

ется от 1,0 до 2,3 млн., а при действии ингибитора уменьшается с 1 млн. до 870 тыс. К 11-му дню роста листа число фотосинтетических единиц в хлоропласте сократилось при действии хлорамфеникола в 2,6 раза, что отразилось и на фотохимической активности хлоропластов (см. табл. 2), которая к этому периоду снизилась в 6,4 раза по сравнению с контролем. Наблюдается определенное соответствие между снижением количества хлорофилла, уменьшением объема хлоропластов и снижением фотохимической активности хлоропластов и их фотоактивной поверхности в клетке.

Наличие определенного фонда белка в хлоропласте является важным фактором, поскольку существует параллелизм в распределении новых молекул хлорофилла и белка между компонентами мембран хлоропластов [12]. Следовательно, снижение количества белка в хлоропласте вызывает существенные сдвиги в его структуре, биохимическом составе и активности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шлык А. А., Савченко Г. Е., Везицкий А. Ю., Карако П. С.— Докл. АН СССР, 1969, т. 188, № 3, с. 718.
2. Касцюк Н. Н., Шлык А. А.— Весті АН БССР. Сер. біял. навук, 1972, № 5, с. 42.
3. Карпова Т. А., Савченко Г. Е., Шлык А. А.— Весті АН БССР. Сер. біял. навук, 1976, № 5, с. 25.
4. Савченко Г. Е.— В сб.: Биол. и науч.-техн. прогресс. Пушино, 1974, с. 60.
5. Шлык А. А., Прудникова И. В., Мицук З. И., Суховер Л. К.— Докл. АН СССР, 1976, т. 230, № 1, с. 244.
6. Парамонова Т. К., Шлык А. А.— Весті АН БССР. Сер. біял. навук, 1976, № 6, с. 57.
7. Waga-Aswaparati O., Brandbeer J. W.— Plant. Physiol., 1976; v 53, № 5, p. 691.
8. Cahen D., Malkin S., Gurevitz M., Ohad I.— Plant. Physiol., 1978, v. 62, № 1, p. 5.
9. Wildner G. F.— Z. Naturforsch., 1976, 31, N 3—4, S. 157.
10. Гиллер Ю. Е., Вахидова Л. Р.— Физиол. и биохимия культ. раст., 1978, т. 10, № 5, с. 547.
11. Рахманкулов С. А., Азизходжаев А.— Докл. АН Уз. ССР, 1975, № 9, с. 59.
12. Шлык А. А., Чайка М. Т., Ключарева Е. А.— Докл. АН СССР, 1976, т. 226, с. 1232.

Поступила в редакцию
29.11.79.

Кафедра физиологии растений

УДК 581.132:577.150.4

Н. А. ЛЕМЕЗА

СВЕТОЗАВИСИМОЕ ИЗМЕНЕНИЕ ГЛИКОЛАТОКСИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУРАХ ПРОРОСТКОВ РЖИ

На основании результатов предыдущих наших работ [1, 2] высказано предположение о том, что фотоиндуцированное возрастание гликолатоксидазной активности контролируется фитохромной системой, так как дальний красный свет (ДКС), уменьшая количество активных молекул фитохрома, отчетливо снижал активирующее действие синего (СС) и красного света (КС) на активность фермента во всех исследуемых структурных компонентах растительной клетки.

С целью получения однозначного ответа на вопрос о нефотосинтетической природе фактора, регулирующего активность гликолатоксидазы (ГО) в растениях, нами проведены опыты по изучению влияния монохроматического света на активность данного фермента в изолированных субклеточных структурах этиолированных проростков ржи. Такой мето-

дический подход может способствовать выявлению собственных регуляторных механизмов данных структур вне усложняющего влияния всей интегрированной системы клетки и растения [3]. К тому же результаты, полученные в экспериментах с освещением клеточных органелл, тесно связаны с вопросами влияния света на их функциональную активность.

Материал и методика

Объектом исследования служили 7—8 дневные этиолированные проростки ржи сорта Дружба, выращенные на водопроводной воде в темноте.

Активность ГО в ядрах и этиопластах измеряли *in vitro* — при освещении этих структур светом лампы накаливания через водный фильтр и интерференционный светофильтр с максимумом пропускания 450 ± 10 нм (СС) или 650 ± 10 нм (КС) при 25°C в инкубационной среде, содержащей фосфатный буфер (300 мкМ) рН 8,3, сахарозу (0,4М) и гликолат натрия (15 мкмоль/мл). Светопотоки красного и синего света выравнивали по количеству падающих квантов, что составляло соответственно $20-30 \cdot 10^3$ и $30-45 \cdot 10^3$ эрг/см² · с.

Клеточные структуры выделяли дифференциальным центрифугированием по ранее описанному нами методу [4]. О высокой степени чистоты полученных органелл свидетельствуют микроскопический анализ и отсутствие в ядрах активности каталазы — маркера пероксисом [5]. Каталазную активность измеряли спектрофотометрически по скорости разложения перекиси водорода [6]. Активность ГО определяли методом Колесникова [7], белок — Лоури и др. [8]. Повторность опытов 4-кратная. Статистическая обработка результатов проводилась по Рокицкому [9].

Результаты и их обсуждение

Освещение препарата ГО синим светом интенсивностью 150—200 эрг/см² · с приводит к ингибированию активности фермента, тогда как КС с интенсивностью в 10 раз большей не оказывал заметного влияния на этот процесс [10]. В случае, когда реакционная смесь освещалась перед добавлением субстрата, эффект усиливался.

Это побудило нас исследовать поведение фермента в ядрах и этиопластах при их освещении СС и КС в присутствии в суспензии этих органелл экзогенного гликолата (15 мкмоль/мл) без добавления каких-либо кофакторов. Это вызвано тем, что, по мнению Шмида [10], флаavin является наиболее вероятным пигментом, поглощающим свет, о чем свидетельствует заметное увеличение активности ГО при добавлении в реакционную смесь ФМН.

Изменение активности ГО в суспензии этиопластов и ядер при их освещении синим и красным светом (мкмоль глиоксилата/мг белка)

Время экспозиции, ч	Темнота	Синий свет	Красный свет
Этиопласты			
0,5	$0,334 \pm 0,012$	$0,337 \pm 0,011$	$0,328 \pm 0,013$
1,0	$0,468 \pm 0,014$	$0,402 \pm 0,010$	$0,476 \pm 0,012$
1,5	$0,542 \pm 0,021$	$0,449 \pm 0,009$	$0,655 \pm 0,014$
2,0	$0,618 \pm 0,013$	$0,473 \pm 0,012$	$0,760 \pm 0,013$
Ядра			
0,5	$0,026 \pm 0,002$	$0,027 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,003$
1,0	$0,053 \pm 0,003$	$0,042 \pm 0,002$	$0,062 \pm 0,002$
1,5	$0,091 \pm 0,003$	$0,074 \pm 0,003$	$0,121 \pm 0,004$

Проведенные опыты показывают (см. таблицу), что СС ингибирует гликолатоксидазную активность в суспензии этиопластов. Это проявляется уже после первого часа светового воздействия, и данная закономерность сохраняется в течение всего опыта.

Напротив, освещение КС приводит к светоиндуцированному увеличению активности ГО по сравнению с темновым контролем. При этом следует заметить, что в обоих случаях после 0,5 ч световой экспозиции структурная активность фермента остается практически без изменений, что согласуется с данными [10].

Такая же закономерность наблюдается и в случае освещения суспензии ядер, полученных из этиолированных проростков — ингибирование гликолатоксидазной активности на синем свете и активация на красном.

Как известно, первичный эффект СС основан на возбуждении протетической группы фермента — ФМН, который и осуществляет наблюдаемый эффект ингибирования активности ГО. Согласно гипотезе, изложенной в работе [10], активная оксидаза гликолевой кислоты нуждается в коэнзиме в основном состоянии. Возбужденный ФМН в триплетном состоянии реагирует с апоэнзимом и ведет к его инактивации. Белок фермента играет в этой реакции роль восстановителя коэнзима, заменяя субстрат. Активность фермента фоторегулируется *in vitro* СС в присутствии различного рода соединений, способных погашать триплетное состояние, что противодействует угнетающему влиянию СС и приводит к увеличению активности оксидазы. Это позволило высказать предположение [10], что возбужденное состояние коэнзима инактивирует фермент.

Таким образом, кофермент ГО — ФМН необходим не только для активации фермента, но и для его ингибирования при воздействии СС. Об этом свидетельствуют данные Ходжиева [11], который показал, что в диализованных гомогенатах, так же как и с ферментными препаратами, освещение инкубационной смеси СС приводит к резкому снижению активности оксидазы гликолевой кислоты. Однако необходимым условием, как считает автор, является наличие в инкубационной смеси экзогенного ФМН. В его отсутствие ингибирующее действие СС на активность ГО не проявлялось, хотя эндогенный ФМН в гомогенате имеется в таких количествах, при которых активность ГО продолжала оставаться достаточно высокой. При этом, однако, следует учесть, что в процессе длительного инкубационного периода может происходить существенное перераспределение флавина в инкубационной среде [12]. Так, содержание ФАД в этиолированных листьях было в два раза выше, чем в зеленых. С другой стороны, содержание ФМН в зеленых листьях было в два раза выше, чем в этиолированных. Возможно, в процессе зеленения растений ФАД был частично гидролизован в ФМН и АМФ нуклеотид-пирофосфатазой и, таким образом, общее содержание флавина оставалось без изменений. Последующие эксперименты показали, что такой гидролиз может иметь место *in vitro* [12].

В наших опытах разрушение проэнзима в процессе длительного инкубационного периода предотвращалось присутствием экзогенного гликолата, на что указывают Кушмак и Толберт [12].

Следовательно, ингибирующий эффект СС на активность ГО в суспензии ядер и пластид происходит, вероятно, за счет взаимодействия возбужденного этим светом кофермента с апоферментом, о чем говорилось выше.

В случае освещения КС, фоторецептором выступает не коэнзим ГО, а другой пигмент — белковый комплекс — фитохром, при посредстве которого осуществляется фотоиндуцированное увеличение активности данного фермента.

Таким образом, опыты с освещением суспензий органелл служат еще одним доказательством того, что возрастание гликолатоксидазной активности на свету опосредовано фитохромной системой.

Каков же возможный механизм значительного фотоиндуцированного

увеличения активности оксидазы гликолевой кислоты в суспензии ядер и роль фитохрома в этом процессе?

Полученные результаты согласуются, на наш взгляд, с предположением В. Л. Калера [13] о том, что Φ_K может синтезироваться в ядре под управлением гена-регулятора и удерживаться там до тех пор, пока не произойдет фотопревращение $\Phi_K \rightarrow \Phi_{DK}$. Часть Φ_{DK} — подвижная часть фитохрома может диффундировать в хлоропласт, где взаимодействует со структурными цистронами ДНК, управляющими дифференцировкой пластид, среди которых, вероятно, находится и структурный цистрон синтеза ГО.

Это означает, что команда на начало превращения пропластиды или этиопласта в хлоропласт производится из ядра (как из центра, где синтезируется фитохром в виде Φ_K) и воспринимается в форме Φ_{DK} в пластидном геноме, где по этой команде экспрессируются все структурные гены, управляющие процессами дифференцировки.

Не исключен и другой механизм действия фитохрома на светоиндуцированное увеличение активности исследуемого фермента, основанный на изменении под действием света проницаемости мембран ядер и пластид.

Хлоропласты на свету способны превращать $^{14}\text{CO}_2$ в C^{14} -гликолат, который при этом выделяется в окружающую среду [14]. Добавленная к суспензии хлоропластов меченая гликолевая кислота в хлоропласты почти не включается, т. е. ограничен доступ гликолата к активным центрам фермента, прочно связанного с мембранами хлоропласта [1].

После кратковременного освещения этиолированных проростков СС и КС образование физиологически активной формы фитохрома, вероятно, сопровождается увеличением проницаемости субклеточных структур для субстрата ГО, что приводит к активированию фермента.

Такое предположение согласуется с данными Хендрикса и Бортвика [15], которые на основании опытов с мимозой пришли к заключению, что влияние фитохрома не связано с образованием новых информационных РНК, а направлено на изменение клеточной проницаемости.

Большой интерес в этой связи представляют исследования Галстона [16]. Используя метод сканирования очень тонким пучком монохроматического света, он обнаружил, что в клетках проростков овса Φ_K располагается на наружной поверхности ядерной мембраны. При переходе Φ_K в форму Φ_{DK} наблюдается погружение фитохрома в мембрану на 1 мкмк.

Однако изменением лишь одной проницаемости невозможно объяснить все многочисленные процессы морфогенеза. Синтез новых белков, РНК, перестройка ферментативных процессов, возникающая вслед за световой индукцией, свидетельствуют о более глубоких изменениях, несомненно, затрагивающих генный аппарат клетки. Изменение клеточной проницаемости может способствовать этим процессам, в частности, ускорять выход новых информационных РНК в цитоплазму [17].

ЛИТЕРАТУРА

1. Вечер А. С., Лемеза Н. А.— Физиол. растений, 1979, т. 26, вып. 3, с. 506.
2. Лемеза Н. А., Вечер А. С., Клингер Ю. Е.— В сб.: Молекулярная и прикладная биофизика с.-х. растений и применение новейших физико-технических методов в сельском хозяйстве: Тез. докл. второго Всесоюзного симпозиума. Кишинев, 1977, с. 82.
3. Чернов И. А.— Успехи совр. биологии, 1970, т. 70, вып. 2 (5), с. 227.
4. Лемеза Н. А., Вечер А. С.— Физиол. растений, 1977, т. 24, вып. 3, с. 453.
5. Yamazaki R. K., Tolbert N. E.— J. Biol. Chem., 1970, v. 245, № 19, p. 5137.
6. Акулова Е. А., Смоллов А. П.— Физиол. и биохим. культ. растений, 1974, т. 6, № 4, с. 148.
7. Колесникова П. А.— Биохимия, 1962, т. 27, вып. 2, с. 193.
8. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J.— J. Biol. Chem., 1951, v. 193, № 1, p. 265.
9. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика.— Минск, 1967.
10. Schmid G. H.— Hoppe-Seyler's. Z. Physiol. Chem., 1969, v. 350, № 9, p. 1035.

11. Воскресенская Н. П., Ходжиев А. Х.— Физиол. растений, 1973, т. 20, вып. 2, с. 309.
12. Kuezman M., Tolbert N. E.— Plant Physiol., 1962, v. 37, № 6, p. 729.
13. Калер В. Л. Авторегуляция образования хлорофилла в высших растениях.— Минск, 1976.
14. Kearney P. C., Tolbert N. E.— Arch. Biochem. Biophys., 1962, v. 98, № 1, p. 164.
15. Hendricks S. B., Borthwick H. A.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1967, v. 58, № 5, p. 2125.
16. Galston A. W.— Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1968, v. 61, № 2, p. 454.
17. Регуляция метаболизма растительной клетки / Под общей ред. Ф. Л. Калинин.— Киев, 1973.

Поступила в редакцию
17.11.79.

Кафедра ботаники

УДК 576.8.095.7

ЧАН ТХИ СЫОНГ, А. Н. ЕВТУШЕНКОВ

ЗАВИСИМОСТЬ БАКТЕРИЦИДНОГО ДЕЙСТВИЯ ОЗОНА ОТ УСЛОВИЙ ОБРАБОТКИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Антимикробная активность озона уже нашла практическое применение, в частности, для стерилизации питьевой воды [1—3], причем в данном случае озонирование оказывается более сильным средством по сравнению с хлорированием [4]. Однако бактерицидный эффект озона довольно широко варьирует в зависимости от вида и даже штамма микроорганизмов одного и того же вида, а также от условий внешней среды [5].

Существенный интерес и потенциальную практическую значимость представляют данные о действии озона на фитопатогенную микрофлору [6, 7]. Тем не менее сведения о влиянии озона на патогенные для растений микроорганизмы касаются преимущественно грибов и почти отсутствуют данные о его действии на бактерии. В связи с этим целью представляемого исследования являлось изучение антибактериального действия озона на некоторые фитопатогенные и сапрофитные бактерии в зависимости от условий обработки испытуемых культур.

Материал и методика

Бактерии. Объектами исследования являлись штаммы некоторых фитопатогенных и сапрофитных бактерий из коллекции кафедры микробиологии БГУ имени В. И. Ленина (табл. 1). Культуры сохранялись на скошенной агаризованной среде, приготовленной на основе аминокептида [8] при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Обработка озоном. Бактериальные культуры испытуемых штаммов выращивались в полноценной жидкой питательной среде, приготовленной на основе аминокептида, до логарифмической фазы. По 10 мл культуры помещали в пробирку и через суспензию с постоянной скоростью (8 л/мин) продувался озон. Обработку бактерий на поверхности плотной среды проводили в чашках Петри, засеянных шпателем и помещавшихся в камеру, в которой поддерживалась постоянная концентрация озона.

Бактериальные споры получали путем выращивания спорообразующих бактерий на специальной споруляционной среде [9]. Вегетативные клетки при этом убивались прогреванием культуры при 80°C в течение 10 мин. После обработки в жидкой среде бактериальную взвесь разводили физиологическим раствором и высевали на плотную питательную среду в чашках Петри, которые инкубировались при оптимальной для каждого изучавшегося штамма температуре. Учет результатов производили через 48 ч инкубирования посредством подсчета формирующихся колоний в сравнении с контролем (необработанная культура).

Источником озона служил пластинчатый озонатор, сконструирован-