Доклады Академии наук СССР
1955. Том 104, № 2

БИОХИМИЯ

Б. Б. ВАРТАПЕТЯН и академик А. Л. КУРСАНОВ

УЧАСТИЕ КИСЛОРОДА ВОДЫ И КИСЛОРОДА АТМОСФЕРЫ В ДЫХАНИИ РАСТЕНИЙ

В. И. Палладиным (1) впервые была дана развернутая схема химизма дыхания. Согласно его представлениям, поглощаемый при дыхании молекулярный кислород атмосферы используется лишь для окисления водорода конечных донаторов (хромогенов), которые в свою очередь получают водород от субстрата дыхания. Уже тогда Палладин придавал большое значение воде в процессе дыхания, считая, что именно кислород воды используется для окисления дыхательного материала до углекислоты.

Однако ввиду методических трудностей это положение долгое время не могло быть подвергнуто прямой экспериментальной проверке на живых дышащих организмах. Между тем проверка схемы Палладина становилась все более необходимой, так как в биохимии накопился большой фактический материал, указывающий на возможность присоединения молекулярного кислорода к углероду органических веществ. Выделены не только соответствующие вещества, но и системы (2).

Вполне естественно поэтому, что с появлением меченого кислорода были сделаны попытки экспериментально подойти к этой проблеме путем прямых опытов на живых организмах. В литературе имеются лишь две работы, проведенные при помощи тяжелого кислорода. Обе работы были поставлены на животных объектах. Первая из них была проведена (3) на крысах. Авторы давали подопытным животным дышать меченым кислородом и подвергали изотопному анализу кислород углекислоты дыхания. В результате тяжелый кислород был ими обнаружен в углекислоте дыхания, что и привело авторов к заключению о непосредственном соединении вдыхаемого атмосферного кислорода с субстратом дыхания. Второе исследование, касающееся этого вопроса (4), в отличие от работы (3), было проведено более тщательно. Авторы, работая на мышах и крысах, не могли подтвердить выводов первой работы. Тем не менее полученные результаты не позволили им решить, какой кислород непосредственно соединяется с углеродом в процессе окисления субстрата дыхания, так как истинная картина химизма дыхания искажалась вследствие полного изотопного обмена кислорода углекислоты и воды тела животных. Таким образом, и после этих работ вопрос о роли кислорода воды и кислорода атмосферы в процессах окислительного распада органического вещества при дыхании оставался открытым.

В упомянутых выше двух исследованиях опыты ставились на теплокровных животных, особенность дыхания которых состоит в том, что образовавшаяся в тканях животных в процессе дыхания углекислота поступает в кровь и при помощи весьма активного фермента — угольной ангидразы — удаляется через легкие из организма.

Несомненно, что наличие в крови сильной угольной ангидразы должно было приводить в опытах этих авторов к почти мгновенному наступлению полного обменного* равновесия между кислородом углекислоты

* Под «обменом» здесь и в дальнейшем имеется в виду изотопный обмен.

дыхания и кислородом воды организма, что исключало возможность установления на животных объектах истинной картины окисления.

Нам казалось, что для постановки таких опытов растения являются более подходящими, так как у них углекислота, образующаяся в процессе дыхания, удаляется непосредственно из тканей в атмосферу. К тому же растения либо лишены угольной ангидразы, как это утверждают одни

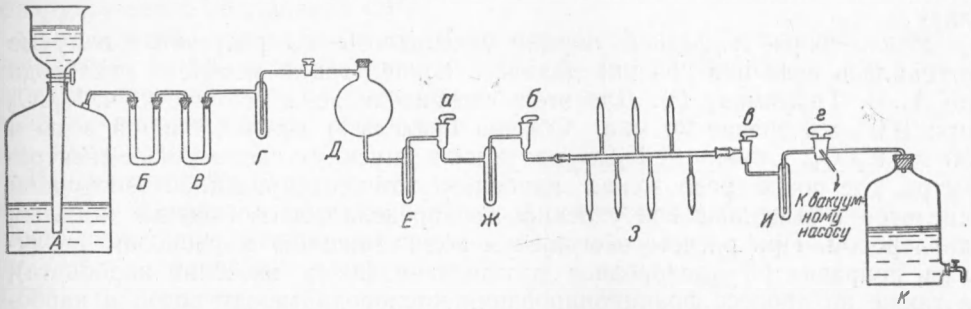


Рис. 1. Схема прибора. *А* — газометр со смесью газообразных кислорода и азота над насыщенным раствором NaCl; *Б* — сосуд с хлористым кальцием; *В* — сосуд с натронной известью; *Г* — ловушка, погруженная в сосуд Дьюара с жидким кислородом, для удаления следов углекислоты; *Д* — сосуд с растениями; *Е* — ловушка, погруженная в сосуд Дьюара с сухим льдом, для удаления водяных паров; *Ж* — ловушка, погруженная в сосуд Дьюара с жидким кислородом, для вымораживания углекислоты дыхания; *З* — серия вакуумных ампул для собирания углекислоты дыхания; *И* — предохранительная ловушка, погружавшаяся на время опыта в жидкий кислород; *К* — аспиратор

исследователи ([5,6]), либо обладают весьма слабым ферментом, как утверждают другие ([7,8]).

Методика. Опыты ставились на 10—12-дневных этиолированных ростках пшеницы сорта Озимая Московская № 2453 урожая 1951 г. В опыт брались надземные части. В первом варианте растения выращивались на обыкновенной воде, а во время опыта дышали кислородом, обогащенным тяжелым изотопом O^{18} (вариант $H_2O^{16} - O_2^{18}$). Во втором варианте растения выращивались на воде, обогащенной тяжелым кислородом, а в течение опыта дышали обыкновенным кислородом (вариант $H_2O^{18} - O_2^{16}$). В третьем варианте, который служил контролем, растения выращивались на обыкновенной воде и дышали обыкновенным кислородом (вариант $H_2O^{16} - O_2^{16}$). Чтобы уменьшить возможность обмена кислорода углекислоты дыхания после выделения из растений с кислородом паров воды, выдыхаемая углекислота, подлежащая масс-спектрометрическому анализу, во всех трех вариантах струей протягиваемого воздуха непрерывно удалялась из сосуда, где находились растения. Эта углекислота быстро высушивалась, конденсировалась охлаждением жидким кислородом и поступала в масс-спектрометрический анализ для определения степени обогащения тяжелым кислородом. Во всех опытах сбор углекислоты для анализа производился в течение 2 час. Углекислота, выделяемая растениями в промежутке между двумя сборами, отбрасывалась.

На рис. 1 приведена схема прибора, в котором производились опыты. Поступающая из газометра *А* смесь газообразных N_2 и O_2^{18} или N_2 и O_2^{16}, проходя через *Б*, *В* и *Г*, очищалась от влаги и примеси углекислоты. Затем газы поступали в сосуд *Д*, где находились затемненные растения. Током постоянно поступающего воздуха углекислота, выделяемая растениями, сразу удалялась из сосуда *Д*, высушивалась в ловушке *Е* и вымораживалась в ловушке *Ж*. После необходимой экспозиции кран *а* перекрывался; в участке прибора, расположенном правее крана *а*, удалялись газы при помощи вакуумного насоса. При этом ловушка *Ж*

с вымороженной углекислотой продолжала находиться в жидком кислороде. После откачки перекрывался кран *в*, ловушка *Ж* вынималась из сосуда Дьюара. При нагревании ловушки вымороженная углекислота улетучивалась и заполняла пространство (*а* — *в*). После этого газообразная CO_2 переводилась в вакуумную ампулу *3* путем погружения последней в сосуд Дьюара с жидким кислородом. Ампула отпаивалась и содержащаяся в ней углекислота подвергалась масс-спектрометрическому анализу.

После сбора последней порции углекислоты из растений в вакууме отгонялась вода и в ней определялась концентрация меченого кислорода по А. В. Трофимову (9). Для этого вода вводилась в обмен с х. ч. K_2CO_3 при 100° в течение 20 мин. Обычно бралось 1 мл отогнанной воды и 50 мг K_2CO_3. Обменный K_2CO_3 вводился в впускную систему масс-спектрометра, где после разложения карбоната концентрированной фосфорной кислотой в выделившейся углекислоте определялось обогащение тяжелым кислородом. При расчете обогащения воды тяжелым кислородом вводилась поправка на кислородное разбавление (из-за внесения карбоната), а также на процесс фракционирования кислорода между водой и карбонатом при 100°. Ошибка изотопного измерения была не более 1% определяемой изотопной концентрации.

Как уже было указано, искусственная атмосфера для дыхания приготовлялась либо из меченого газообразного кислорода O_2^{18} и азота, либо из обыкновенного газообразного кислорода и азота — смотря по варианту опыта. Парциальное давление кислорода в этих смесях равнялось обычному атмосферному. Газообразный тяжелый кислород был получен из тяжелой воды путем щелочного электролиза на платиновых электродах. Обогащение воды тяжелым кислородом равнялось приблизительно 1 ат.%. При масс-спектрометрических анализах сравнивались отношения изотопных пиков углекислоты, соответствующие массовым числам 46 и 45.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 приведены результаты опыта варианта $H_2O^{16} — O_2^{18}$ и для сравнения контроль $H_2O^{16} — O_2^{16}$.

Таблица 1

№ №	Экспозиция	Анализировался	O^{18}, ат. %
	Вариант $H_2O^{16}—O_2^{18}$		
1	2 час.	CO_2 дыхания	0,204
2	6 час.	„ „	0,203
3	13 час. 30 мин.	„ „	0,207
4	13 час. 30 мин.	H_2O растений	0,212
5	96 час.	„ „	0,250
	Вариант $H_2O^{16}—O_2^{16}$ (контроль)		
1	2 час.	CO_2 дыхания	0,203
2	2 „	H_2O растений	0,204

Из данных табл. 1 видно, что поглощаемый при дыхании тяжелый молекулярный кислород не входит в состав углекислоты дыхания, так как в углекислоте, собранной через 2 часа и через 6 час., не обнаруживалось различий в содержании O^{18} по сравнению с контролем. Лишь через 13 час. 30 мин. в CO_2 появились первые признаки обогащения тяжелым кислородом.

Анализ воды, полученной путем отгонки из растений, дышавших в течение 13 час. 30 мин. меченым кислородом, обнаружил более заметное обогащение меченой водой, а спустя 96 час. это обогащение в воде стало уже весьма отчетливым (табл. 1, № 5). Данные табл. 1 дают возможность

предположить, что тяжелый кислород непосредственно не соединяется с углеродом субстрата дыхания, а идет лишь на окисление его водорода до воды, в результате чего концентрация биосинтетической меченой воды в тканях растения постепенно повышается. С другой стороны, приведенные данные говорят скорее в пользу внедрения O^{18} через посредство воды, так как небольшое обогащение меченым кислородом обнаруживается в CO_2 лишь через 13 час. 30 мин., т. е. тогда, когда и в воде обнаруживается обогащение O^{18}.

Для прямой проверки этого предположения был поставлен опыт, результаты которого приведены в табл. 2. В этом варианте растения выращивались на тяжелой воде, дышали же во время опыта обыкновенным кислородом.

Таблица 2

№ №	Экспозиция	Анализировался	O^{18}, ат. %
1	2 часа	CO_2 дыхания	0,717
2	8 час.	" "	0,728
3	13 "	" "	0,720
4	13 "	H_2O растений	0,725

Из данных табл. 2 видно, что углекислота дыхания в этом варианте имеет резко повышенное содержание O^{18} по сравнению с вариантом $H_2O^{16} - O_2^{18}$ (ср. табл. 1), достигая степени обогащения, равной исходной тяжелой воде.

Нам представляется, что эти данные служат доказательством участия кислорода воды в окислительном распаде органических веществ в ростках пшеницы. Вместе с тем они указывают на отсутствие прямого окисления у этих растений дыхательного субстрата кислородом атмосферы.

В заключение следует отметить, что опасение полного изотопного обмена кислородов углекислоты и воды, что изменяло бы наши выводы, в данных опытах снимается следующими соображениями. При реакции полного изотопного обмена кислорода углекислоты с кислородом воды тяжелый изотоп O^{18} распределяется, как известно, не равномерно между CO_2 и H_2O, а концентрируется в углекислоте, т. е. имеет место фракционировка с коэффициентом, равным при комнатной температуре 1,047 ([10]). Сопоставление цифр, приведенных в табл. 1 и 2 и даже в контроле табл. 1, показывает, что в наших опытах обменного равновесия кислорода в воде и углекислоте не достигалось.

Приведенные результаты экспериментов, проведенных на ростках пшеницы, позволяют сделать следующие выводы:

1. Источником кислорода углекислоты дыхания является кислород воды.

2. Поглощаемый при дыхании молекулярный кислород непосредственно не присоединяется к углероду субстрата дыхания, а идет на биосинтез воды в тканях растения.

Дальнейшие исследования должны показать, свойственен ли такой тип дыхания и другим растениям.

Авторы выражают благодарность Р. В. Тейс, которая любезно согласилась произвести анализ образцов на масс-спектрометре.

Поступило
18 VII 1955

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] В. И. Палладин, Изв. Имп. АН, 6, 437 (1912). [2] Д. М. Михлин. Пероксиды и пероксидазы, 1947. [3] J.N. E. Day, P. Sheel, Nature, 142, 917 (1938). [4] N. Lifson, G. Gordon et al., J. Biolog. Chem., 180, 803 (1949). [5] G. O. Burr, Proc. Roy. Soc. London, B 120, 42 (1936). [6] W. E .H. M. Mommaerts, Proc. Akad. Wetensch. Amsterdam, 48, 1044 (1940). [7] A. C. Neish, Biochem. J., 33, 300 (1939). [8] И. И. Гунар, Е. Е. Крастина, ДАН, 83, 161 (1952). [9] А. В. Трофимов, Журн. анал. хим., 8, 153 (1953). [10] Г. Юрей, Химия изотопов, Сборн. № 1, 1948.