

МЕТОДИКА

УСТАНОВКА ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КИНЕТИКИ ИНДУКЦИОННОГО ПЕРИОДА ФОТОСИНТЕЗА С ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫМ ГАЗОАНАЛИЗАТОРОМ УГЛЕКИСЛОТЫ НА ТЕРМИСТОРАХ

В. Е. СЕМЕНЕНКО

Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева Академии наук СССР, Москва

METHODS

AN APPARATUS FOR INVESTIGATION OF THE KINETICS OF THE INDUCTION EFFECTS OF PHOTOSYNTHESIS WITH AID OF A THERMISTOR DIFFERENTIAL CARBON DIOXIDE ANALYSER

V. E. SEMENENKO

K. A. Timiriazev Institute of Plant Physiology, USSR Academy of Sciences, Moscow

В настоящее время одним из важнейших направлений в изучении фотосинтеза является исследование кинетики и взаимосвязи отдельных систем и реакций — в ряде случаев уже достаточно хорошо изученных — которые в совокупности составляют процесс ассимиляции световой энергии в результате фотохимического синтеза органических веществ. Детальное изучение кинетики отдельных реакций фотосинтеза стало возможным только после того, как были созданы высокочувствительные методы и аппаратура (высокочувствительные газоанализаторы, манометрия, метод меченых атомов и хроматография, дифференциальная спектрофотометрия и др.). Если в статических исследованиях получаются главным образом данные о том, из каких звеньев (систем) состоит аппарат (процесс) фотосинтеза, то в кинетических исследованиях можно получить данные, вскрывающие взаимосвязи этих систем и реакций при осуществлении процесса фотосинтеза в целом.

Такая настройка разных систем на общую взаимосвязанную работу происходит каждый раз, когда на хлоропласт попадает свет и начинается фотосинтез, т. е. во время индукционного периода фотосинтеза. Поэтому исследование механизма процессов индукционного периода фотосинтеза может быть удобным средством для изучения механизма фотосинтеза в целом, так как представляется возможность видеть процесс фотосинтеза в период его наведения, при включении в него отдельных систем и реакций, т. е. в развернутом виде. Исследователями, которым удалось сконструировать достаточно чувствительную аппаратуру, установлен ряд специфических особенностей хода индукционного периода фотосинтеза [1—10], которые отражают существенные черты внутреннего механизма фотосинтеза [11, 12, 13], а также свидетельствуют о сложных процессах «настройки» фотосинтетического аппарата вначале фотосинтеза, при которой возникает и поддерживается в дальнейшем тот энергетический уровень и уровень окислительно-восстановительных потенциалов в хлоропластах, который необходим для осуществления фотосинтеза [14].

Однако природа и внутренние механизмы процессов, ответственных за сложный ход индукционных кривых фотосинтеза, остаются еще далеко не ясными, хотя и имеется несколько попыток (кстати противоречивых) объяснения этих процессов [5, 6, 9, 15]. Поэтому мы предприняли исследование механизма процессов индукционного периода фотосинтеза в надежде, что через изучение тех условий и факторов, от которых зависит поглощение углекислоты на разных фазах индукционного периода фотосинтеза, можно будет получить ряд существенных сведений о внутреннем механизме фотосинтеза.

Для этого необходимо было сконструировать специальную установку, снабженную высокочувствительным непрерывно регистрирующим записывающим газоанализатором, специальной камерой для объекта, осветительными системами и др.

Описанию такой установки посвящена предлагаемая статья.

Установка (рис. 1) состоит из следующих основных частей: 1) высокочувствительный непрерывно регистрирующий записывающий газоанализатор углекислоты на термисторах; 2) система, обеспечивающая ток газа; 3) система термоконтроля; 4) камера для объекта; 5) две оптические системы осветителей.

Принципиальная схема установки для учета кинетики индукционного периода фотосинтеза (рис. 2) состоит в том, что в токе газа последовательно перед камерой с фотосинтезирующим объектом и после нее располагаются два преобразующих элемента, учитывающих изменение содержания углекислоты в токе газа. Преобразующие элементы включены таким образом, что учитывают разницу в содержании CO_2 до и после камеры с объектом по дифференциальной схеме, и этот эффект регистрируется на движущейся фотобумаге. Таким образом, основной частью установки является дифференциальный газоанализатор.

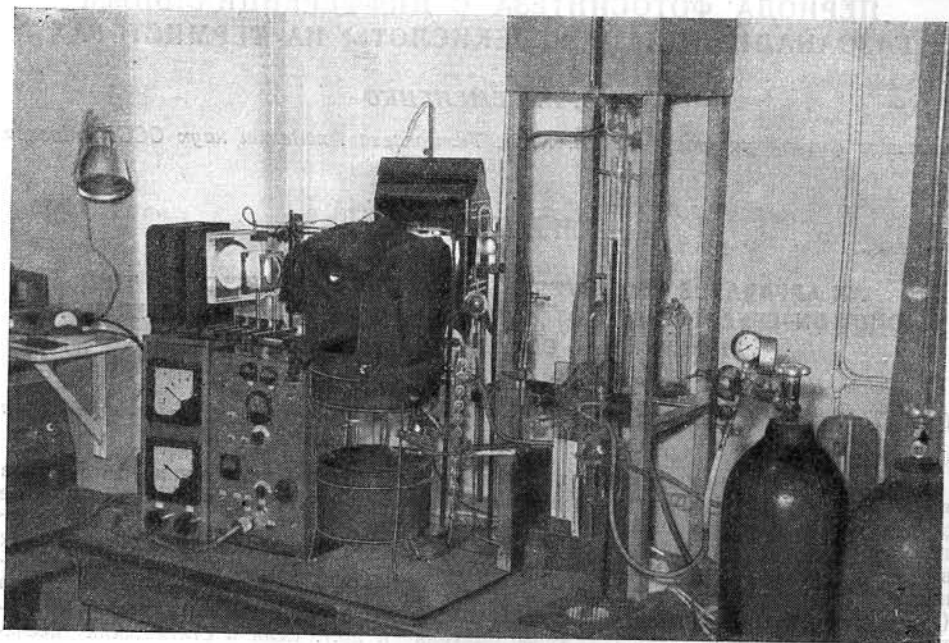


Рис. 1. Общий вид установки для изучения кинетики индукционного периода фотосинтеза

При выборе типа газоанализатора мы остановились на известном принципе [16] использования различной теплопроводности газов, который уже применялся для изучения индукционного периода фотосинтеза [4, 5, 9, 15] и позволяет сравнительно легко достичь достаточно высокую чувствительность при малой инерционности установки. Этот принцип состоит в том, что изменение содержания CO_2 в газовой смеси или в воздухе учитывается по изменению их теплопроводности в зависимости от содержания углекислоты. Такая возможность обеспечивается тем, что теплопроводность CO_2 значительно отличается от теплопроводности основных компонентов воздуха и воздуха в целом*, что позволяет учитывать очень небольшие изменения в содержании углекислоты. Если в токе газа поместить нагретый до определенной температуры элемент, через который проходит электрический ток и который меняет свое сопротивление в зависимости от температуры, то при неизменном составе, скорости тока и температуре газа, омывающего этот элемент, рассеиваемое им количество теплоты, его температура, а, следовательно, и сопротивление также будет постоянными. Если состав газа изменится (при неизменной температуре и скорости его тока), то по указанной зависимости изменится и сопротивление элемента, что можно регистрировать электрическими приборами.

Обычно в качестве такого измерительного элемента применялись металлические (чаще всего платиновые) проволоки. Однако температурный коэффициент их электропроводности очень небольшой (0,3% на 1°). Поэтому мы в качестве преобразующего элемента использовали разработанные в настоящее время специальные термочувстви-

* Теплопроводность λ $\frac{\text{в ккал}}{\text{м. ч. град}}$: азот — 0,01962, кислород — 0,02005, воздух — 0,01919, углекислота — 0,01179 [17].

тельные сопротивления (термисторы ТС) [18—20]. По сравнению с металлами они обладают гораздо большими температурными коэффициентами изменения сопротивления (α): у них при изменении температуры на 1° изменяется сопротивление на 2,7—6% (рис. 3).

При включении двух подобных элементов в мостовую схему и размещении их последовательно в токе газа до камеры с объектом и после нее получаем преобразователь дифференциального газоанализатора, который может непрерывно учитывать кинетику изменения содержания углекислоты.

Таким образом, главной частью газоанализатора является преобразователь (рис. 4), в котором неэлектрическая величина (концентрация CO_2) преобразуется в электрическую. Преобразователь состоит из массивного медного корпуса, в котором имеется два посеребренных канала диаметром в 4 мм. Через один из этих каналов проходит газ до того, как он попадает в камеру с объектом, а через второй— после

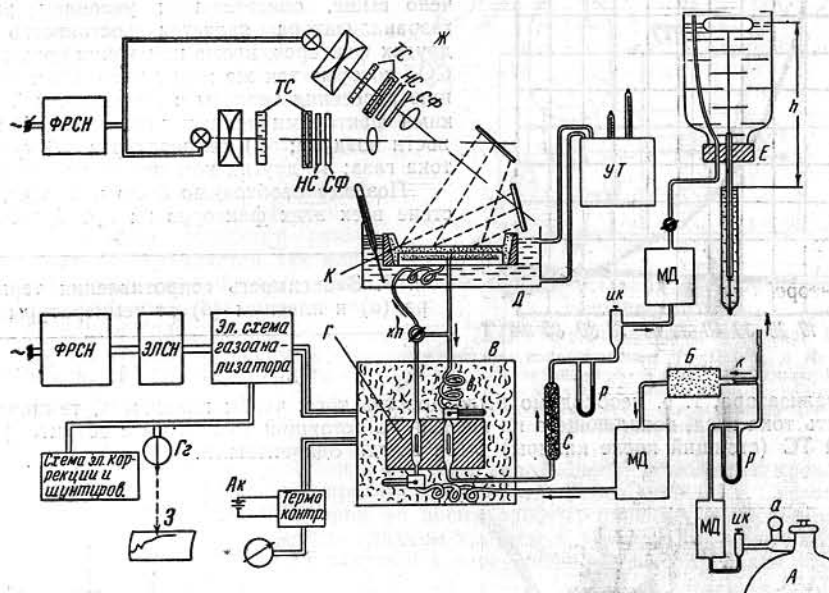


Рис. 2. Принципиальная схема установки для изучения кинетики индукционного периода фотосинтеза

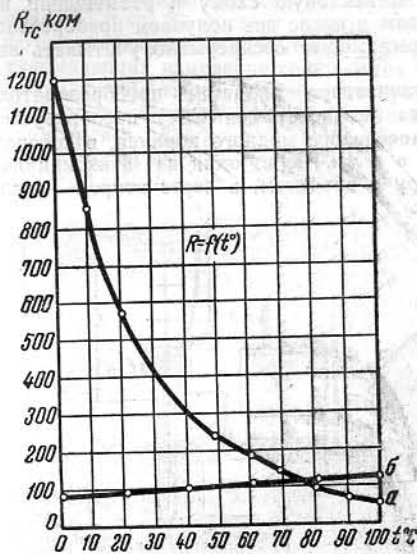
А — баллон с определенным содержанием CO_2 ; а — редуктор; ик — игольчатые краны; МД — магазины давления; р — реометры; к — капилляры; Б — камера для насыщения газа влагой (находится в ванне Д вместе с камерой К); В — ванна для преобразователя с теплоизоляцией; Г — преобразователь; кл — кран для направления тока газа мимо камеры с объектом; Д — термостатируемая ванна для камеры; К — камера для объекта; УТ — ультратермостат; С — трубка с CaCl_2 ; Е — аспиратор; Ж — оптические системы осветителей; ФРСН — феррорезонансный стабилизатор; Эл. СН — электронный стабилизатор; Гг — гальванометр газоанализатора; З — узел фотозаписи; Ак — узел фотозаписи; Ак — аккумулятор. Стрелками указано направление тока газа в установке

его прохождения через камеру. В каналах помещены малогабаритные термисторы (тип ММТ = 6, $R_{20} = 9,5 \text{ к}\Omega$, $\alpha = 3,2$), которые включены в схему лампового моста и при включенном приборе бывает в нагретом состоянии*. При этом важно, чтобы зазор между ТС и стенками канала был небольшим (1—1,5 мм), так как иначе будут возникать конвекционные токи газа, что приводит к значительной ошибке и падению чувствительности. Преобразователь помещен в ванну, изолированную от внешних колебаний температуры асбестом и ватой (рис. 2).

Ламповый мост (рис. 5) собран на двойном триоде 6Н8С, в котором ТС преобразователя включены в качестве катодной нагрузки, и смещение подано на сетку. Таким образом каждая половинка лампы вместе с катодной нагрузкой (ТС) представляет два плеча моста, а анодные нагрузки лампы, выподненные из проволочных сопротивлений, вместе с частями настроенного сопротивления (R настр.) представляют два вторых плеча моста. Измерительный прибор (зеркальный гальванометр на растяжках, чувствительность 10^{-8} А) включен между анодами лампы и измеряет разбаланс, который

* При подборе пар термисторов для моста и режима их работы важно снимать их вольтамперные характеристики и каждый термистор подбирать отдельно [18—23].

возникает при изменении сопротивления катодной нагрузки (ТС), причиной которого, как мы видим в конечном счете является изменение содержания CO_2 . Кроме того, в схему включены миллиамперметр и вольтметр, которые позволяют поддерживать режим питания ТС в одной точке вольтамперной характеристики и таким образом достигать одной температуры, до которой нагреты ТС преобразователя. Настройка на нуль производится при помощи проволочного переменного сопротивления $R_{\text{настр}}$. Питание схемы осуществляется через феррорезонансный и электронный стабилизатор. Накал лампы питается от аккумулятора.



Однако принципиально простая схема установки усложняется тем, что, как было отмечено выше, обязательным условием работы газоанализатора является постоянство всех других факторов, кроме изменения содержания CO_2 , которые так же могут привести к изменению рассеяния теплоты с поверхности ТС. Такими факторами являются изменения: 1) влажности воздуха; 2) температуры; 3) скорости тока газа; 4) других компонентов воздуха.

Поэтому необходимо было исключить действие всех этих факторов на преобразователь

Рис. 3. Зависимость сопротивления термистора (а) и платины (б) от температуры [19]

газоанализатора, т. е. необходимо было достичь того, чтобы влажность, температура, скорость тока газа, попадающего на первый ТС (стоящий до камеры с объектом) и на второй ТС (стоящий после камеры) были всегда одинаковыми.

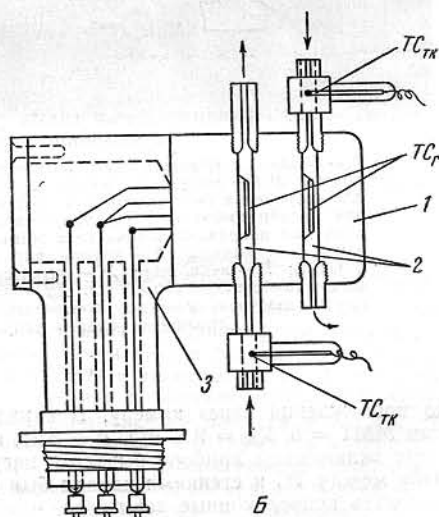
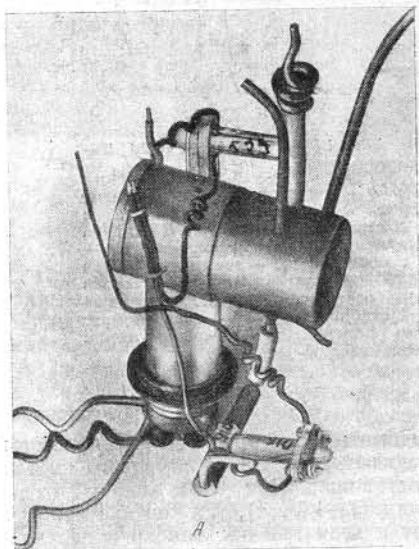


Рис. 4. Преобразователь

А — общий вид; Б — схема: 1 — корпус преобразователя; 2 — каналы для тока газа; 3 — coil; $\text{ТС}_Г$ — термисторы газоанализатора; $\text{ТС}_ТК$ — термисторы термоконтроля. Стрелками указано направление тока газа в преобразователе

Это было достигнуто при выполнении системы тока газа в установке. В основе схемы системы тока газа была сохранена такой же, какая применялась Ауфдемгартемом [4] с тем лишь отличием, что для достижения постоянства влажности воздуха, он не сушился, как это делалось Ауфдемгартемом [4], а наоборот, насыщался влагой, как это было у Вина [5], при такой же температуре при которой находится камера с объектом.

Для поддержания постоянной температуры газа, попадающего на ТС преобразователя, в систему тока газа перед преобразователем включены медные змеевики. Кроме того, осуществлен постоянный контроль за равенством температуры газа, попадающего на первый и второй ТС преобразователя. Для этого, помимо двух ТС, находящихся в преобразователе и работающих в режиме измерения концентрации CO_2 (в нагретом состоянии), в систему тока газа (перед входом его в каналы преобразователя) включены еще два игольчатых ТС (изготовления Агро-физического института), которые работают в режиме измерения температуры. Эти ТС также включены в мостовую схему (обычный четырехплечный мост) и обеспечивают контроль за равенством температур газа, омывающего ТС преобразователя. В качестве измерительного инструмента в мосту термоконтроля использован нульгальванометр с чувствительностью в 10 раз больше, чем гальванометр газоанализатора (10^{-9}A).

Изменение содержания кислорода, которое имеет место при фотосинтезе, на показания подобного газоанализатора не сказывается так как теплопроводность кислорода очень близка к теплопроводности воздуха, и его процентное содержание в воздухе настолько велико по сравнению с изменениями, к которым приводит фотосинтез, что это не является помехой в работе. Для обеспечения равномерности тока газа в установку включены (рис. 2) система магазинов давления, капилляров, игольчатых кранов, реометров, а в качестве механизма, протягивающего газ через установку, использован известный тип аспиратора, в котором во время работы сохраняется постоянной действующая сила h — разность между верхним уровнем и уровнем вытекания жидкости. Скорость тока газа может регулироваться в определенных пределах и для нашей работы настроена на 80 мл/мин.

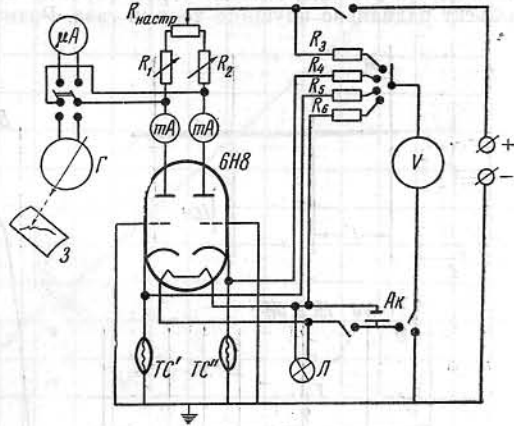


Рис. 5. Принципиальная электрическая схема газоанализатора

TC' и TC'' — термисторы газоанализатора; $R_{настр.}$ — проволочное сопротивление 1 к Ω ; R_1 и R_2 — проволочные сопротивления по 5 к Ω ; R_3 — 2 мом; R_4 и R_5 — 100 к Ω ; R_6 — 50 к Ω ; Γ — зеркальный гальванометр; 3 — узел фотозаписи; AK — аккумулятор; L — сигнальная лампочка

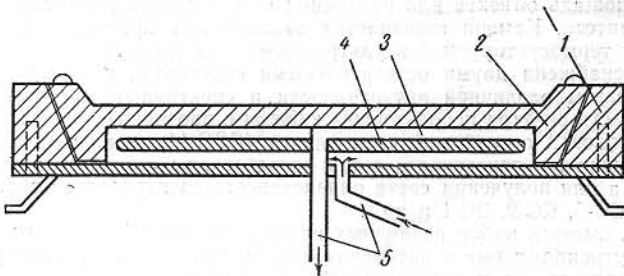


Рис. 6. Камера для объекта

1 — корпус камеры; 2 — крышка с окном для света; 3 — пленка водорослей или лист; 4 — столик для объекта; 5 — трубки для входа и выхода газа. Стрелками указан ток газа в камере

Газ в установку засасывается через капилляр из трубки, по которой он проходит, выходя из баллона со скоростью 120 мл/мин с заранее приготовленной смесью с определенным содержанием CO_2 .

Для достижения минимальной инерционности установки трубки для тока газа между камерой и преобразователем выполнены из миллиметрового капилляра.

В системе тока имеется поперечная переключатель, по которой можно направлять ток газа мимо камеры, что позволяет учитывать эффект дыхания объекта.

Важной частью установки является специальная камера для объекта (водоросли или высшего растения), которая позволяет при минимальном объеме (что существенно для уменьшения инерционности установки) помещать в нее довольно большую площадь пленки водоросли или листа.

Изготовленная из плексигласа круглая камера (рис. 6), диаметром в 10 см имеет

крышку на шлифе, являющуюся одновременно окном для прохождения света. Под крышкой находится столик, на котором располагается объект и который укреплен таким образом, что между краями столика и боковыми стенками камеры, а также под и над ним имеется зазор в 1 мм. Газ, попадающий в камеру через отверстие находящееся в центре камеры под столиком, уходит из нее через второе отверстие, находящееся в центре столика, омывая таким образом со всех сторон расположенный на столике объект радиально идущими токами газа. Размер камеры может меняться по диаметру

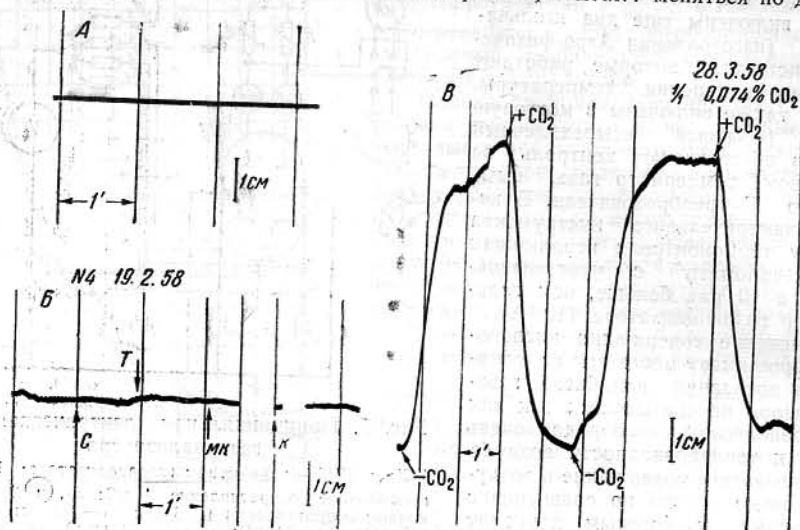


Рис. 7. Устойчивость работы установки и чувствительность ее к CO_2 . А — стабильность работы гальванометра; Б — устойчивость работ установки; С — включено освещение камеры, Т — выключено освещение камеры; К — ток газа направлен мимо камеры; МК — ток газа направлен через камеру; В — чувствительность установки к CO_2 (изменение содержания CO_2 на 0,074% при полной чувствительности гальванометра)

и высоте с помощью специальных вставных колец и набора столиков, что позволяет с одной стороны менять инерционность установки, а с другой — подбирать наиболее оптимальную площадь объекта для получения четких записей кинетики индукционного периода фотосинтеза. Камера помещается в ванне над преобразователем под слоем проточной воды термостатируемой в ультратермостате (рис. 2).

Установка снабжена двумя осветительными системами, которые позволяют освещать объект светом различной интенсивности и спектрального состава. Для снятия инфракрасной части спектра использованы кюветы с проточной водой и кювета, в которой помещен тепловой стеклянный светофильтр (СЗС-14), также охлаждаемый током воды. Для изменения интенсивности света использованы стеклянные нейтральные светофильтры НС, а для получения света определенного спектрального состава — цветные светофильтры (СС-5, КС-2, ЗС-1 и др.).

Кроме того, имеется набор различных источников света 500 и 750 ватт кинолампы, лампы ПРК, ртутнокадмиевые и натриевые лампы, что позволяет в широких пределах варьировать интенсивность и спектральный состав света.

Проверка собранной установки показала, что она вполне пригодна для изучения намеченных вопросов.

Инерционность установки оказалась равной при максимальном объеме камеры для объекта 8—12 сек.

Для проверки того, что сами манипуляции с установкой (освещение и затемнение объекта, переключения тока газа через камеру и мимо нее) не дают посторонних эффектов, были проведены записи нулевой линии установки (рис. 7, Б). При этом в камеру вместо пленки водоросли помещался влажный диск зеленой бумаги. Кроме того, пришлось подобрать специальный гальванометр на растяжках, который не подвержен действиям вибрации, ибо один этот фактор очень сильно сказывается на устойчивости работы обычных гальванометров (рис. 7, А).

Градуировка прибора была проведена тремя различными способами — методом параллельных токов газа с различным содержанием CO_2 через оба канала преобразователя, методом поглощения CO_2 из тока газа после его прохождения через первый канал преобразователя с применением заранее приготовленных смесей газа и различных буферов Варбурга. Результаты градуировки установки, представленные на градуировочной кривой (рис. 8) и фотографии (рис. 7, В) показали ее достаточно высо-

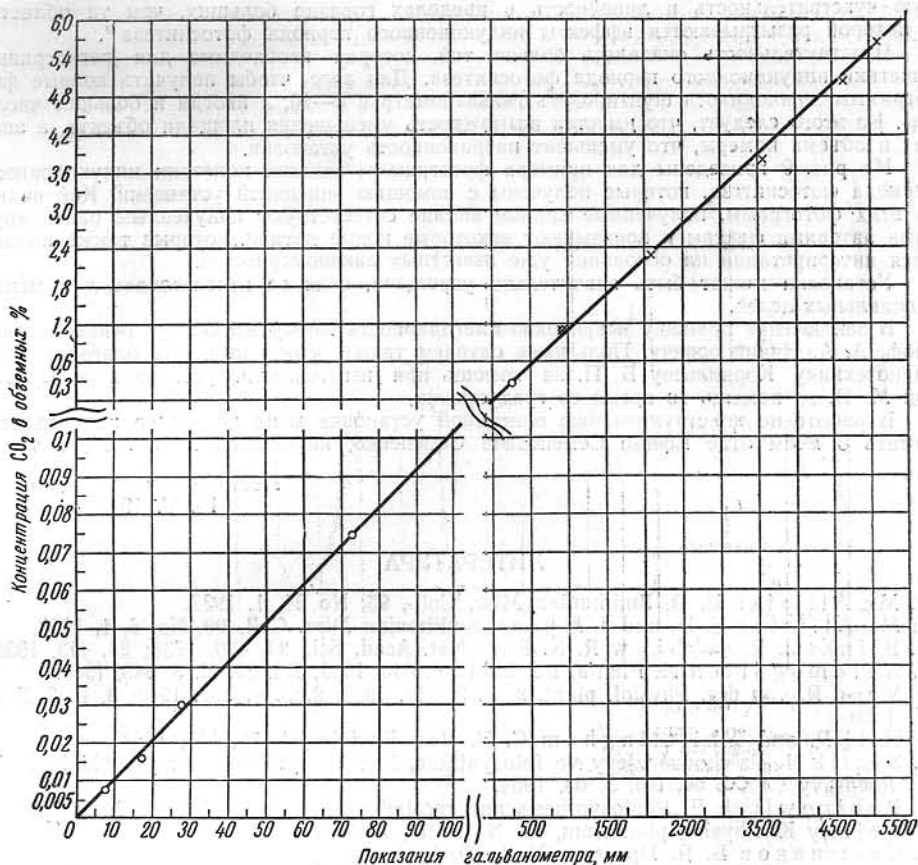


Рис. 8. Градуировочная кривая

○—градуировка по буферам Варбурга; —+—+ градуировка по заранее приготовленным смесям CO₂

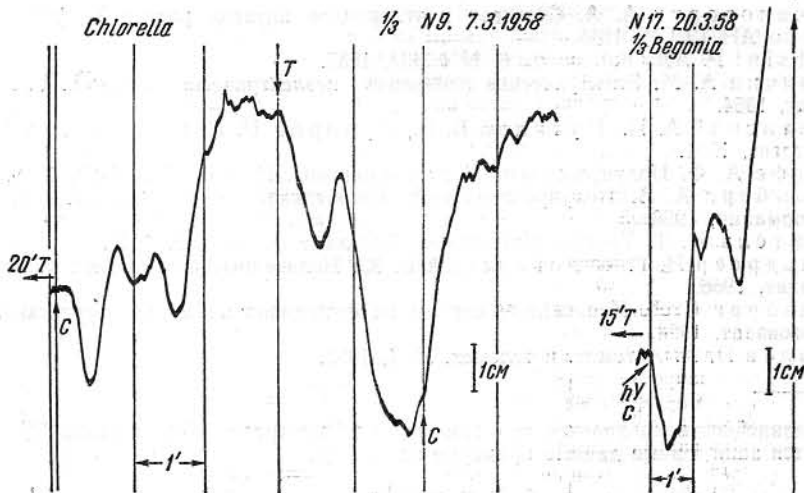


Рис. 9. Кривые кинетики индукционного периода фотосинтеза Chlorella и Begonia

C — свет включен; T — свет выключен. В опыте с Chlorella температура 24°; интенсивность света 40694 эрг/см²сек; концентрация CO₂—1,27%. В опыте с Begonia температура 22°; интенсивность света 40,694 эрг/см²сек.; концентрация CO₂—3,48%

кую чувствительность и линейность в пределах гораздо больших, чем та область, в которой разыгрываются эффекты индукционного периода фотосинтеза*.

Чувствительность оказалась больше той, которая необходима для регистрации кинетики индукционного периода фотосинтеза. Для того, чтобы получать полные фотোগраммы, приходилось шунтировать гальванометр в 5—10, а иногда и большее число раз. Из этого следует, что имеется возможность уменьшения площади объекта, а значит и объема камеры, что уменьшит инерционность установки.

На рис. 9 приведены для примера фотোগраммы записей кинетики индукционного периода фотосинтеза, которые получены с помощью описанной установки. Как видно из этих фотোগрамм, полученные кривые вполне соответствуют полученным ранее другими авторами фактам и показывают некоторые новые детали, которые также поддаются интерпретации на основании уже известных закономерностей.

Установка может быть значительно упрощена, если ее использовать для менее специальных целей.

В заключение приношу искреннюю благодарность моему научному руководителю проф. А. А. Ничипоровичу. Пользуюсь случаем также, чтобы выразить благодарность радиотехнику Корнильеву В. П. за помощь при изготовлении установки и Власовой М. П. за помощь во время ее градуировки.

В работе по конструированию описанной установки меня постоянно вдохновляла память о моем отце Ефиме Семеновиче Семененко, научившем меня любить труд.

Поступила в редакцию
15. V. 1958

ЛИТЕРАТУРА

1. Mc Allister E. D. *Smithonian Misc. Coll.*, 95, No 24, 1, 1937.
2. Mc Allister E. D. and J. Myers. *Smithonian Misc. Coll.* 99, No. 6, 1, 1940.
3. Blinks J. R. and Skow R. K. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 24, 420, 1938; 24, 413, 1938.
4. Aufdmegarten H. *Planta*, Bd. 29, H. 4, 643, 1939; Bd. 30, H. 3, 343, 1939.
5. Veen R. van der, *Physiol. plant.* 2, F. 3, 217, 1949; 2, F. 4, 287, 1949; 3, F. 3, 247, 1950.
6. Hill R. and Whittingham C. P. *New Phytologist*, 52, 132, 1953.
7. Šetlik I. *Prěchoduě zjevü ve fotosynthese, ktere se projevüji na produkti kyslíkü. Rozpravy CSAV*, 64, No. 3, 68, 1954.
8. Rabinowitch E. *Photosynthesis and related processes*, v. II, Part 2, 1956.
9. Vejlby K. *Physiol. plantarum*, 11, N 1, 158, 1958.
10. Свешников Б. Я. *Природа*, № 4, 29, 1944.
11. Warburg O., Krippahl E., Schröder W. *Naturwissenschaften*, 43 jahrgang, H. 11, 237, 1956; 42 jahrgang, H. 16, 449, 1955.
12. Warburg O., Schröder W., Krippahl E., Klotzsch H. *Angewandte chemie*, 69 jahrgang, No. 20, 627, 1957.
13. Сапожников Д. И. *Тр. БИНа, Экспер. быт.*, сер. IV, вып. 8. Изд-во АН СССР, 1951.
14. Ничипорович А. А. *Световое и углеродное питание растений (фотосинтез)*. Изд-во АН СССР, 1955.
15. Massini P. *Acta bot. neerl.*, 6, N 4, 434, 1957.
16. Туричин А. М. *Электрические измерения неэлектрических величин*. Госэнергоиздат, 1954.
17. Бачинский А. И., Путилов В. В., Суворов Н. П. *Справочник по физике*. Учпедгиз, 1951.
18. Иоффе А. Ф. *Полупроводники и их применение*. Изд-во АН СССР, 1956.
19. Фромберг А. Б. *Полупроводниковые сопротивления — термисторы*. Бюро технической информации, 1956.
20. Шефтель И. Т. *Термосопротивления*. Госиздат физматлит, 1958.
21. Гольдкреер И. Г. и Рогинский В. Ю. *Нелинейные сопротивления*. Госэнергоиздат, 1956.
22. Гинзбург С. А. *Нелинейные цепи и их функциональные характеристики*. Госэнергоиздат, 1958.
23. Удалов Н. П. *Автомат. и телемех.* № 4, 1952.

* Нелинейность начинается при измерении концентрации CO_2 порядка 5%, когда получаются заниженные данные примерно на 0,005%.