

М. И. ТАУТС, В. Е. СЕМЕНЕНКО

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИНДОЛЬНОЙ ПРИРОДЫ
ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТАХ ХЛОРЕЛЛЫ**

(Представлено академиком А. Л. Курсановым 29 VI 1970)

Вопрос о наличии физиологически активных веществ у одноклеточных водорослей и их природе мало изучен. При исследовании природных вод в периоды цветения и лабораторных культур водорослей наблюдались явления стимуляции роста и деления клеток веществами, выделяемыми водорослями в окружающую среду. Эти биологически активные вещества могли вызывать как автостимуляцию, так и оказывать стимулирующий эффект на рост других видов и систематических групп водорослей (^{1, 2}).

О природе стимуляторов у водорослей существует мало удовлетворительных данных (^{2, 3}). При изучении активных веществ клеток и культуральной среды у хлореллы (⁴) не обнаружено веществ индольной природы и предположено, что стимуляция роста клеток вызывается каким-то специфическим веществом зеленых водорослей. Однако в работах (⁵⁻⁷) сообщается о наличии индольных соединений у ряда водорослей. Эти вещества, элюированные с хроматограмм, вызывали ускорение роста колеоптилей *Avena*.

Нет также четкой картины о действии индолил-3-уксусной кислоты на водоросли. Данные противоречивы (³), однако в последние годы появляются работы, говорящие о стимулирующем эффекте этого вещества на деление клеток и накопление биомассы у различных типов водорослей (⁷⁻⁸).

В предыдущих работах нами изучался эффект автостимуляции и аутоингибирования у хлореллы в зависимости от фаз роста культуры и роли в этом процессе сопутствующей микрофлоры, а также видовой специфики штаммов, различающихся направленностью биосинтеза. Было показано, в частности, что культивирование бактериально чистой *Chlorella* sp. K на повторно используемых средах, полученных на стадии активного роста суспензии, приводит к значительному возрастанию темпов деления клеток и увеличению продуктивности культуры (⁹). В данной работе была сделана попытка выделить ростстимулирующие вещества из культуральной среды и испытать их активность на одном из распространенных тест-объектов высших растений — колеоптилях и на водорослях, продуцирующих эти вещества, а также определить физико-химическими методами группу соединений, к которой принадлежат эти вещества.

Работа проводилась на бактериально чистом термофильном штамме *Chlorella* sp. K. Культуру выращивали в накопительном режиме при оптимальной для данных условий опыта освещенности ($460 \cdot 10^3$ эрг/см²·сек), температуре (36°) и концентрации CO₂ (1,5%) в подаваемом воздухе. Питательной средой служила минеральная среда Тамия. Систематически осуществляли контроль бактериальной чистоты культуры. Культуральную

среду отделяли от клеток центрифугированием при 3000 g в период линейного роста культуры при плотности 300—400 млн клеток на 1 мл. После отделения среду тотчас же замораживали и затем лиофильно высушивали.

Экстракцию индольных соединений вели различными методами при разных уровнях pH. Наилучшей оказалась экстракция серным эфиром, свободным от перекисей, из обводненного материала при pH 4—5. Из культуральной среды извлекали свободные ауксины и, в отдельных случаях, ауксины, освобождающиеся после щелочного гидролиза. Применяли метод восходящей хроматографии на бумаге в системах: *n*-бутанол — ледяная уксусная кислота — вода (42 : 12 : 28), *n*-бутанол — NH₄OH (25% раствор) — вода (10 : 1 : 1 и 100 : 3 : 16), а также в воде. Очистку пятен стимулирующих веществ в основном делали с помощью двухмерной хроматографии или перехроматографированием отдельных зон. Длина пробега фронта растворителей была 20—25 см для одномерной хроматографии и около 15 см для двухмерной.

Для качественных реакций на индольные соединения использовали реактивы Сальковского, Эрлиха, диазотированную сульфаниловую кислоту, хлорное железо и азотнокислое серебро. В каждой пробе брали не менее чем 500—1000 мл исходной культуральной среды, хотя для получения положительного ответа в биотестах достаточно было использовать навески, в 5—10 раз меньшие.

Биотестом служили колеоптили пшеницы и газоны с культурой водорослей в чашках Петри на агаризованной среде Тамия. Отрезок или пятно хроматограммы делили на равные половины, одна из которых накладывалась на свежезасеянный газон с водорослями, а элюат из другой использовали в биотесте с колеоптилями. Чашки через 2—3 часа выставляли на свет от люминесцентных ламп и выдерживали до позеленения газона (около одной недели), когда отчетливо проявлялись зоны стимуляции.

Полученные результаты подвергали статистической обработке.

Из табл. 1 видно, что при каждой применявшейся системе растворителей удавалось обнаружить на хроматограмме две основные зоны, дающие положительную реакцию на индольные соединения. При этом всегда одна из зон (табл. 1, I) давала достаточно хорошее совпадение с индолил-3-уксусной кислотой (ИУК), применявшейся в качестве одного из свидетелей. Совпадали цвета свечения в ультрафиолете (у.ф.) и цвета качественных реакций. Эта зона обнаруживалась как при экстракции свободных ауксинов, так и при повторной экстракции материала после щелочного гидролиза.

Таблица 1

Сравнительная характеристика R_f пятен веществ индольной природы внеклеточных метаболитов хлореллы и некоторых свидетелей в различных системах растворителей

Соединения	<i>n</i> -Бутанол — NH ₄ OH — вода		Вода	<i>n</i> -Бутанол — уксусная кислота — вода 42 : 12 : 28
	10 : 1 : 1	100 : 3 : 16		
Из культуральной среды				
I	0,16—0,21	0,38—0,42	0,87—0,90	0,88—0,92
II	0,75—0,81	0,83—0,86	0,32—0,37	0,62—0,65
IIIa	0,90—0,93	0,93—0,98	—	—
Свидетели				
Индоллил-3-уксусная кислота	0,18—0,21	0,39—0,43	0,86—0,88	0,90—0,92
Индоллил-3-пировиноградная кислота	0,12—0,14	0,27—0,29	0,80—0,84	0,94—0,96
Индолил-ацетамид	0,72—0,77	0,83—0,85	0,58—0,61	0,77—0,82
Этил-индолил-ацетат	0,92—0,94	0,96—0,98	0,58—0,60	0,96—0,98

Вторая зона (табл. 1, II), дающая положительную реакцию на индольные соединения, для щелочных систем располагалась вблизи фронта растворителей, а для кислой смеси и воды ниже пятна ИУК, давая R_f соответственно 0,62—0,65 и 0,32—0,37. Эта зона не давала полного совпадения

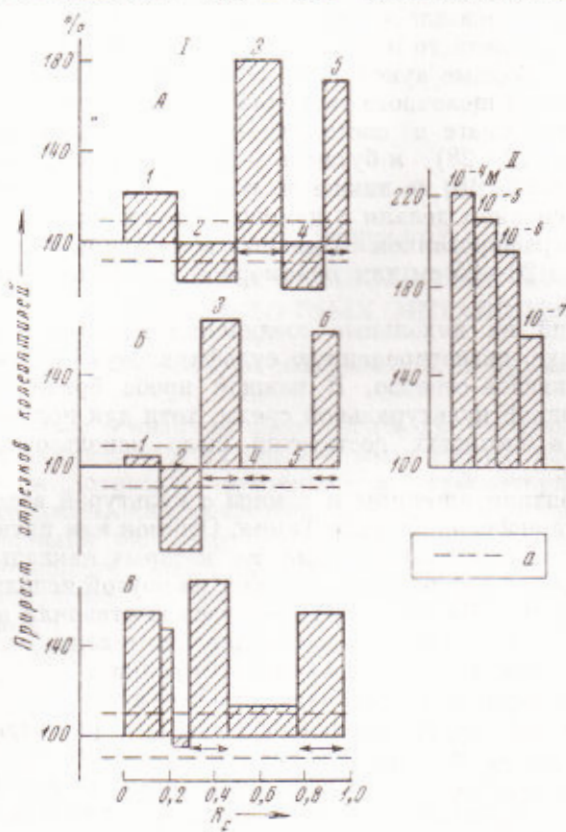


Рис. 1. Гистограммы роста coleoptилей. I — на элюатах пятен, полученных после двумерного хроматографирования веществ культуральной среды в различных системах растворителей: А — *n*-бутанол — уксусная кислота — вода (40 : 12 : 28), Б — *n*-бутанол — NH₄OH — вода (100 : 3 : 16), В — вода; II — на различных молярных концентрациях ИУК. а — область недостоверных величин. Стрелками обозначены зоны, давшие положительную реакцию на индольные соединения

ни с одним из применявшихся свидетелей, ни с характеристикой отдельных индольных соединений, описанных в литературе. В табл. 1 IIа обозначено соединение, появляющееся на хроматограмме после щелочного гидролиза вместо зоны II и дающее по ряду характеристик совпадение с этиловым эфиром ИУК.

Биологическое испытание элюатов пятен хроматограмм и сравнение с препаратом ИУК показало, что все описанные выше зоны биологически активны. Они одновременно вызывали стимуляцию роста coleoptилей и деления клеток на газонах с водорослями.

На рис. 1 приведены гистограммы роста coleoptилей в элюатах отдельных пятен, полученных после двумерной хроматографии в каждой из упомянутых выше систем. Такой прием⁽¹⁰⁾ позволил получить пятна, в значительной мере очищенные от сопутствующих окрашенных соединений. Как можно видеть, наибольшей стимулирующей активностью для coleoptилей обладали элюаты пятен

индольных соединений при применении кислой системы растворителей, однако в этом случае активность пятна у фронта могла определяться не только ИУК, но и какими-то иными расположенными у фронта индольными соединениями. В щелочной системе растворителей, хотя и происходило наилучшее разделение пятен, иногда наблюдалось отсутствие активности у некоторых пятен индольной природы. При хроматографии в воде, помимо двух пятен, давших положительный ответ на индольные соединения и обладающих биологической активностью, стимуляцию роста coleoptилей давали также два пятна у старта. Оба флуоресцировали в у.-ф.: первое — голубым, второе — желто-зеленым светом.

На рис. 1 можно видеть пятна, давшие ингибирование, однако этот вопрос требует специального рассмотрения. Здесь же (рис. 1, II) приведен рост coleoptилей на различных молярных концентрациях ИУК. Можно видеть, что максимальное растяжение клеток coleoptилей, вызванное

активными веществами среды, примерно соответствует росту на растворах ИУК с концентрацией 10^{-6} — 10^{-7} М.

Необходимо отметить, что вырезанное с хроматограммы пятно с предполагаемой ИУК при наложении на газон с водорослями, как правило, давало более слабую стимуляцию роста водорослей, чем второе биологически активное вещество индольной природы. Это пятно давало следующие цвета качественных реакций: с реактивом Эрлиха — вишнево-лиловое, Сальковского — розовое, с диазотированной сульфаниловой кислотой — желто-оранжевое.

Для дополнительного подтверждения наличия в культуральной среде продуцируемой хлореллой ИУК пятно предполагаемого вещества очищалось перехроматографированием⁽¹¹⁾ и затем сравнивались спектры абсорбции в у.-ф. области данного соединения и химически чистой ИУК. На рис. 2 видно, что спектры эти идентичны, оба имеют максимум при 285 мк.

Расчеты по спектрам абсорбции показали, что в культуральной среде ИУК содержалась в концентрации 10^{-6} — 10^{-7} М.

Таким образом, хроматографический анализ, определение R_f пятен в различных разделительных смесях, характер свечения пятен в у.-ф., цвета качественных реакций, ростовая реакция биотестов, у.-ф. спектр абсорбции исследуемых веществ позволяют сделать вывод, что во внеклеточных метаболитах бактериально чистой культуры хлореллы присутствует индоллил-3-уксусная кислота. Кроме того было обнаружено неизвестное биологически активное вещество (или вещества), вероятно, индольной природы.

Полученные данные в известной мере восполняют существующий пробел в знаниях об участии веществ гормональной природы в обмене фотоавтотрофных одноклеточных организмов и дают возможность использовать водоросли для изучения механизма действия ростовых веществ на клеточном уровне. Необходимо учитывать присутствие стимуляторов роста в культуре водорослей при организации интенсивного культивирования с рециркуляцией питательной среды, при возможном применении биомассы или автолизата водорослей как субстрата для культивирования гетеротрофных организмов и изолированных культур тканей. Данные о ростовых веществах у водорослей могут быть также привлечены к трактовке понимания путей естественной регуляции развития популяций в природных водоемах.

Авторы приносят благодарность В. И. Кефели, принявшему участие в обсуждении результатов, представленных в данном сообщении.

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

Поступило
17 VI 1970

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ E. G. Jørgensen, *Physiol. Plant.*, 9, 712 (1956). ² M. Lefevre, *Algae and Man*, Proc. of the NATO Adv. St. Inst., 1964, p. 337. ³ H. M. Conrad, P. Saltman, *Physiol. and Biochem. of Algae*, 1962, p. 663. ⁴ Sh. Suda, *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, Ser. 4, 26, №№ 1—2, 189 (1965). ⁵ J. A. Bentley, *Nature*, 181, № 4622, 1499 (1958). ⁶ J. A. Bentley, *Botanica marina*, 8, № 1, 149 (1965). ⁷ J. A. Bentley-Movat, *Wiss. Zs. d. Univ. Rostock*, 16 Jahrg., math.-naturw. Rei. H. 4/5 (1967). ⁸ M. R. Ahmad, A. Winter, *Planta (Berl.)*, 78, 277 (1968). ⁹ М. И. Таурт, *Физиол. раст.*, 15, 4, 665 (1968). ¹⁰ K. Schwarz, A. Bitancourt, *Science*, 126, № 3274, 607 (1957). ¹¹ L. Sequeira, P. H. Williams, *Phytopathology*, 54, № 10, 1240 (1964).

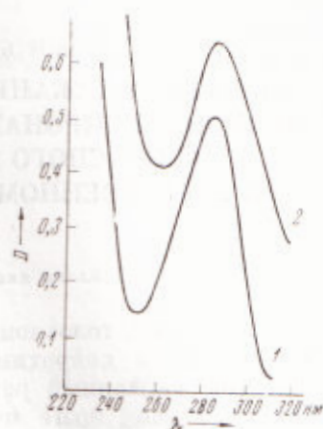


Рис. 2. Ультрафиолетовые спектры абсорбции чистой ИУК (10^{-4} М) (1) и ИУК, выделенной из экстрактов культуральной среды хлореллы (2) (этанольные растворы)