

УДК 541.144.7:577.471+577.471:546.11

БИОХИМИЯ

Д. А. ЗАКРЖЕВСКИЙ, Ю. Е. КАЛАШНИКОВ, Р. С. СИНЯКОВА, **В. М. КУТЮРИН**

## К ВОПРОСУ О РОЛИ ЭКЗОГЕННОГО ВОДОРОДА ПРИ ФОТОРЕДУКЦИИ ВОДОРΟΣЛЕЙ

(Представлено академиком А. И. Опарным 5 II 1975)

Обнаруженное ранее <sup>(1)</sup> явление специфической инактивации кислород-выделяющей системы зеленых растений в атмосфере молекулярного водорода при сохранении способности хлоропластов к переносу электронов от воды вновь привлекло наше внимание к вопросу о роли  $H_2$  при фоторедукции. Возможность разобщения процессов окисления  $H_2O$  и формирования молекулярного кислорода свидетельствовала, казалось бы, в пользу того, что и при фоторедукции роль  $H_2$  сводится к инактивации кислородвыделяющей системы и  $H_2$  используется для восстановления гидроксильных радикалов. Вместе с тем, большинство авторов полагают, что  $H_2$  при фоторедукции является первичным источником электронов и разложения  $H_2O$  при этом не происходит. Вопрос усложняется и тем обстоятельством, что при фоторедукции иногда наблюдали остаточный фотосинтез, который можно было объяснить неполной инактивацией процесса выделения  $O_2$  <sup>(2)</sup>. В связи с этим целью нашего исследования было выяснить роль экзогенного  $H_2$  при фоторедукции и его отношение к процессу разложения  $H_2O$ . Для этого проведено сравнительное изучение действия ингибиторов фотосинтетического разложения  $H_2O$  и ингибиторов электронного транспорта фотосистемы II (ф.с. II) на фоторедукцию и фотосинтез. Поскольку наблюдаемое отличие процесса фоторедукции от фотосинтеза сводится к отсутствию выделения  $O_2$ -функции, чувствительной к температуре, изучено влияние этого фактора на оба процесса. Об активности фоторедукции судили по количеству поглощенного  $H_2$ , об активности фотосинтеза — по количеству выделенного  $O_2$ .

Объектом исследования была одноклеточная зеленая водоросль хламидомонас (*Chlamidomonas reinhardi*), которая в обычных условиях осуществляет нормальный фотосинтез с выделением  $O_2$ , но в то же время чрезвычайно легко адаптируется к атмосфере  $H_2$  и уже через несколько минут становится способной к фоторедукции <sup>(2, 3)</sup>. Опыты проводили по следующей схеме. Культуру водорослей выращивали на непрерывном свете люминесцентных ламп ЛБЖ-80 ( $3,5 \cdot 10^4$  эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>) на жидкой питательной среде <sup>(4)</sup>, аэрируемой 2%-м  $CO_2$  при 22–25°. В опыты брали суспензию клеток в логарифмической фазе роста, отделенных от среды центрифугированием при  $3 \cdot 10^3$  g в течение 10 мин. и ресуспендированных в карбонатбикарбонатном буфере № 11 <sup>(5)</sup>. Адаптацию водорослей к атмосфере  $H_2$  проводили в темноте в течение 1 часа. В качестве контроля использовали суспензию водорослей, инкубированных в течение этого же времени в темноте, но в атмосфере инертного газа гелия. По завершении темновой инкубации как опытные, так и контрольные суспензии освещали светом лампы накаливания. Изучение фоторедукции проводили при освещенности  $3 \cdot 10^3$  эрг·см<sup>-2</sup>·сек<sup>-1</sup>. Освещенность контрольной суспензии варьировали в зависимости от задачи эксперимента. Так, при изучении остаточного фотосинтеза у водорослей, адаптированных к атмосфере  $H_2$  и осуществляю-

щих фоторедукцию, контрольные клетки экспонировали при той же освещенности, что и опытные. В остальных экспериментах (действие ингибиторов и температуры) освещение подбирали таким образом, чтобы скорость поглощения  $H_2$  фоторедуцирующими клетками и скорость выделения  $O_2$  в атмосфере нефотосинтезирующими клетками были сравнимы.  $H_2$  определяли методом манометрии,  $O_2$  — методом амперометрии (6). В первой серии экспериментов нас интересовал вопрос, как сказывается переход на фоторедукцию на способности клеток осуществлять остаточный фотосинтез.

В условиях эксперимента клетки хламидомонасы легко адаптировались в темноте к атмосфере  $H_2$  и при последующем освещении активно его поглощали. Определение  $O_2$  в этих же опытах показало, что одновременно с фоторедукцией у хламидомонасы сохраняется и процесс остаточного фотосинтеза. Его активность составляла в среднем 10–30% от скорости выделения  $O_2$  контрольными суспензиями в атмосфере  $Ne$  при той же освещенности объекта. Эти данные согласуются с результатами опытов (7), в которых

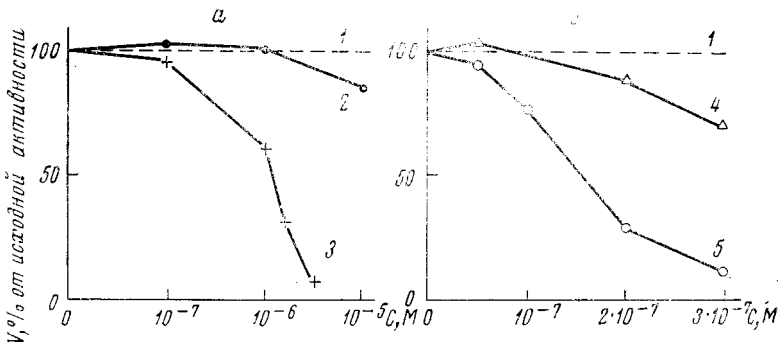


Рис. 1. Действие диурона (а) и гидроксимина (б) на процессы фоторедукции и фотосинтеза *Chlamidomonas reinhardi*. 1 — исходная активность фоторедукции и фотосинтеза в отсутствие ингибиторов, 100%; 2 — фоторедукция + ДХММ; 3 — фотосинтез + ДХММ; 4 — фоторедукция + ГКА; 5 — фотосинтез + ГКА

фоторедукцию в чистом виде удавалось наблюдать только на мутанте сценедесмуса Д<sub>3</sub>11, в темноте живущем гетеротрофно, а на свету вообще не способном к выделению  $O_2$  или на нормальных клетках, но в присутствии специфических ингибиторов кислородвыделяющего звена фотосинтеза (8–9) или при дефиците Mn в питательной среде (10).

Таким образом, адаптация клеток хламидомонасы к атмосфере  $H_2$ , включающая в себя активацию гидрогеназной системы, и переход на фоторедукцию с потреблением  $H_2$  не исключают полностью их способности к выделению  $O_2$ . У  $H_2$ -адаптированных клеток водорослей оба эти процесса могут осуществляться одновременно. Так как известно, что активность гидрогеназы *in vitro* легко инактивируется  $O_2$ , факт выделения этого газа при фоторедукции целых клеток свидетельствует о том, что гидрогеназная система функционирует *in vivo* в особых условиях, связанных скорее всего со структурной организацией клетки, защищающих ее от губительного воздействия  $O_2$ .

Поскольку в условиях эксперимента фоторедукция сопровождалась выделением  $O_2$ , источником которого может быть только  $H_2O$  (11), необходимо было выяснить, присуще ли разложение  $H_2O$  только процессу сопутствующего фотосинтеза или оно являлось составной частью и механизма фоторедукции. С этой целью в следующей серии опытов использован диурон (ДХММ).

Данные, приведенные на рис. 1а, свидетельствуют о различном действии ДХММ на фоторедукцию и фотосинтез. Так, добавление ДХММ в концентрации  $1 \cdot 10^{-7}$  M незначительно ингибировало выделение  $O_2$  контрольными клетками хламидомонасы в атмосфере  $Ne$  и несколько стимулировало по-

глощение  $H_2$  фоторедуцирующими клетками. При увеличении концентрации ингибитора до  $1 \cdot 10^{-6} M$  скорость фотосинтеза уменьшалась на  $\sim 40\%$ , поглощение же  $H_2$  при фоторедукции было сравнимым с контролем ( $-ДХММ$ ). При концентрации ДХММ  $5 \cdot 10^{-6} M$ , когда выделение  $O_2$  в атмосфере  $He$  подавлялось практически полностью, поглощение  $H_2$  оставалось еще на уровне  $80-90\%$  от исходной активности.

В другой серии опытов был использован гидроксилламин (ГКА). Действие этого ингибитора (рис. 1б) аналогично действию ДХММ (рис. 1а). При малых концентрациях ГКА ( $5 \cdot 10^{-8} - 1 \cdot 10^{-7} M$ ) поглощение  $H_2$  в противоположность фотосинтезу, незначительно стимулировалось или оставалось на исходном уровне ( $-ГКА$ ). При увеличении концентрации ГКА до  $2 \cdot 10^{-7} M$  поглощение  $H_2$  составляло еще не менее  $90\%$  от исходного уровня. Выделение  $O_2$  в атмосфере  $He$  при этой же концентрации ингибитора не превышало  $30\%$  от его начальной скорости.

Аналогично ДХММ и ГКА на фоторедукцию действует и высокая температура. Уже кратковременная (0,5 мин.) тепловая обработка при температуре  $50^\circ$  подавляла выделение  $O_2$  при фотосинтезе в атмосфере  $He$  в среднем на  $10\%$ . Напротив, поглощение  $H_2$  при фоторедукции в этих же температурных условиях стимулировалось. Увеличение продолжительности

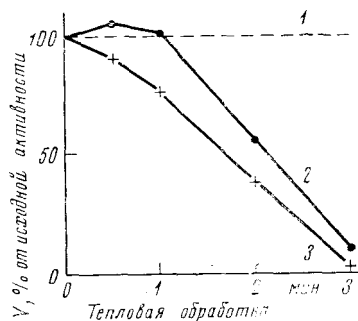


Рис. 2. Действие высокой температуры ( $50^\circ$ ) на фоторедукцию и фотосинтез *Chlamidomonas reinhardi*. 1 — исходная активность фоторедукции и фотосинтеза, 100%; 2 — фоторедукция +  $50^\circ$ ; 3 — фотосинтез +  $50^\circ$

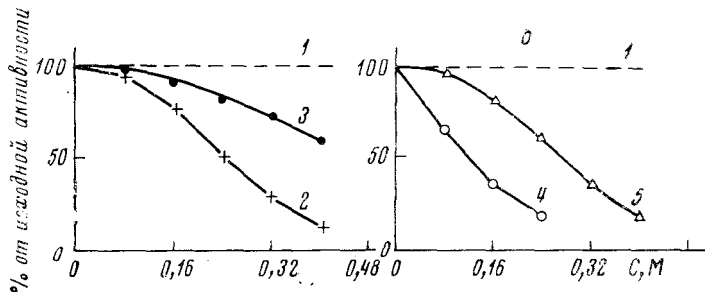


Рис. 3. Действие триса (а) и гуанидина (б) на процессы фоторедукции и фотосинтеза *Chlamidomonas reinhardi*. 1 — исходная активность фоторедукции и фотосинтеза в отсутствии ингибиторов, 100%; 2 — фоторедукция + Тр; 3 — фотосинтез + Тр; 4 — фоторедукция + ГА; 5 — фотосинтез + ГА

тепловой обработки до 1 мин. снижало выделение  $O_2$  в  $He$  приблизительно на  $20\%$  и практически не влияло на процесс фоторедукции (рис. 2).

Нечувствительность фоторедукции в определенных пределах к ДХММ и ГКА — ингибиторам фотосинтетического разложения воды <sup>(12)</sup> и к высокой температуре, которая также подавляет этот процесс <sup>(13)</sup>, указывает на то, что первичным источником электронов в процессе фоторедукции хламидомонасы является  $H_2$ . Считают, что действие  $H_2$  в процессе фоторедукции связано с функционированием фотосистемы I (ф.с.I) <sup>(3)</sup>. В связи с полученными ранее данными о специфическом действии  $H_2$  на механизм выделения  $O_2$  <sup>(1)</sup>, нам казалось интересным проверить влияние на процесс фоторедукции ингибиторов электронного транспорта ф.с.I. Для этого в следующей серии экспериментов использованы трис (Тр) и гуанидин (ГА).

Результаты опытов представлены на рис. 3. Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что действие как Тр, так и ГА на фоторедукцию и фотосинтез также различно. Однако, в отличие от ДХММ и ГКА, в данном случае к действию ингибиторов более чувствительным был процесс фоторедукции, а не фотосинтеза.

Большая чувствительность фоторедукции к Тр и ГА является новым результатом. Он свидетельствует о чувствительности этого процесса к электронному транспорту от ф.с.II. Это обстоятельство может служить указанием на то, что использование  $H_2$  как первичного источника электронов не ограничено локально действием одной ф.с.I. Его действие сопряжено и с включением в качестве донора на участке между ф.с.I и ф.с.II, активность которой затрагивается действием Тр и ГА (<sup>14</sup>). Таким образом, несмотря на то что действие самой гидрогеназной системы может быть локализовано в ф.с.I, включение  $H_2$  в метаболизм не ограничивается участком действия этой ферментной системы, а направлено и на кислородвыделяющую функцию, как это было показано нами (<sup>4</sup>), и на сопряженный участок электрон-транспортной цепи между двумя фотосистемами. Эти результаты подтверждают гипотетическую схему Кесслера, по которой включение  $H_2$  может происходить по многим звеньям электронтранспортной цепи (<sup>15</sup>). Дальнейшая разработка этого вопроса имеет особую важность в связи с тем, что  $H_2$  продуцируемый в результате жизнедеятельности растений, может быть одним из новых и весьма перспективных источников энергии. Естественно, что все аспекты, связанные с изучением взаимодействия этого элемента с фотосинтетическим аппаратом и влияния его на механизм фотохимической стадии фотосинтеза, приобретают как теоретический, так и практический интерес.

Институт фотосинтеза  
Академии наук СССР  
Пушино-на-Оке

Поступило  
21 I 1975

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

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> Д. А. Закржевский, Ю. Е. Калашников и др., В сб.: Итоги исследований механизма фотосинтеза, Пушино, 1974, стр. 115. <sup>2</sup> М. В. Улубекова, Усп. совр. биол., т. 61, 2, 294 (1966). <sup>3</sup> N. Bishop, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 17, 485 (1966). <sup>4</sup> М. Г. Владимиров, В. Е. Семенов, Интенсивная культура одноклеточных водорослей, М., 1962. <sup>5</sup> О. А. Семизагова, М. В. Чулановская, Манометрические методы изучения дыхания и фотосинтеза растений, М.—Л., 1965. <sup>6</sup> К. Н. Мансу, D. A. Ogun, C. N. Reilley, J. Electroanal. Chem., v. 4, 65 (1962). <sup>7</sup> N. Bishop, H. Gaffron, Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 8, 471 (1962). <sup>8</sup> N. Bishop, J. Cell. and Comp. Physiol., v. 50, 355 (1957). <sup>9</sup> P. Sweetsier, C. Todd, R. Herch, Biochim. et biophys. acta, v. 51, 504 (1961). <sup>10</sup> E. Kessler, Planta, v. 49, 4, 435 (1957). <sup>11</sup> В. М. Куртюпин, Изв. АН СССР, сер. биол., v. 4, 569 (1970). <sup>12</sup> G. M. Cheniae, Ann. Rev. Plant Physiol., v. 21, 467 (1970). <sup>13</sup> T. Yamashita, W. L. Buttler, Plant. Physiol., v. 43, 12, 2037 (1968). <sup>14</sup> R. Lozier, M. Baginsky, W. L. Buttler, Photochem. Photobiol., v. 14, 3, 323, (1971). <sup>15</sup> E. Kessler, Planta, v. 81, 264 (1968).