

В. М. ЛУПАНОВ, В. М. КУТЮРИН, П. А. ТРИФОНОВА,
Е. А. АФАНАСЬЕВ

**К ВОПРОСУ О ЧИСЛЕ ФОТОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ,
НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ПРОЦЕССА
РАЗЛОЖЕНИЯ ВОДЫ И ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА
РАСТЕНИЯМИ ПРИ ФОТОСИНТЕЗЕ**

(Представлено академиком А. П. Виноградовым 29 XII 1972)

Одним из важнейших вопросов механизма разложения воды растениями при фотосинтезе является вопрос о числе фотохимических реакций, необходимых для осуществления процесса разложения воды, включающего окисление воды и формирование молекулярного кислорода. Как отмечалось одним из нас (^{1, 2}), результаты исследования кинетики и механизма формирования молекулярного кислорода при фотосинтезе отражают эффективность процесса разложения воды лишь в первые моменты освещения после длительного пребывания растений в темноте. В стационарном состоянии выделения кислорода (которое устанавливается в различные отрезки времени от секунд до нескольких минут в зависимости от вида растений и их физиологического состояния) скорость разложения воды и выделения кислорода лимитируется скоростью оттока электронов от второй фотохимической системы хлоропластов, которая и разлагает воду.

Ранее было показано, что при импульсном освещении растений, находившихся длительное время (не менее 5—6 мин.) в темноте, кислород фотосинтеза выделяется лишь после двух вспышек длительностью 10^{-4} сек. (^{3, 4}) и после трех вспышек продолжительностью 10^{-9} — 10^{-5} сек. (^{5, 6}). При использовании модулированного освещения в сочетании с предварительным освещением клеток импульсами света продолжительностью 10^{-4} — 10^{-5} сек. наблюдалась зависимость скорости выхода кислорода на модулированный свет от количества предварительно поданных в опыте импульсов света. Эта зависимость имела периодический характер с периодом, равным четырем импульсам. Это дало повод предположить существование 4 фотореакций, необходимых для осуществления процесса выделения O_2 хлоропластами (⁷). Однако модулированное освещение, при котором наблюдалось изменение выхода кислорода само по себе могло быть дополнительным активатором фотохимических процессов.

В опытах с импульсным освещением (⁶) предварительное выдерживание растений в темноте не превышало 5—6 мин., что могло привести к сохранению промежуточных неустойчивых и устойчивых фотопродуктов и снизить число вспышек света, необходимых для выделения кислорода. Поэтому мы поставили задачу исследовать выделение кислорода растениями на отдельные вспышки в зависимости от продолжительности предварительного темнового интервала и длительности вспышки.



Рис. 1. Осциллограмма выхода кислорода на 3-ю вспышку после 20-минутного пребывания водорослей в темноте. Длительность вспышки 2 мксек.

Выделение кислорода на отдельную вспышку регистрировали на созданной нами установке, работающей по принципу скоростной дифференциальной кулонометрии при контролируемом потенциале. Клетки *Scenedesmus obliquus* (6×10^6 клеток) помещали на платиновый электрод в ячейке, аналогичной описанной в работе (8), и освещали импульсами света длительностью 2 мсек на уровне 0,5 амплитудного значения (7 мсек на уровне 0,1) и энергией 0,5 дж («короткая» вспышка) или импульсами

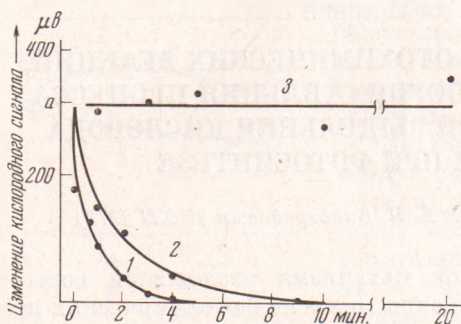


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость выхода кислорода на 1-ю (1), 2-ю (2) и 3-ю (3) вспышку от длительности предварительного выдерживания клеток в темноте. *a* — устойчивый уровень выхода кислорода после 15 вспышек $5,0 \pm \pm 0,3 \cdot 10^{-11}$ г ($6,4 \cdot 10^6$ клеток). Интервал времени между вспышками 10 сек.

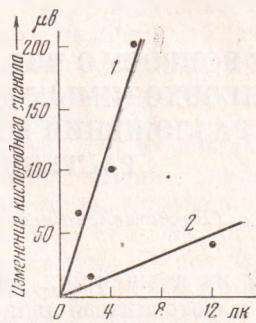


Рис. 3

Рис. 3. Уровень выхода кислорода на первую вспышку в зависимости от уровня предварительного освещения красным светом (время освещения ≥ 10 мин). 1 — $\lambda = 698 \pm 6$ мμ; 2 — $\lambda = 718 \pm 6$ мμ

света длительностью 20 мсек на уровне 0,5 (70 мсек на уровне 0,1) с энергией 36 дж («длинная» вспышка) после выдерживания в темноте в интервале 0,15 — 180 мин. в аэробных и анаэробных условиях. Предварительные опыты показали, что анаэробноз не влияет на характер зависимости выделения кислорода.

При длительности темнового интервала ≥ 20 мин. выделение кислорода происходило только после третьей вспышки (длительностью 2 мсек) (см. рис. 1). Критерием отсутствия выделения кислорода на 1 и 2 вспышку после длительного темнового интервала было принято отсутствие сигнала, превышающего уровень шумов, в то время как выходной сигнал на 3 вспышку превышает уровень шумов в 50—100 раз. При использовании «длинных» вспышек (20 мсек) наблюдали выделение (хотя и слабое) кислорода после второй вспышки независимо от продолжительности пребывания водорослей в темноте, по-видимому, связанное со значительной величиной энергии хвоста «длинной» вспышки (70 мсек на уровне 0,1), позволяющей проходить следующей (третьей) фотореакции. Именно эта причина привела авторов (3) к выводу о необходимости двух вспышек и двух фотореакций при использовании вспышек длительностью 100 мсек и более. Необходимость трех вспышек для выделения кислорода была показана также при использовании вспышек света длительностью 2×10^{-9} сек. (6). Таким образом, можно полагать, что для осуществления процесса разложения воды клетками с выделением кислорода после длительного темнового интервала необходимы три фотореакции.

Возникает вопрос о том, можно ли все три фотореакции отнести к функционированию одного фотохимического центра или двух, например, центров двух фотосистем хлоропластов. Как известно, еще нет достоверных сведений о механизме участия центров и характере промежуточных продуктов, участвующих в механизме выделения кислорода.

В качестве первого шага к изучению природы промежуточных продуктов, образующихся при импульсном освещении, было проведено сравнение их устойчивости. С этой целью определяли выход кислорода на первую, вторую и третью вспышки, в зависимости от продолжительности темнового интервала перед ними. После каждого темнового интервала давались три «коротких» вспышки света подряд с интервалом в 1—10 сек. и регистрировался выход O_2 на каждую вспышку.

Как видно из рис. 2, выход O_2 на 1 и 2 вспышку с увеличением темнового интервала падал, в то время как выход на 3 вспышку оставался постоянным. Важно отметить постоянный выход O_2 на третью вспышку и, следовательно, его независимость от различного уровня начальных концентраций промежуточных продуктов, который варьировался благодаря изменению длительности пребывания водорослей в темноте.

Таким образом, приведенные результаты доказывают существование 2 промежуточных неустойчивых состояний и необходимость трех фотореакций. Причем нет необходимости рассматривать 4 фотореакции, так как выделение O_2 происходит на 3 вспышку даже после 2—3 час. пребывания водорослей в темноте.

Вторым этапом было сравнение влияния фонового освещения 700 и 720 м μ на выделение кислорода при импульсном освещении. Выяснилось, что в обоих случаях действие фона в течение 10—20 мин. заменяет действие двух первых вспышек и выделение кислорода происходит сразу после первой «короткой» вспышки. Как видно из рис. 3, интенсивность выделения кислорода на вспышку была пропорциональной интенсивности фонового освещения, которое само по себе не вызывало выделения кислорода для λ 718 м μ (по контрольным опытам). Поскольку нами не проводилось измерение числа поглощенных квантов, а в области 700—720 м μ происходит резкое падение поглощающей способности растительных клеток, то мы не можем сказать, как в действительности уменьшается эффективность действия фонового освещения с увеличением длины волны падающего света. Во всяком случае, с поправкой на число поглощенных квантов уровень активности, наблюдаемый нами для фонового освещения 720 м μ , по-видимому, был бы значительно больше. В обоих случаях можно говорить об участии длинноволновой формы (или форм) хлорофилла в механизме образования активных промежуточных состояний, необходимых для функционирования процесса разложения воды в хлоропластах.

Институт геохимии и аналитической химии им. В. И. Вернадского
Академии наук СССР
Москва

Поступило
19 XI 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ В. М. Кутюрин, Изв. АН СССР, сер. биол., № 4, 569 (1970). ² В. М. Кутюрин, В сборн. Механизм дыхания, фотосинтеза и фиксации азота, «Наука», 1967, стр. 248. ³ F. Allen, J. Frank, Arch. Biochem. and Biophys., 58, 124 (1955). ⁴ C. P. Wittingham, P. M. Bishop, Nature, 192, 426 (1961). ⁵ C. Weiss, K. Sauer, Photochem. Photobiol., 11, 495 (1970). ⁶ C. Weiss, J. Kenneth et al., Biochim. biophys. acta, 253, 298 (1971). ⁷ B. Forbush, B. Kok, M. P. McGlorin, Photochem. Photobiol., 14, № 3, 307 (1971). ⁸ P. Joliot, Biochem. biophys. acta, 102, 116 (1965).