельная система для изучения структуры и функции хлоропластов, Автореф. кандидатской диссертации, Инст. биол. физики АН СССР, 1970.
- ¹⁴ М. Г. Владимиров, В. Е. Семеновко, Интенсивная культура одноклеточных водорослей, М., 1962.
- ¹⁵ Р. Вюрмзер, Биологическое окисление и восстановление, М., 1935.
- ¹⁶ М. С. Захарьевский, Оксидометрия, Л., 1967.