

заряд нейтрализуется выбрасываемыми ионами водорода, причем создаваемое помпой локальное подкисление достаточно сильное. Отметим, что сама по себе активация помпы сдвигает кривую на 50-60 мВ и снижает максимальную проводимость каналов, однако в меньшей степени, чем если бы эффекты были обусловлены только поверхностным зарядом.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют в пользу эффекта локального подкисления наружного раствора вблизи фиксированных зарядов, но большая величина смещения кривых предполагает участие в этом и прямой суперпозиции локальных полей помпы и каналов. Результаты табл. 3 показывают, что не только кальций, но и блокаторы калиевых каналов цезий и ТЭА снижают величину смещения кривой, индуцированного активацией помпы. Вместе с тем блокаторы сдвигают кривые на значительно большую величину при неактивной помпе, чем при активной.

Таким образом, полученные результаты показывают существенное взаимовлияние электрогенной водородной помпы и калиевых каналов как входящего, так и выходящего выпрямления, причем выявленные эффекты имеют физиологическое значение. Так, снижение уровня калия в среде, вызывая уменьшение проводимости каналов, дополнительно активирует помпу, которая гиперполяризует плазматическую мембрану. Открываются каналы внутрь направленного выпрямления, по которым калий дополнительно входит в клетку. При этом проводимость каналов, по которым калий выходит (НВКК), снижается. В результате происходит ускорение входа калия в клетку в ответ на снижение его уровня в среде.

1. Hoth, S., Hedrich, R. // JBC. 2004. Vol. 274. P. 11599.
2. Соколик, А. И. // Докл. НАН Беларуси. 2000. Т. 44. № 2. С. 89.
3. Юрин, В. М., Соколик, А. И., Кудряшов, А. П. Регуляция ионного транспорта через мембрану растительных клеток. Мн., 1991.
4. Hedrich, R., Schroeder, J. I. // Annu. Rev. Plant Mol. Biol. 1989. Vol. 40. P. 539.
5. Грабов, А. М. // Физиология растений. 1990. Т. 37. Вып. 2. С. 324.
6. Соколик, А. И., Высоцкая, Ж. В., Крытынекая, Е. Н., Юрин, В. М. // Материалы междунар. науч. конф. «Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды». Мн., 2000. С. 429.
7. Высоцкая, Ж. В., Соколик, А. И., Юрин, В. М. // Озерные экосистемы: биологические процессы, антропогенная трансформация, качество воды: Материалы II Междунар. науч. конф., Минск - Нарочь, 22-26 сент. 2003 г. Мн., 2003. С. 109.
8. Sokolik, A. I., Visotskaya, Zh., Krytynskaya, E., Yurin, V. // Developments in Plant and Soil Sciences. Vol. 92. Plant Nutrition. Food security and sustainability of agro-ecosystems through basic and applied research. 2001. P. 200.

Поступила в редакцию 15.03.05.

**Жанна Валерьевна Высоцкая** - младший научный сотрудник НИЛ физиологии растительной клетки при кафедре физиологии и биохимии растений,

**Анатолій Іосифович Соколик** - кандидат биологических наук, заведующий НИЛ физиологии растительной клетки.

**Владимир Михайлович Юрин** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии растений.

УДК 587.352.4

А. П. КУДРЯШОВ, В. М. ЮРИН

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АММОНИЙНОГО АЗОТА В ВАКУОЛЯРНОМ СОКЕ КЛЕТОК *NITELLA FLEXILIS* С АКТИВИРОВАННОЙ И ИНАКТИВИРОВАННОЙ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМОЙ АММОНИЯ\*

The ammonium concentration in the vacuoles of single internodal cells of Characeae alga *Nitella flexilis* was carried out. The ammonium concentration in vacuoles of internodal cells with inactivated ammonium transport system was sufficiently high ( $10^{-2} M$ ) and it was registered for sure. The fluctuation of vacuolar concentration of  $NH_4^{+}$  in the cells with activated ammonium transport system was not a result of inaccuracy of analysis, because the injection of  $NH_4Cl$  into the cell vacuole by means micro injectors doesn't lead to inactivation of the ammonium transport system. Probably the functional state of plasmalemma ammonium transport system is regulated by somewhat different endogenous factors, but not by intracellular concentration of  $NH_4$ .

\* Авторы статьи - сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.

Потребности растений в азоте удовлетворяются за счет поступления из среды в клетку его минеральных (нитраты, нитриты и аммиак) и отчасти простых органических (мочевина) соединений. Из названных соединений, составляющих основу азотного питания растений, лишь аммиак способен напрямую участвовать в процессах синтеза аминокислот и их амидов. Ассимиляция других элементов азотного питания возможна лишь после определенных химических превращений, протекающих внутри клеток: гидролиза мочевины, восстановления нитратов и нитритов. Поддержание высокой скорости синтеза необходимых растению белков, нуклеиновых кислот и других азотсодержащих соединений обеспечивается не только активностью непосредственно участвующих в синтезе ферментов, но и работой специфических систем транспорта, расположенных на плазмалемме. В настоящее время установлено наличие систем транспорта ионов аммония, нитратов, нитритов и молекул мочевины.

Ранее нами [1] было продемонстрировано, что транспортная система аммония (ТСА) плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* может обратимо инактивироваться. Причем процесс активации и инактивации не отражается на качественных или количественных показателях электрических характеристик плазмалеммы клеток в состоянии покоя. Относительно же движущих сил транспорта аммония у исследователей нет единого мнения, поэтому цель работы - выяснить, является ли внутриклеточное содержание аммония фактором, регулирующим активность его транспортной системы.

### Материал и методика

Определение содержания аммония проводили в пробах вакуолярного сока отдельных клеток харовой водоросли *Nitella flexilis*, выращенной в лабораторных условиях на питательной среде состава:  $2 \cdot 10^{-4}$  М  $Mg(NO_3)_2$ ,  $4 \cdot 10^{-4}$  М  $CaCl_2$ ,  $10^{-4}$  М  $KH_2PO_4$ ,  $10^{-3}$  М  $NaHCO_3$ . Для отбора пробы клетку междуузлия водоросли длиной 4,0-7,0 см центрифугировали до осаждения хлоропластов [2] (режимы центрифугирования подбирались индивидуально для каждой серии культивации). Затем фрагмент клетки, содержащий цитоплазму, отделяли, а содержимое оставшейся части выдавливали на поверхность предметного стекла. Из образовавшейся капельки вакуолярного сока микрошприцем вместимостью 10 мкл (с ценой деления 0,2 мкл) брали пробу и переносили в микропробирку, содержащую 20 мкл прокипяченной дистиллированной воды.

Концентрации аммония определяли колориметрически на основе реакции Бертло - синтезе индофенолового голубого в присутствии аммония, гипохлорита и фенола. Реакция образования индофенолового голубого, положенная в основу настоящей методики, является специфической для аммиака - мочевины и аминокислоты не мешают анализу. В классическом варианте процесс синтеза индофенолового голубого протекает при нагревании среды, содержащей аммоний, хлорную воду (или гипохлорит натрия) и фенол. Существуют различные варианты проведения этого процесса [3, 4] без нагрева. Нами за основу была взята методика проведения указанной реакции, при которой процесс катализируется наличием ацетона и этанола с небольшим количеством метанола [3].

Для определения содержания аммония в пробе вакуолярного сока в микропробирку добавляли 8 мкл «фенолового реактива» и 6 мкл раствора гипохлорита натрия. Компоненты в микропробирке интенсивно перемешивали тонкой стеклянной трубкой с воздушным пропеллером из плотной бумаги. При наличии аммония в анализируемой пробе стабильная голубая окраска формировалась через 20 мин. Интенсивность окраски раствора определяли по его оптической плотности при длине волны проходящего света 625 нм.

«Феноловый реактив» приготавливали непосредственно перед проведением измерений. Он представлял собой смесь 2 мл 30 % водного раствора едкого натра, 2 мл раствора фенола в органических растворителях (6,25 г фенола в 10 мл этанола с добавлением 1,85 мл ацетона и 0,2 мл метанола) и 10 мл свежеперегнанной дистиллированной воды. Раствор гипохлорита натрия содержал примерно 0,9 % активного хлора. Для определения концентрации аммония в отдельных клетках междуузлий водоросли *N. flexilis* нами был разработан простой микроколориметр, позволяющий устанавливать оптическую плотность растворов в пробах объемом 4-16 мкл при толщине микроюветы 5-15 мм.

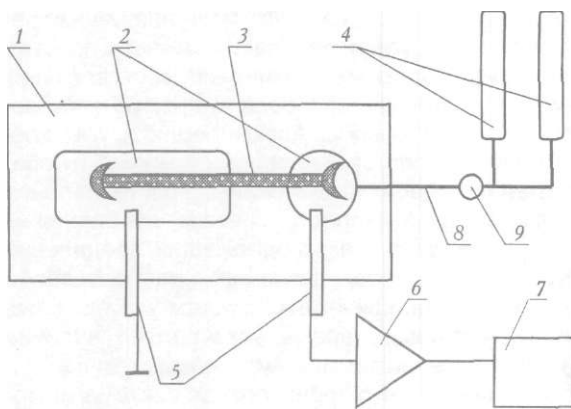


Схема установки для регистрации биоэлектрической реакции клеток междуузлий *Nitella flexilis* на действие микромолярных количеств хлорида аммония:

1 - камера, 2 - изолированные отсеки камеры, 3 - клетка междуузлия 4 - воронки СИПВи хлоридом аммония, 5 - неполяризуемые электроды, 6 - пред-усилитель, 7-самопишущий прибор, 8-подача растворов в эксперимен-тальный отсек, 9 - трехходовой кран

Степень активации ТСА оценивали по биоэлектрической реакции клеток междуузлий *N. flexilis* на добавление  $10^{-5}$  М хлорида аммония. Деполяризация плазмалеммы на 10-40 мВ, наблюдаемая сразу после внесения  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в среду, указывала на наличие на мембране клеток активированной системы транспорта [5]. Регистрация биоэлектрической реакции одиночных клеток производилась в специальной камере, разделенной на два отсека, с помощью внеклеточных электродов (рисунок).

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что в период интенсивного роста растений в процессе культивирования водорослей отмечается активация ТСА у всех протестированных клеток междуузлий. Активированное состояние ТСА сохранялось в течение 1-4 недель (в зависимости от сезона) после сбора водорослей и переноса их на хранение (та же питательная среда при дневном - 100-400 лк - освещении). По прошествии указанного времени обычно не регистрировалась сколько-нибудь заметная биоэлектрическая реакция клеток междуузлий на воздействие  $10^{-5}$  М хлорида аммония, что свидетельствовало об инактивации ТСА.

При переносе клеток водоросли с инактивированной ТСА в среду без солей аммония и создании освещенности в дневной период времени свыше 800 лк через 1-3 недели биоэлектрическая реакция в ответ на действие микромолярных количеств аммония восстанавливалась. Отмеченные изменения активности ТСА могут быть обусловлены как непосредственной модификацией процессов внутриклеточного метаболизма при переходе растений в фазу относительного покоя, так и накоплением внутри клеток избыточных количеств аммонийного азота.

Ранее авторы работы [6], пользуясь реактивом Несслера, определили концентрацию аммония в клеточном соке *Nitella*, полученном из нескольких десятков междуузлий водоросли, при этом установили наличие значительного количества аммония внутри клеток -  $6 \cdot 10^{-2}$  М. Следует отметить, что применимость реактива Несслера для определения содержания аммония в средах ограничена, и, хотя в [6] была использована методика освобождения реакционной смеси от «мути» с помощью гуммиарабика, все же несколько обескураживают обнаруженные аномально высокие внутриклеточные концентрации аммония. Позднее Р. Риче [7], используя реакцию Бертелло, измерил вакуолярную концентрацию аммиака в соке, полученном из нескольких десятков клеток *Chara corallina*, оценив ее как  $10^{-2}$  М. Таким образом, наличие аммонийного азота в вакуолях клеток харовых водорослей было установлено. К сожалению, в упомянутых работах ничего не говорится о степени активации ТСА клеток харовых водорослей, хотя, судя по косвенным данным, содержащимся в работе [6] (наличие аммония в среде культивации, использование в качестве источника азота трис(оксиметил)аминометана), можно полагать, что исследовались водоросли с инактивированной ТСА. Поэтому зарегистрированное значительное количество аммония в клетках водоросли, вероятно, отражает характерный компонентный состав вакуолярного содержимого у растений с инактивированной ТСА.

Нами также обнаружено, что в клетках междуузлий водорослей с инактивированной системой транспорта достоверно регистрируется достаточно высокое содержание аммонийного азота (таблица). Причем обращает на себя внимание

относительное постоянство концентрации  $\text{NH}_4^+$ . Вероятно, достоверно регистрируемое высокое содержания аммония (коэффициент вариации 14,8 %) в вакуолях указанных клеток отражает модификацию метаболизма аммонийных соединений при инактивации ТСА. В то же время данные в таблице могут свидетельствовать о том, что при активации ТСА содержание аммонийного азота в вакуолях заметно снижается, т. е. не исключается, что вакуолярная концентрация аммония влияет на состояние ТСА. Однако в целом для клеток междуузлий *N. flexilis* с активированной ТСА характерен разброс в величинах содержания аммония в вакуолях, что отражается в значениях среднеквадратичного отклонения ( $5,9\text{--}10\cdot 10^{-2} \text{ M}$ ) и коэффициента вариации (169 %). Из полученных данных следует, что средние значения концентраций аммония в клетках междуузлий *N. flexilis* с активированной ТСА недостоверно отражают величину содержания  $\text{NH}_4^+$  в растениях.

**Содержание аммония в клетках междуузлий водоросли *Nitella flexilis* с активированной и инактивированной ТСА**

Инактивированная ТСА		Активированная ТСА	
№ клетки	Концентрация аммония ( $\cdot 10^{-2} \text{ M}$ )	№ клетки	Концентрация аммония ( $10^{-2} \text{ M}$ )
1	11,0	1	0
2	9,3	2	0,8
3	7,5	3	3,2
4	10,5	4	0
5	8,7	5	20,0
6	11,5	6	5,2
7	12,0	7	0
8	10,8	8	6,0
9	8,0	9	0
10	11,4	10	0
Среднее	10.1±0,5	Среднее	3,5±2,1

Значительные вариации величины концентрации аммония в вакуолях клеток междуузлий с активированной ТСА могут указывать и на погрешности измерения содержания аммонийного азота в пробах. Действительно, эта величина в целом заметно ниже, чем у водорослей с инактивированной системой транспорта; двукратное превышение содержания  $\text{NH}_4^+$  наблюдалось лишь в одном случае (см. таблицу). Однако микроинъекция в вакуоль клетки  $2\cdot 10^{-1} \text{ M}$  раствора хлорида аммония, приводившая к возрастанию вакуо-

лярной концентрации  $\text{NH}_4^+$  на  $10^{-2} \text{ M}$ , не только не инактивировала ТСА, но и не меняла характеристики транспортной системы аммония даже спустя 2 ч. Следовательно, концентрация  $\text{NH}_4^+$  в вакуолях клеток водоросли *N. flexilis* с активированной ТСА может колебаться в значительных пределах.

Таким образом, результаты исследований показывают, что сама по себе вакуолярная концентрация  $\text{NH}_4^+$  является единственным фактором, определяющим активность транспортной системы аммония. Величины концентраций аммония, зарегистрированные нами в вакуолях клеток водоросли, подобны тем, которые описываются в литературе для других растительных объектов [7, 8]. Функциональное же состояние транспортной системы аммония плазмалеммы клеток *Nitella flexilis* может регулироваться иными эндогенными факторами, а не внутриклеточным содержанием  $\text{NH}_4^+$ .

1. Кудряшов, А.П., Гончарик, М.Н. // Докл. АН БССР. 1980. Т. 24. С. 1128.
2. Tazawa, M., Kishimoto, U., Kikuama, M. // Plant. Cell Physiol. 1974. Vol. 15. P. 103.
3. Crowther, A.B., Large, R.C. // Analyst. 1956. Vol. 81. P. 64.
4. Руководство по химическому анализу морских вод. РД 52.10.243-93. СПб., 1993.
5. Юрин, В.М., Соколик, А.И., Кудряшов, А.Г. Регуляция ионного транспорта через мембраны растительных клеток. Мн., 1991.
6. Barr, C.E., Koh, M.C., Ryan, Th. E. // Membrane transport in Plants. Berlin, 1974. P. 180.
7. Ritchie, R.J. // J. Exp. Bot. 1987. Vol. 38. № 188. P. 67.
8. Wang, M., Sidigi, M.Y., Ruth, T.J., Glass, A.D.M. // Plant Physiol. 1993. Vol. 103. P. 1249.

Поступила в редакцию 10.03.05.

**Анатолий Петрович Кудряшов** - кандидат биологических наук, доцент.

**Владимир Михайлович Юрин** - доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой.