

УДК 631.811.2:621.039.8

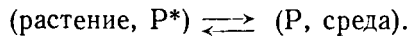
КИНЕТИКА ИЗОТОПНОГО ОБМЕНА ФОСФОРА МЕЖДУ КОРНЯМИ РАСТЕНИЙ И ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДОЙ

В. В. РАЧИНСКИЙ, Б. О. ОЙЕДЖОЛА

(Кафедра прикладной атомной физики и радиохимии)

Задачи изучения процессов изотопного обмена в биологических системах, в частности в растительном мире, подробно освещены в ряде работ [1, 3, 6]. Для теоретической и прикладной физиологии растений большой интерес представляет выяснение кинетики выделения питательных элементов из растений во внешнюю среду. Для ее исследования необходимо принять определенную стандартную методику изучения изотопного обмена питательных элементов между растением и средой.

В качестве такой методики может быть принята следующая. Растение выращивается на среде с меченым элементом от семени, поэтому в нем содержится только тотально меченый элемент, а значит, все фонды и компартменты содержат лишь меченый элемент. Если такое растение перевести на питательную среду с немеченым элементом, то получится изолированная гетерогенная система двух объектов, между которыми должен начаться изотопный обмен по схеме



Этот обмен может быть неэквивалентным и эквивалентным. Очевидно, он будет эквивалентным, если биологическая система находится в стационарном состоянии (например, растение, достигшее зрелого возраста, прекращение роста).

Нужно иметь в виду, что живой организм — динамическая, метаболическая система. Меченый элемент после замены на немеченый постепенно будет переходить от одного компонента или состояния к другому. При этом разные компоненты, фонды и компартменты должны обмениваться с различной скоростью. Следовательно, меченый элемент пройдет цикл многочисленных промежуточных изотопных обменов внутри растения, прежде чем испытает изотопный обмен с немеченым элементом внешней среды.

Конкретные задачи нашего исследования сводились к следующему: вырастить до определенного возраста растения от семени на среде с меченым (^{32}P) фосфором; в определенные моменты роста переводить их на питательный раствор с немеченым фосфором и следить радиометрически за кинетикой выделения меченого фосфора; провести математическую обработку кривых кинетики выделения меченых элементов в целях установления количественных закономерностей изотопного обмена.

Методика опытов

Для опыта были взяты те же мелкосеменные растения, которые использовали при изучении изотопных эффектов [1, 2], — томаты и салат. Растения от семени выращивали на питательном растворе смеси Кнопа с меченым (^{32}P) фосфором (по одному растению на сосуд объемом 1 л). Подробно методика выращивания описана ранее [2].

Изучали кинетику выделения меченого фосфора в зависимости от возраста расте-

ний. Для этого через каждые 7 дней в течение 6 недель растения помещали на 48 ч на питательный раствор Кнопа (1/4 нормы, объем раствора 0,5 л в сосуд на 0,5 л), содержащий немеченый фосфор. Было проведено 2 серии опытов. Биологическая повторяемость опытов в каждой серии 2-кратная (по 2 сосуда).

С момента помещения растений с меченым элементом на питательный раствор начинали

радиометрический контроль за кинетикой выделения корнями меченого элемента в питательный раствор. Измеряли удельную активность раствора в начальный момент и через 0,5; 1; 2; 4; 8; 13; 24; 36 и 48 ч. В заданный момент времени из раствора отбирали 3 пробы по 1 мл (три измерительные повторности) и помещали их в стеклянные чашечки. Растворы в чашечках выпаривали под лампой, а затем измеряли активность

полученных препаратов в стандартных условиях.

Кроме основных серий опытов, были проведены дополнительные опыты, в которых изучали выделение меченого фосфора в дистиллированную воду и в раствор смеси Кнопа с добавлением в качестве ингибитора динитрофенола (ДНФ, 10^{-4} М на 1 л). Выделение меченого фосфора в дистиллированную воду контролировали через 6 недель а в раствор с ДНФ на 4, 5 и 6-й неделе.

Обработка результатов измерений

Результаты измерений активности препаратов, выраженные в импульсах в секунду, с помощью известной величины удельной активности меченого элемента пересчитывали на микрограммы меченого фосфора, т. е. определяли массу меченого элемента.

По результатам регистрации хода выделения меченого элемента строили кинетические кривые $M_t^* = f(t)$. Все полученные графики имели выпуклую форму, характеризующуюся довольно резким начальным подъемом (быстрая стадия кинетики) и медленной стадией кинетики (стремление к «насыщению»).

Однако за 48 ч ни в одном из опытов не было достигнуто полного установления постоянства активности, или концентрации меченого элемента в растворе. В качестве примера на рис. 1 приведена одна из кинетических кривых.

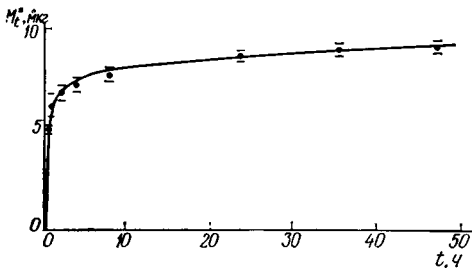


Рис. 1. Характерная кривая кинетики выделения меченого фосфора корнями томатов: $M_t^* = f(t)$. Вторая серия опытов. Возраст растений 2 недели.

Дальнейший ход обработки кинетической кривой сводился к следующему.

Было сделано предположение, что кривые кинетики выделения меченого элемента можно представить как сумму экспоненциальных составляющих. Теоретические расчеты [4, 5] показали, что в простейшем случае как для диффузионной, так и для химической кинетики процесс изотопного обмена подчиняется экспоненциальной кинетической закономерности.

Итак, имеем

$$M_t^* = \sum_{i=1}^n M_{t,i}^* = \sum_{i=1}^n M_{\infty,i}^* (1 - e^{-r_i t}), \quad (1)$$

где r_i — константа кинетики выделения для i -й фракции (фонда, компартамента и т. п.), являющейся источником выделения меченого элемента; $M_{\infty,i}^*$ и $M_{t,i}^*$ — максимальная масса i -й фракции соответственно в растворе (теоретически при $t \rightarrow \infty$) и в данный момент времени; n — число изотопно-обменных фракций (фондов).

Далее запишем

$$\sum_{i=1}^n M_{\infty,i}^* = M_{\infty}^*, \quad (2)$$

где M_{∞}^* — общая масса меченого элемента, выделившегося при $t \rightarrow \infty$.

Будем выражать массы меченого элемента в относительных безразмерных величинах:

$$F_{t,i} = M_{t,i}^* / M_{\infty}^*; F_t = M_t^* / M_{\infty}^*; F_{\infty,i} = M_{\infty,i}^* / M_{\infty}^*. \quad (3)$$

Тогда вместо (2) можно записать

$$\sum_{i=1}^n F_{\infty, i} = 1. \quad (4)$$

Величины $F_{\infty, i}$ служат мерой величины емкости обменных фондов корней растения.

Соответственно для (1) имеем

$$F_t = \sum_{i=1}^n F_{t, i} = \sum_{i=1}^n F_{\infty, i} (1 - e^{-r_i t}). \quad (5)$$

Разложение экспериментальной кинетической кривой на экспоненциальные составляющие состоит в следующем.

Величины r_i являются характеристическими параметрами кинетики выделения меченого элемента. Их будем нумеровать в порядке возрастания. Чем меньше величина r_i , тем медленнее кинетика выделения данной фракции меченого элемента. Медленная составляющая кинетики выделения является лимитирующей.

Выделим в (5) первую, самую медленную составляющую — компоненту

$$F_t = F_{t, 1} + \sum_{i=2}^n F_{t, i} = F_{\infty, 1} (1 - e^{-r_1 t}) + \sum_{i=2}^n F_{\infty, i} (1 - e^{-r_i t}). \quad (6)$$

При достаточно большом времени все члены, начиная со второго, обратятся в практически постоянные величины $F_{\infty, i}$ и кинетика выделения будет определяться только самой медленной, первой кинетической составляющей, т. е.

$$F_t = F_{\infty, 1} (1 - e^{-r_1 t}) + \sum_{i=2}^n F_{\infty, i}. \quad (7)$$

Согласно (4)

$$\sum_{i=2}^n F_{\infty, i} = 1 - F_{\infty, 1}. \quad (8)$$

Поэтому из (7) имеем

$$F_t = F_{\infty, 1} (1 - e^{-r_1 t}) + 1 - F_{\infty, 1}, \quad (9)$$

откуда

$$-\ln(1 - F_t) = -\ln F_{1, \infty} + r_1 t. \quad (10)$$

Таким образом, если по экспериментальным данным построить график функции $-\ln(1 - F_t) = f(t)$, то часть экспериментальных точек при больших временах должна укладываться на прямую линию. По наклону этой прямой можно определить первую кинетическую константу r_1 . Прямая отсекает на оси ординат отрезок $-\ln F_{\infty, 1}$, по которому определяется величина $F_{\infty, 1}$. Таким путем находим первую экспоненциальную составляющую

$$F_{t, 1} = F_{\infty, 1} (1 - e^{-r_1 t}). \quad (11)$$

Из общего уравнения кинетики выделения (5) вычтем уравнение первой компоненты (11)

$$F'_t = F_t - F_{t, 1} = \sum_{i=2}^n F_{\infty, i} (1 - e^{-r_i t}). \quad (12)$$

В (12) вычленим следующую, вторую, самую медленную из оставшихся компоненту. При достаточно большом времени по аналогии с (7)

будем иметь

$$F'_t = F_{\infty, 2} (1 - e^{-r_2 t}) + \sum_{i=3}^n F_{\infty, i}. \quad (13)$$

Согласно (4)

$$\sum_{i=3}^n F_{\infty, i} = 1 - (F_{\infty, 1} + F_{\infty, 2}). \quad (14)$$

Подставим (14) в (13) и после преобразований получим

$$-\ln(1 - F_{\infty, 1} - F'_t) = -\ln F_{\infty, 2} + r_2 t, \quad (15)$$

что позволяет графически определить величины r_2 и $F_{\infty, 2}$ и вторую составляющую ряда (5)

$$F_{t,2} = F_{\infty, 2} (1 - e^{-r_2 t}). \quad (16)$$

Аналогично можно прийти к уравнению для нахождения третьей компоненты уравнения (5)

$$-\ln(1 - F_{\infty, 1} - F_{\infty, 2} - F'_t) = -\ln F_{\infty, 3} + r_3 t, \quad (17)$$

где $F'_t = F'_t - F_{t,2}$.

Продолжая таким путем вычисление компоненты за компонентой, придем к последней n -й компоненте.

Для двухкомпонентной системы

$$F'_t = F_{t,2} = F_{\infty, 2} (1 - e^{-r_2 t}), \quad (18)$$

$$F_{\infty, 2} = 1 - F_{\infty, 1}. \quad (19)$$

Из (18) имеем

$$-\ln\left(1 - \frac{F'_t}{F_{\infty, 2}}\right) = r_2 t. \quad (20)$$

Итак, $F_{\infty, 2}$ определяется по (19), а r_2 — по (20).

Для полученных нами данных по кинетике выделения меченого фосфора оказалось возможным разложить все экспериментальные кинетические кривые на две экспоненциальные составляющие. На рис. 2

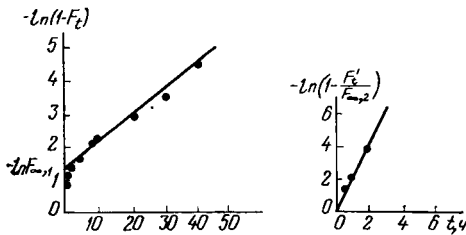


Рис. 2. Графическое разложение функции $F_t = f(t)$ на экспоненциальные составляющие (к рис. 1).

приведен пример графического разложения кинетической кривой, представленной на рис. 1, на две экспоненциальные составляющие.

По результатам опытов для всех повторностей рассчитывали средние величины M_t^* . Значения M_t^* для $t=48$ ч принимали M_{∞}^* , затем вычисляли величины F_t . По значениям F_t строили усредненную (гладкую) кинетическую кривую ($F_t = f(t)$).

Далее для этой кривой были взяты моменты времени t : 0,5; 1; 2; 4; 8; 10; 15; 20; 30; 40 ч и по графику найдены соответствующие графически экстраполированные значения F_t . В дальнейшем действовали по описанной выше схеме обработки исходной кривой $F_t = f(t)$.

По значениям констант r можно рассчитать периоды половинного выделения

$$T_{1/2} = 0,693/r. \quad (21)$$

Разложение экспериментальных кривых кинетики выделения меченого фосфора на экспоненциальные составляющие показало, что она харак-

теризуется двумя компонентами: быстрой (вторая компонента) и медленной (первая). Кривые кинетики выделения для растений различных серий опытов, различных возрастов, различных видов оказались близкими и подобными. Соответственно близкими оказались и параметры $F_{\infty, 1}$, r_1 и $F_{\infty, 2}$, r_2 . Это позволило нам усреднить значения указанных величин по возрасту растений, сериям опытов и видам растений (табл. 1—3).

Т а б л и ц а 1

Средние (по возрасту) значения параметров кинетики выделения меченого фосфора корнями томатов и салата при их переносе на питательный раствор смеси Кюпа

Серия опыта	1-я компонента		2-я компонента	
	$F_{\infty, 1}$	r_1	$F_{\infty, 2}$	r_2
Томаты				
I	0,38±0,04	0,094±0,001	0,62±0,04	1,36±0,01
II	0,43±0,05	0,091±0,006	0,57±0,05	2,05±0,50
Среднее по сериям	0,40±0,05	0,092±0,004	0,60±0,05	1,70±0,25
Салат				
I	0,29±0,03	0,090±0,006	0,71±0,03	2,09±0,44
II	0,40±0,01	0,092±0,001	0,60±0,01	1,84±0,25
Среднее по сериям	0,34±0,02	0,091±0,004	0,66±0,02	1,96±0,35
Среднее по видам растений	0,37±0,04	0,092±0,004	0,63±0,04	1,83±0,30
	$T_{1/2} = 7,5$ ч		$T_{1/2} = 0,38$ ч	

Обсуждение полученных результатов

Как видно из табл. 1, окончательные средние значения для быстрой компоненты кинетики выделения меченого фосфора составляют $F_{\infty, 2} = 0,63 \pm 0,04$ и $r_2 = 1,83 \pm 0,30$ ч⁻¹ ($T_{1/2} = 0,38$ ч = 25 мин), а для медленной компоненты $F_{\infty, 1} = 0,37$ и $r_1 = 0,092 \pm 0,004$ ч⁻¹ ($T_{1/2} = 7,5$ ч). На первый изотопно-обменный фонд корней (быстрая кинетика) приходится около 60% изотопно-обменной емкости корней, на второй (с медленной кинетикой) — около 40%. Время полуобмена фонда с медленной кинетикой примерно на порядок больше, чем фонда с быстрой кинетикой.

Какова природа этих двух фондов? Здесь можно высказать лишь самые ориентировочные предположения. Быстрая кинетика выделения меченого фосфора может быть обусловлена диффузией свободных и обменно связанных фосфат-ионов из «свободного пространства» корней, медленная кинетика — диффузионным выходом фосфат-ионов из цитоплазмы клеток эпидермиса, паренхимы и других тканей корней. Время диффузии можно приближенно оценить исходя из теории размерностей по следующей формуле:

$$\tau_{\text{диф}} \approx \frac{R^2}{D}, \quad (22)$$

где D — коэффициент диффузии частиц; R — путь диффузии. Если среднюю длину пути диффузии ионов в корнях принять за 0,1 см, а коэффициенты свободной диффузии ионов в растворе за 10^{-5} см²/с, то исходя из (23) получим $\tau_{\text{диф}} \approx 10^{-2}/10^{-5} \cdot 60 \approx 17$ мин, что согласуется

Т а б л и ц а 2
Кинетика выделения меченого фосфора корнями растений в возрасте 6 недель при помещении их на дистиллированную воду

Растения	1-я компонента		2-я компонента	
	$F_{\infty, 1}$	r_1	$F_{\infty, 2}$	r_2
Томаты	0,15	0,075	0,85	1,63
Салат	0,39	0,063	0,61	1,33
Среднее	0,27	0,069	0,73	1,48

по порядку величины со временем полуобмена первого изотопно-обменного фонда ($T_{1/2} \approx 25$ мин). Можно предположить, что более медленный обмен второго фонда обусловлен меньшим (примерно на порядок) значением коэффициента диффузии фосфат-ионов из цитоплазмы (диффузионное сопротивление клеточных мембран ($D \approx 10^{-6} - 10^{-7}$ см²/с). Тогда для второго фонда $\tau_{\text{диф}} \approx 10^{-2}/10^{-6} \cdot 60 \cdot 60 \approx 2,8$ ч, что согласуется по порядку величины с временем полуобмена этого фонда ($T_{1/2} \approx 7,5$ ч).

Таблица 3

Кинетика выделения меченого фосфора корнями растений при помещении их на питательный раствор Кнопа с добавкой 10^{-4} М динитрофенола (возраст растений 4, 5 и 6 недель; даны средние значения по возрасту)

Вид растения	1-я компонента		2-я компонента	
	$F_{\infty, 2}$	r_1	$F_{\infty, 2}$	r_2
Томаты	$0,35 \pm 0,05$	$0,088 \pm 0,005$	$0,66 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,09$
Салат	$0,41 \pm 0,01$	$0,089 \pm 0,005$	$0,59 \pm 0,01$	$1,56 \pm 0,15$
Среднее	$0,38 \pm 0,03$	$0,088 \pm 0,005$	$0,62 \pm 0,03$	$1,37 \pm 0,12$

Как показывают данные табл. 2, у растений, помещенных на дистиллированную воду, кинетика выделения корнями меченого фосфора практически не меняется. Значения кинетических параметров получились близкими (табл. 1 и 2). Они не изменились также при погружении корней растений в раствор смеси Кнопа с добавкой 10^{-4} М ДНФ (табл. 3). Все это указывает на общность механизма кинетики изотопного обмена. Таким общим механизмом является диффузия фосфат-ионов из двух изотопно-обменных фондов корней — относительно более мобильного и менее мобильного.

Следует отметить, что, несмотря на сохранение функции $F_t = f(t)$, при неблагоприятных физиологических условиях масштаб величин M_t^* и M_{∞}^* не сохраняется; в неблагоприятных условиях внешней среды эти величины уменьшаются. Выделение элементов в дистиллированной воде и в растворе с ДНФ ингибируется при сохранении кинетики данного процесса.

Заключение

При изучении изотопного обмена фосфора в опытах с томатами и салатом в системе растение — питательный раствор ($P^* \rightleftharpoons P$) установлено, что кинетические кривые выделения меченого фосфора корнями в разные периоды роста (в течение 6 недель) геометрически подобны. Эти кривые состоят из двух экспоненциальных компонентов со следующими средними значениями параметров: $F_{\infty, 1} = 0,37 \pm 0,04$, $r_1 = 0,092 \pm \pm 0,004$ ч⁻¹ (медленная кинетика); $F_{\infty, 2} = 0,63 \pm 0,04$, $r_2 = 1,83 \pm 0,30$ ч⁻¹ (быстрая кинетика). Перенос растений на дистиллированную воду и раствор с добавкой динитрофенола не приводит к изменению указанных кинетических параметров, хотя выделение меченого фосфора ингибируется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ойеджолла Б. О. Исследование изотопных эффектов и изотопного обмена при использовании меченого (^{32}P) фосфора и меченой (^{35}S) серы в опытах с растениями. Автореф. канд. дис. М., 1970. — 2. Ойеджолла Б. О. Исследование изотопных эффектов при ассимиляции меченого фосфора (^{32}P) и меченой серы (^{35}S) растениями. — Изв. ТСХА, 1970, вып. 3, с. 120—130. — 3. Рачинский В. В. Курс основ атомной техники в сельск. хоз-ве. Изд. 2-е. М., Атомиздат, 1978. — 4. Рачинский В. В., Трещов А. Г., Колосов И. В. Практикум по применению изотопов и излучений

в сельск. хоз-ве. Вып. V. Радиохимия. ТСХА, 1960. — 5. Рогинский С. З. Теоретические основы изотопных методов изучения химических реакций. М., Изд-во

АН СССР, 1956. — 6. Рогинский С. З., Шноль С. Э. Изотопы в биохимии. М., Изд-во АН СССР, 1963.

Статья поступила 22 ноября 1978 г.

SUMMARY

Kinetics of isotope exchange of phosphorus in plant—nutrient solution system has been studied.

Curves of kinetics of labelled phosphorus excretion by tomato and lettuce roots have been obtained. Labelled phosphorus has been found to be excreted from two exchange funds of roots — the one with a rapid and the one with a slow kinetics of excretion. Kinetic parameters for the two funds have been determined.