

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

А. А. ГУРЕВИЧ

**ФОТОХИМИЧЕСКИЙ МЕТОД СРАВНИТЕЛЬНОЙ
ФИТОАКТИНОМЕТРИИ**

(Представлено академиком П. А. Ребиндером 7 V 1953)

Как известно, среди световых лучей, падающих на растение при естественном или искусственном освещении, по своему физиологическому значению выделяются преимущественно те лучи спектра, которые принимают участие в фотосинтезе играют роль при формировании растения.

Обычными способами измерения лучистой энергии посредством актинометров определяется лишь общая падающая на растение радиация без выделения физиологически ценных для него световых лучей. Между тем, измерение именно последних представляет для физиологии наибольший интерес.

В 1884 г. К. А. Тимирязев (1) обратил внимание на то, что хлорофилл может «служить для устройства физиологического фотометра, измеряющего напряжение именно тех лучей света, которые играют самую важную роль в экономии растения». К этому заключению К. А. Тимирязев пришел после того, как им было установлено, что лишь поглощаемые хлорофиллом световые лучи вызывают фотосинтез.

Позднее эту мысль развил Л. А. Иванов (2), сконструировавший фитоактинометр, в котором поглотителем световых лучей является раствор хлорофилла. Этот прибор, основанный на принципе актинометра Араго-Дэви, состоит из двух термометров, из которых один содержит раствор хлорофилла в толуоле, а другой — чистый толуол. Падающие на термометры лучи нагревают толуоловый раствор хлорофилла больше, чем бесцветный толуол, на величину, соответствующую поглощенной хлорофиллом световой энергии. Так, по разности нагревания измеряется количество световой энергии, поглощаемое хлорофиллом.

Фитоактинометрия может быть основана и на другом принципе. Установленное впервые К. А. Тимирязевым (3) соответствие между поглощением световых лучей различной длины волны хлорофиллом и их участием в фотосинтезе еще в 1875 г. привело его к заключению, что хлорофилл в процессе фотосинтеза играет роль фотосенсибилизатора. Дальнейшее изучение химизма фотосинтеза, в особенности за последнюю четверть века, позволило развить это представление и привело к признанию того, что хлорофилл сенсибилизирует при фотосинтезе окислительно-восстановительную реакцию переноса водорода от воды к углекислоте или, точнее, к карбоксилу (4).

Поэтому при фитоактинометрии оправданным является использование сенсибилизированной хлорофиллом в растворе реакции переноса водорода в качестве индикаторной реакции.

Такую реакцию представляет собой описанная нами (5) фотосенсибилизированная хлорофиллом и спиртовом растворе окислительно-восстановительная реакция переноса водорода от фенилгидразина к *o*-динитробензолу, которая приводит к необратимому восстановлению последнего в *o*-нитрофенилгидроксиламин. Использование ее как индикаторной реакции возможно благодаря тому, что она сопровождается изменением окраски:

бесцветный *o*-динитробензол переходит в желтый *o*-нитрофенилгидроксиламин, который в щелочной среде приобретает красную окраску в спиртовом растворе и фиолетовую — в воде.

Как уже ранее было показано (5), в отсутствие сенсibilизатора фотовосстановление *o*-динитробензола в видимых лучах не имеет места.

На подобном же принципе — применении сенсibilизированной фотохимической реакции — основан манометрический актинометр Варбурга и Шокена (6), которым световая энергия измеряется по объему кислорода, поглощенного при сенсibilизированном порфиринами фотоокислении тиомочевины.

Индикаторный раствор в предлагаемом методе имеет следующий состав: 10 мл раствора хлорофилла в 80% этиловом спирте, 5 капель концентрированного водного раствора аммиака, 1 мл насыщенного раствора солянокислого фенилгидразина в этиловом спирте и 1 мл насыщенного спиртового раствора *o*-динитробензола. В оводненном спирте окраска, возникающая при образовании *o*-нитрофенилгидроксиламина в присутствии аммиака, хорошо видима и устойчива, в отличие от 96% спирта, где она мало заметна и обратимо исчезает при повышении температуры. Хлорофилл извлекался из сухих листьев крапивы 96% этиловым спиртом и разводился дистиллированной водой до 80% концентрации спирта. Возникающий при этом осадок отфильтровывался, а прозрачный фильтрат разводился 80% спиртом, так чтобы окраска раствора хлорофилла соответствовала окраске раствора Гетри тройной концентрации. Такой раствор хлорофилла интенсивно поглощает световые лучи и сенсibilизирует; в то же время изменение его окраски еще отчетливо заметно. Этот раствор подщелачивается аммиаком до внесения в него солянокислого фенилгидразина, чтобы последний своей кислой реакцией не вызывал разрушения хлорофилла.

Индикаторный раствор следует сохранять без доступа воздуха в плотно замкнутой склянке, так как в противном случае фенилгидразин окисляется кислородом воздуха и раствор утрачивает свою реакционную способность. В темноте в замкнутом состоянии он сохраняется без заметных изменений около суток и в течение этого срока пригоден к употреблению. Затем начинает проявляться постепенно усиливающееся побурение раствора, вызываемое самопроизвольным течением данной окислительно-восстановительной реакции.

Согласно закону фотохимической эквивалентности Эйнштейна, концентрация *o*-нитрофенилгидроксиламина, образовавшегося под воздействием света в индикаторном растворе, и, следовательно, изменение окраски последнего пропорциональны числу поглощенных хлорофиллом световых квантов. Таким образом, настоящий метод позволяет путем колориметрического испытания индикаторного раствора сравнивать число световых квантов, поглощенных хлорофиллом за единицу времени при различных условиях освещения. При этом следует иметь в виду, что по мере уменьшения концентрации донатора водорода падает, согласно определениям Гаффрона (7), квантовый выход фотохимической реакции и изменяется, таким образом, соотношение между ее скоростью и числом затраченных на нее световых квантов. Кроме того, в ходе индикаторной реакции возникает поглотитель света помимо хлорофилла — окрашенное вещество *o*-нитрофенилгидроксиламин. Поэтому экспозицию на свету пробирки с индикаторным раствором следует прекращать, как только он получает очень слабый бурый оттенок. Отмечают продолжительность экспозиции и производят колориметрическое испытание индикаторного раствора с помощью компаратора Уольполя уменьшенных размеров. Последние должны соответствовать малым размерам используемых пробирок, диаметр которых составляет 12 мм, а высота 80 мм.

Квантовый выход реакции в различных участках спектра не был исследован. Постоянство его можно считать вероятным на основании косвен-

ных данных. Определения квантового выхода другой сенсibilизированной хлорофиллом фотохимической реакции показали (7), что он имеет, так же как и квантовый выход фотосинтеза, постоянную величину в различных областях спектра, не зависящую от длины световой волны. Эти данные, полностью соответствующие закону фотохимической эквивалентности, положены в основу фотохимического метода сравнительной фитоактинометрии.

Колориметрическое определение производится, как это принято при испытании окрашенных жидкостей, на фоне исходного индикаторного раствора, в котором целесообразно заменить *o*-динитробензол равным объемом чистого спирта, чтобы окраска раствора не изменялась на свету. Колориметрической шкалой служат водные растворы двуххромовокислого калия, заполняющие плотно замкнутые пробирки вышеуказанных размеров. Для колориметрического определения применяется шкала, состоящая из раствора $K_2Cr_2O_7$ следующих концентраций (%): 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0.

Точность определения снижается в случае не вполне равномерного окрашивания индикаторного раствора. Последнее происходит под действием прямого света и, вероятно, объясняется условиями его преломления при прохождении сквозь пробирку с раствором. Поэтому пробирку с индикаторным раствором следует освещать через матовое стекло или же лучше опускать в пробирку больших размеров с матовыми стенками.

Как уже выше было указано, настоящий метод позволяет сравнивать число световых квантов, поглощенных хлорофиллом за единицу времени при различных условиях освещения. Обозначим это число квантов через N в одних и n в других условиях освещения. Концентрацию *o*-нитрофенилгидроксиламина, образовавшегося в индикаторном растворе под действием света, поглощенного хлорофиллом, выразим в концентрациях раствора $K_2Cr_2O_7$ колориметрической шкалы и обозначим через C в одних и, соответственно, c в других условиях освещения. Через T и, соответственно, t обозначим продолжительность экспозиции на свету в сравниваемых условиях. Тогда имеем: $N = k \frac{C}{T}$, $n = k \frac{c}{t}$, где k — фактор пропорциональности. Отсюда $\frac{N}{n} = \frac{tC}{Tc}$. Как уже выше было указано, величины C и c должны иметь возможно малое значение, чтобы фактор пропорциональности k представлял постоянную величину.

Испытание данного метода, проведенное с соблюдением указанных выше условий, показало, что при сравнительных измерениях освещенности на различном расстоянии от одного и того же источника света расхождения с показаниями люксметра не превышают 25%.

Таким образом, количество фотопродукта данной индикаторной фотохимической реакции, измеренное колориметрически, пропорционально интенсивности освещения, измеренной люксметром. Это указывает на постоянство квантового выхода реакции при различной интенсивности света.

В заключение следует отметить, что донатором водорода в настоящем методе может служить также аскорбиновая кислота, а фотосенсibilизатором чистый, свободный от каротиноидов кристаллический хлорофилл (5).

Московская сельскохозяйственная академия
им. К. А. Тимирязева

Поступило
7 V 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ К. А. Тимирязев, Современное состояние наших сведений о функции хлорофилла, 1884; Солнце, жизнь и хлорофилл, 1923, стр. 137. ² Л. А. Иванов, Свет и влага в жизни наших древесных пород, изд. АН СССР, 1946. ³ К. А. Тимирязев, Об усвоении света растением, Спб, 1875; Солнце жизнь и хлорофилл, 1923, стр. 237. ⁴ А. А. Красновский, Изв. АН СССР, сер. биол., № 3, 377 (1947). ⁵ А. А. Гуревич, ДАН, 59, № 5, 937 (1948). ⁶ O. Warburg, V. Schocken, Arch. Biochem., 21, Nr. 2, 363 (1949). ⁷ H. Gaffron, Ber. Deut. Chem. Ges., 60, 755 (1927).