

УДК 576.851.12+584.132

БИОХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, Н. Д. СЕМЕНОВИЧ

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО СУЩЕСТВОВАНИЯ ПРОЦЕССА ОБНОВЛЕНИЯ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

Установлено, что хлорофилл зеленых растений подвергается непрерывному процессу обновления с самого появления в начинающих зеленеть этиолированных проростках и до поздних стадий онтогенеза взрослых, закончивших рост листьев (^{1, 2}). В отношении же бактериохлорофилла вопрос о существовании его обновления остался совершенно не исследованным. Настоящая работа посвящена его решению на примере пурпурных фотосинтезирующих бактерий.

Исследования проводили с помощью радиоизотопного метода на культуре *Chromatium minutissimum*, которую выращивали на среде Ларсена с 0,2% CH_3COONa (³) в анаэробных условиях при 30° и освещении 2000 лк. В опытах использовали культуру в возрасте 4 суток. Клетки отделяли от питательной среды центрифугированием в течение 20 мин. при 5000 *g*, промывали дистиллированной водой, опять осаждали, полученный осадок ресуспендировали по (⁴) в 1/15 *M* натрий-калий фосфатном буфере (pH 6,8) с добавлением $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$ (⁵) и инкубировали в течение 2 час. в тех же условиях, при которых выращивали культуру, с постоянным перемешиванием. Бактериохлорофилл экстрагировали из осажденных клеток метанолом. Очистку пигмента производили по (⁶) с помощью многократного хроматографирования (сначала 1 раз хроматографировали бактериохлорофилл, а затем еще 4 раза — полученный из него бактериофеофитин) на бумаге в меняющихся смесях растворителей. Ранее было показано (⁶), что использованная методика приводит к достаточной радиохимической чистоте препаратов.

Таблица 1

Удельная радиоактивность (имп/мин на $\mu\text{г}$ С) и содержание бактериохлорофилла ($\mu\text{г}$ в 1 мл суспензии) до и после инкубирования клеток *Chromatium minutissimum* в течение 2 час. в присутствии $\text{Na}_2\text{C}^{14}\text{O}_3$

	Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3	Опыт 4	Опыт 5
Удельная радиоактивность	4,0	9,0	3,6	6,4	5,5
Количество бактериохлорофилла	80,5	48,4	31,6	37,9	42,5
До инкубирования					
После инкубирования	78,8	47,0	30,8	38,8	44,7

В течение 2 час. инкубации в суспензии не происходило заметного изменения количества пигмента: среднее отношение его содержания после инкубирования к исходной величине составило $1,0 \pm 0,02$. Тем не менее в его составе было надежно обнаружено значительное количество C^{14} (табл. 1). Это означает, что часть молекул пигмента была синтезирована за счет ассимилированного меченого углерода и образование новых молекул сопровождалось разрушением части уже имеющихся, т. е. одновременно наблюдались распад и синтез молекул бактериохлорофилла, что и является свидетельством протекания процесса обновления (^{7, 8}).

Аналогичные результаты были получены в опытах с культурой *Rhodospseudomonas spheroides* (6).

Сделанное заключение следовало, однако, подтвердить дальнейшими исследованиями, так как отсутствие видимого накопления бактериохлорофилла в этих опытах все же не полностью исключало возможность допустить, что в какой-то очень малой степени оно все же происходило и могло обусловить наблюдаемое включение изотопа. Поэтому было проведено несколько серий опытов, в которых после 2 час. ассимиляции C^{14} клетки *Chr. minutissimum* удаляли из среды, содержащей изотоп, промывали дистиллированной водой и переносили в стеклянные флаконы с нерадиоактивной средой Ларсена (3) для дальнейшего роста и развития. Удельную радиоактивность (у.а.) и количество бактериохлорофилла в 1 мл культуры, а соответственно и величину общей радиоактивности (о.а.) пигмента определяли в пробах, взятых сразу после переноса и через некоторый период роста клеток.

В первых сериях опытов клетки, перенесенные на нерадиоактивную среду, постоянно оставались в одной и той же культуре. Как показано на рис. 1А, сразу после переноса происходило сначала снижение количества пигмента в единице объема культуры, возможно, потому, что клетки некоторое время приспосабливались к среде и часть их погибла. В дальнейшем идет накопление бактериохлорофилла. Использование в опыте экспозиции в течение нескольких дней (рис. 1Б) показало, что оно продолжается довольно длительно до установления почти постоянного уровня, как это характерно для поведения бактериальных культур на жидкой среде.

Удельная радиоактивность, измеренная после 2 час. культивирования ассимилировавших C^{14} клеток *Chr. minutissimum* на нерадиоактивной среде, увеличилась и, пройдя через максимум, начала постепенно уменьшаться (рис. 1А).

Начальное возрастание у.а. свидетельствует о протекании синтеза новых молекул бактериохлорофилла с использованием предшественников, образованных при ассимиляции клетками радиоактивного углерода и все еще характеризующихся более высоким содержанием C^{14} , хотя в этот период клетки уже начали ассимилировать немеченный углерод. Усвоение C^{12} приводит далее к образованию предшественников со все более низкой активностью, использование которых для образования бактериохлорофилла способствует снижению у.а. пигмента, проявляющемуся уже через 3—4 часа после посева клеток на нерадиоактивную среду. Это снижение особенно существенно к исходу первых суток (рис. 1Б). Такой ход кривой наблюдали ранее для хлорофиллов а и в в опытах с зелеными растениями (1, 9—12), но максимум у.а. этих пигментов обнаруживается обычно после более длительного периода усвоения листьями растений немеченой углекислоты.

Общая радиоактивность, представляющая произведение у.а. на количество бактериохлорофилла, содержащегося в 1 мл исследуемой культу-

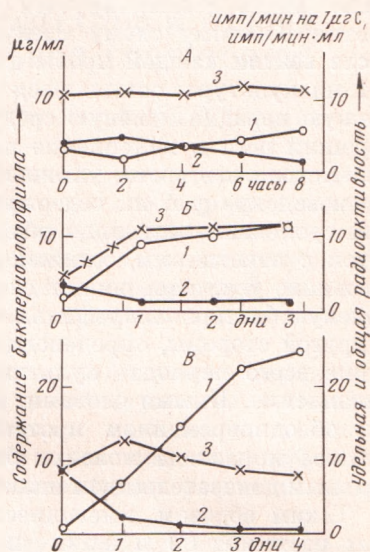


Рис. 1. Изменение количества, удельной и общей радиоактивности бактериохлорофилла после переноса (А) ассимилировавших C^{14} клеток *Chromatium minutissimum* на нерадиоактивную среду Ларсена и при культивировании их на этой среде (без замены среды в течение опыта (Б)), и с заменой среды (В). 1 — содержание бактериохлорофилла, 2 — удельная радиоактивность, 3 — изменение общей радиоактивности

ры, оставалась в течение 8 час. приблизительно на одном уровне (рис. 1А), но при выращивании ассимилировавших C^{14} клеток на нерадиоактивной среде более длительное время (рис. 1Б) отчетливо наблюдалось ее возрастание в течение первых суток, после чего она сохранялась почти неизменной.

Такие результаты могут быть объяснены тем, что в описанных условиях культивирования меченых клеток *Chr. minutissimum* радиоактивный углерод, удаляемый в процессе обновления пигмента и других веществ из их разрушающихся молекул, но остающийся в постоянной среде, опять ассимилируется и повторно включается в обмен веществ клетки. Поэтому схему следующей серии опытов несколько изменили: после взятия каждой пробы для определения у.а. и количества пигмента в 1 мл культуры оставшуюся часть клеток переносили каждый раз в свежую нерадиоактивную среду Ларсена. В этих условиях был обеспечен хороший рост и накопление пигмента (рис. 1В). Измерения у.а. показали, что она все время уменьшается, приближаясь в конце опыта к нулю. Производство у.а. на содержание бактериохлорофилла в 1 мл исследуемой суспензии позволило обнаружить увеличение о.а. в течение первых суток с отчетливым снижением в последующие дни. Наблюдаемое снижение о.а. однозначно свидетельствует о постепенном разрушении молекул бактериохлорофилла с потерей содержащегося в их составе C^{14} . С другой стороны, определения содержания пигмента показали, что в течение всего периода культивирования происходило интенсивное его накопление. Иными словами, полученные данные с несомненностью говорят об одновременном протекании двух противоположных процессов — синтеза и распада молекул бактериохлорофилла, т. е. являются окончательным доказательством наличия его обновления.

Таким образом, имеющиеся данные об обновлении хлорофилла зеленых растений ⁽¹⁾ и наши исследования, проведенные на культурах *Rh. spheroides* ⁽²⁾ и *Chr. minutissimum*, приводят к общему заключению, что этот процесс является характерным для хлорофилловых пигментов всех фотосинтезирующих организмов.

Институт фотобиологии
Академии наук БССР
Минск

Поступило
5 III 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1963.
² А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др. ДАН, 207, № 5, 1243 (1972). ³ Е. Н. Кондратьева, Фотосинтезирующие бактерии, Изд. АН СССР, 1963. ⁴ И. И. Чернядьев, Е. Н. Кондратьева, Г. Н. Доман, Изв. АН СССР, сер. биол., № 5, 670 (1969). ⁵ А. А. Шлык, Н. Д. Семенович, ДАН, 204, № 2, 479 (1972).
⁶ А. А. Шлык, Н. Д. Семенович, Весті АН БССР, сер. Біял. навук, № 3, 47 (1972). ⁷ А. А. Шлык, Метод меченых атомов в изучении биосинтеза хлорофилла, Минск, 1956. ⁸ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко, Т. В. Кухтенко, Докл. АН БССР, 6, 3, 189 (1962). ⁹ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко и др., Физиол. раст., 7, 6, 625 (1960). ¹⁰ А. А. Шлык, Я. П. Ляхнович и др., Бюлл. инст. биол. АН БССР за 1958 г., 4, 100 (1960). ¹¹ А. А. Шлык, В. И. Гапоненко, Т. В. Кухтенко, Бюлл. инст. биол. АН БССР за 1959 г., 5, 131 (1960). ¹² А. А. Шлык, В. И. Гапоненко, Т. В. Кухтенко, Физиол. раст., 9, 5, 521 (1962).