

Э. О. САРДАРЯН

О СВЯЗИ ПРОЦЕССОВ ОБРАЗОВАНИЯ ПИГМЕНТОВ И СИНТЕЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ *AZOTOBACTER CHROOSCOCUM*

Установлено, что повышение концентрации поваренной соли в среде Эшби способствует усилению процесса образования пигмента у испытуемых штаммов *Azotobacter chroococcum*. Такой же эффект оказывают и некоторые углеводы. Наблюдается прямая корреляция между активацией пигментации культуры и увеличением капсулообразования клеток в связи с повышением концентрации NaCl в среде Эшби. С усилением пигментации штаммов азотобактера уменьшается количество фенольных соединений. По своей природе и пигменты, и фенолы, видимо, относятся к одной и той же группе веществ.

Известно, что повышенные концентрации солей (хлоридов, сульфатов и др.) влияют на жизнедеятельность азотобактера. Об отношении этой бактерии к различным дозировкам поваренной соли приводятся данные в работах многих исследователей [1, 5, 10, 16—18], которые выявили, главным образом, влияние NaCl на рост, развитие и азотфиксирующую активность азотобактера. Незученным является вопрос о воздействии поваренной соли разных концентраций на синтез физиологически активных веществ.

В наших ранних опытах, проводимых с применением бумажной и тонкослойной хроматографии из множества штаммов *Az. chroococcum* методом экстракции были обнаружены вещества, обладающие ингибиторным действием на колеоптилии пшеницы, химическая природа которых аналогична фенольным соединениям. Нами наблюдалось также изменение синтеза этих веществ в связи с уровнем образования пигментов. С этой точки зрения представляет определенный интерес выяснение влияния различных концентраций поваренной соли на способность пигментообразования азотобактера и синтез физиологически активных веществ.

Все виды азотобактера при выращивании на искусственных питательных средах образуют пигменты, цвет и свойства которых не одинаковы. По своей химической природе они относятся к группе меланинов [21—22]. Образование пигментов зависит от таких факторов, как условия питания, состав компонентов среды, способ инкубации, стадии развития клеток, интенсивность роста и т. д. [10, 13, 16—20, 23].

Целью настоящей работы явилось получение различных по интенсивности пигментаций из штаммов азотобактера с изучением морфологически активных соединений фенольной природы в связи со способностью к пигментообразованию.

Материал и методика. Опыты проводились со штаммами *Az. chroococcum* 40, 11, 28, 63, 65, 56, полученными из музейных культур ВНИИ с/х микробиологии.

В агаризованную среду Эшби вносились поваренная соль в концентрациях 0,2—4,0% из расчета на литр. Для посева штаммов готовились водные суспензии из косяков трехсуточной культуры. В каждую чашку Петри вносилось по 3 капли суспензии. Повторность опыта—шестикратная.

После пятисуточной инкубации штаммов азотобактера при 26° проводились наблюдения морфолого-культуральных признаков по вариантам.

Результаты и обсуждение. Опыт показал, что при выращивании азотобактера на среде Эшби с различными концентрациями NaCl интенсивность пигментообразования у всех испытуемых штаммов усиливается. Образующиеся пигменты имеют оттенки от слабовато-серого до темно-коричневого.

У штаммов азотобактера, инкубированных при концентрации 0,2 (обычная среда Эшби—контроль) и 0,5% в пятисуточном возрасте, процесс пигментообразования протекает медленно. С повышением концентрации поваренной соли до 1,5—3,0% наблюдается бурное пигментообразование.

Дальнейшая инкубация штаммов азотобактера приводит к интенсивному высыханию культуры в вариантах с высокими концентрациями NaCl.

Следует отметить, что уровень слизиобразования и накопление биомассы у штаммов азотобактера во всех опытных вариантах почти одинаковы, за исключением варианта при наличии NaCl с 3,5—4,0%. Эти концентрации угнетающе действуют на рост азотобактера. По-видимому, они являются предельными для нормального развития культуры.

Из литературных данных известно, что капсулообразование у *Az. chroococcum* наступает в стадии старения культуры и, как предполагает Федоров [13], слизистая капсула играет защитную роль в процессе развития клеток азотобактера. Омелянский [8] считает, что размеры капсул сильно колеблются в зависимости от состава минеральных солей в среде, условий питания, стадий развития клеток, роста культуры и т. д.

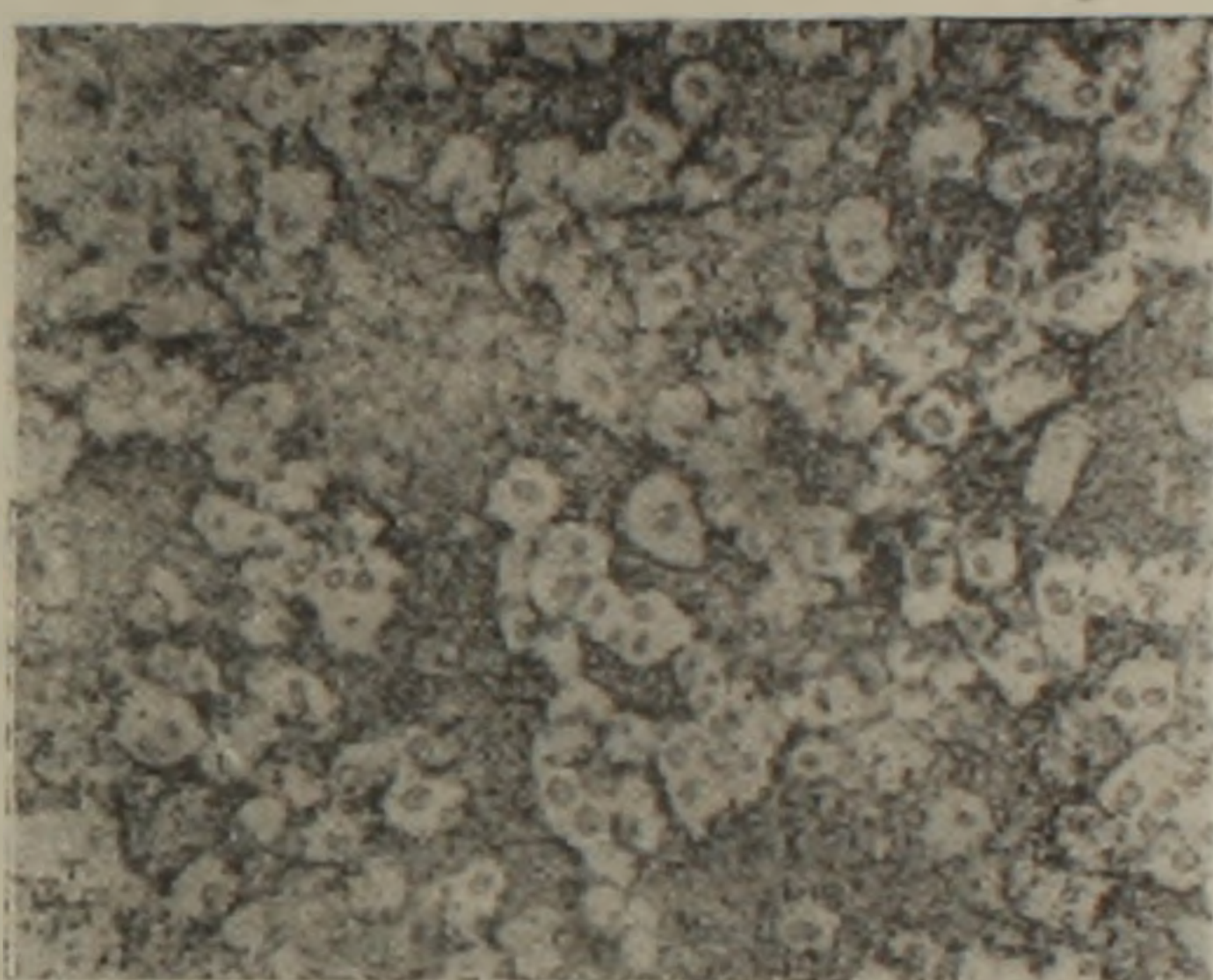
Микроскопические наблюдения образования капсул у штаммов клеток азотобактера проводились методом «негативной окраски» жидкой тушью. При этом брались только штаммы с концентрацией поваренной соли 0,2 (обычная среда Эшби—контроль), 1,5 и 3,0%. Характер интенсивности образования капсул *Az. chroococcum*, шт. 56 отражен на рисунке.

Процесс капсулообразования усиливается в условиях повышенной концентрации поваренной соли в среде Эшби. Как видно из рис., максимальная интенсивность капсулообразования в пятисуточном возрасте культуры наблюдается при концентрации NaCl 3,0%.

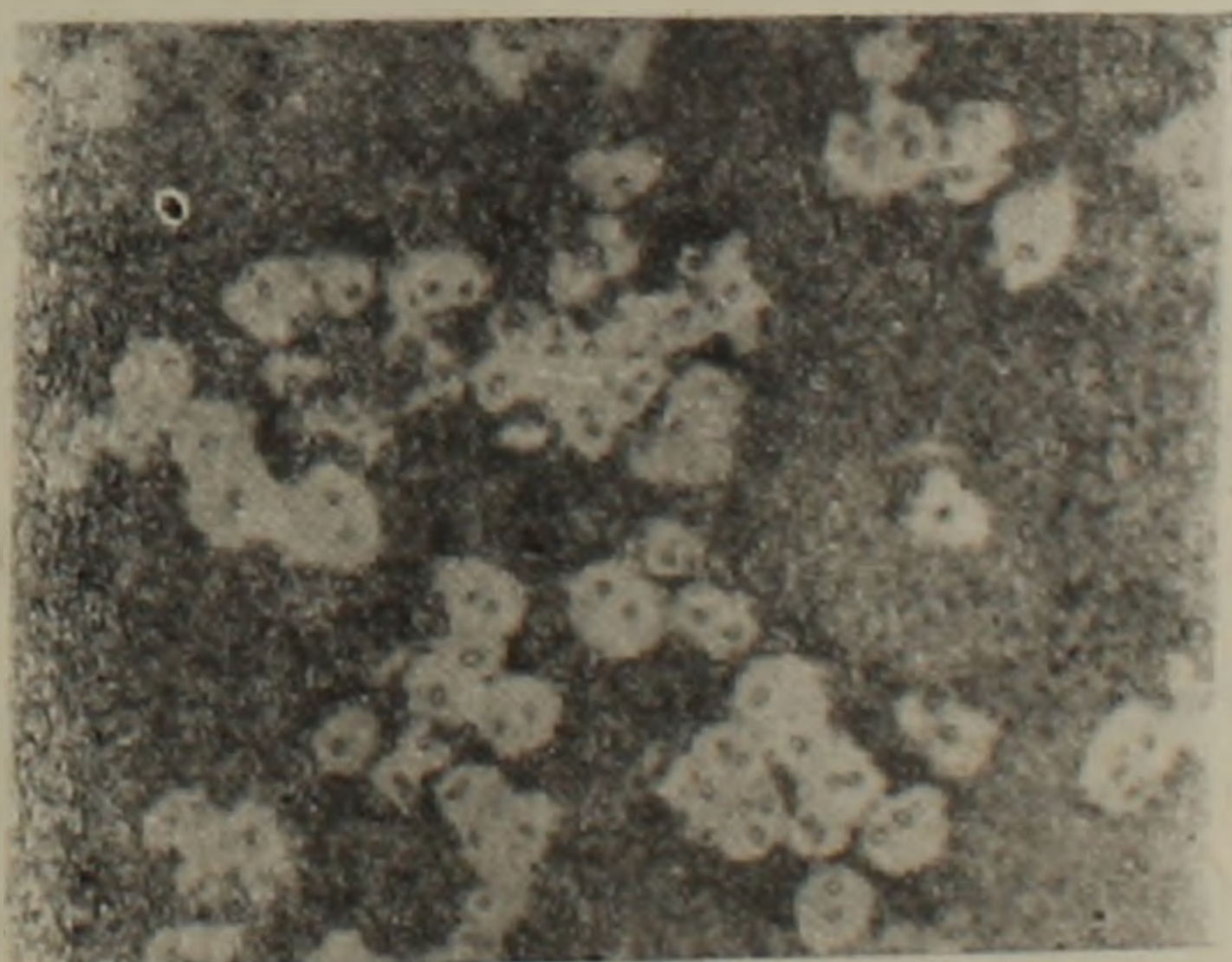
Результаты лабораторных опытов показали, что инкубация азотобактера на среде Эшби с различными концентрациями NaCl оказывает неодинаковое влияние на капсулообразование клеток и пигментацию



а



б



в

Рис. Интенсивность капсулообразования *Azotobacter chroococcum*, шт. 56, выращенной на среде Эшби при разных концентрациях поваренной соли.

А. Концентрация NaCl—0,2%, Б. Концентрация NaCl—1,5%.

В. Концентрация NaCl—3,0%.

культуры. При этом повышенные концентрации его положительно действуют на вышеуказанные процессы. Следовательно, можно полагать, что существует определенная положительная корреляция между интенсивностью процесса образования капсул клеток и пигментацией культуры у штаммов азотобактера.

Интересно было также наблюдать эту закономерность при развитии культуры *Az. chroococcum* на среде Эшби с различными источниками углеводного питания.

Источниками углеводного питания азотобактера, по многочисленным данным, могут служить самые разнообразные органические соединения: сахара, спирты, органические кислоты. Влияние источников углевода на морфолого-культуральные и физиологические свойства азотобактера, показано в работах многих исследователей [2, 5, 9, 11, 12].

В агаризованную среду вносились моносахариды (глюкоза, галактоза), дисахариды (сахароза, мальтоза, лактоза), полисахариды (крахмал), трехатомный спирт (глицерин), шестиатомный спирт (маннит). Все источники углевода вносились из расчета 20 г на литр среды. Повторность опыта—шестикратная, экспозиция инкубации—пятисуточная.

Наблюдения над культуральными признаками показали, что пигментообразовательный процесс протекает медленно при наличии в среде галактозы, лактозы, сахарозы, глюкозы и крахмала. При наличии глицерина и маннита происходит интенсивное капсулообразование.

Микроскопические исследования клеток штаммов азотобактера еще раз подтвердили наши предположения, что существует положительная прямая корреляция между процессом протекания пигментации и интенсивностью капсулообразования клеток азотобактера.

Следующим этапом нашей работы явилось изучение синтеза физиологически активных веществ фенольной природы, продуцируемых штаммами *Az. chroococcum* в связи с изменением процесса протекания пигментообразования. Однако получение различных по интенсивности пигментирующих форм у штаммов азотобактера при помощи изменения компонентов питательной среды (источники углевода, минеральные соли), казалось неправильным, так как эти соединения могли бы непосредственно влиять на механизм синтеза физиологически активных веществ фенольного характера. Поэтому мы попытались получить различные по интенсивности пигментирующие формы штаммов азотобактера с помощью изменения факторов внешних условий.

Известно, что интенсивность пигментообразования ускоряется в зависимости от объема питательной среды [8]. Учитывая это, инкубация штаммов азотобактера проводилась следующим образом:

- а) на жидкой среде Эшби (30 мл) в колбах—при таких условиях процесс пигментации культуры протекает в очень замедленном темпе;
- б) на твердой питательной среде Эшби (30 мл) в каждую чашку Петри (толстый слой пластинки)—пигментация развивается нормально;
- в) на среде Эшби—агар 15 мл в каждую чашку Петри (тонкий

слой пластинки) — процесс образования пигмента наступает очень быстро.

Таким образом, были получены отличающиеся по интенсивности пигментообразования штаммы (полное отсутствие пигмента, начинающаяся стадия пигментации и клетки, находящиеся в завершенной стадии пигментации).

Результаты морфологических исследований аналогичны данным вышеописанных опытов.

После пятисуточной инкубации штаммов азотобактера при 26° выращенная сырая биомасса (10—по варианту) экстрагировалась подкислением (рН 2) ацетоном.

Имеются данные, что пигмент, образуемый азотобактером, нерастворим в воде, спирте, эфире, хлороформе, ацетоне, сероуглероде и переходит в растворы при подщелачивании среды [15]. Исходя из этого, биомассы штаммов азотобактера вторично экстрагировали ацетоном при рН 8, в результате чего получили две фракции ацетонового экстракта, которые подвергались биохимическому исследованию. После выпаривания оставшиеся вещества растворяли в 3 мл спирте, для растворения пигментов использовался подщелоченный спирт.

Разделение сложных смесей веществ проводилось методом тонкослойной хроматографии на целлюлозе в системе растворителей п-бутанол—уксусная кислота—вода (4:1:5). На хроматографическую пластинку наносилось по 0,02 мл спиртового элюата.

Для определения химической природы обнаруженных при УФ освещении веществ применялись качественные специфические цветные реакции, известные в литературе при идентификации фенольных соединений 3, 4, 6, 14. О количестве обнаруженных соединений судили по интенсивности окрашивания (таблица).

Таблица

Интенсивность окрашивания веществ при идентификации

В а р и а н т ы о п ы т а

Выращенный на жидкой среде Эшби. Пигментация отсутствует			Выращенный на среде Эшби-агар (толстый слой пластинки). Пигментация в начальной стадии			Выращенный на среде Эшби-агар (тонкий слой пластинки). Пигментация находится в завершенной стадии		
Rf	свечение при уф	интенсивность окрашивания		свечение при уф	интенсивность окрашивания		свечение при уф	интенсивность окрашивания
0,85	поглощение	+++	0,80	поглощение	+++	0,65	слабо голубое	следы
0,00	нет	—	0,00	слабо желтое	+	0,00	желтое	++

Примечание: +++ максимальная интенсивность окрашивания вещества.
+ минимальная интенсивность окрашивания вещества.

Выяснилось, что соединения фенольной природы на хроматограммах расположены в $R_f=0,80-0,85$, тогда как пигменты остаются на старте. Цветные реакции в обоих случаях одинаковые, отличаются только по R_f .

Таким образом, из полученных результатов можно прийти к выводу, что при усилении процесса пигментообразования уменьшается количество фенольных соединений, расположенных $R_f 0,80-0,85$. Это дает основание полагать, что существует обратная корреляция между интенсивностью образования пигментов и синтеза физиологически активных соединений фенольного характера.

Институт ботаники
АН АрмССР

Поступило 31.VIII 1973 г.

Է. Ն. ՍԱՐԳՍՅԱՆ

AZOTOBACTER CHROOCOCCUM ՊԻՔՄԵՆՏԱԹԱՋԱՑՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍԻ
ԵՎ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱՊԵՍ ԱԿՏԻՎ ՆՅՈՒԹԵՐԻ ՍԻՆԹԵԶԻ ՓՈԽԱԴԱՐՁ ԿԱՊԻ ՄԱՍԻՆ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Հաբորատոր ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ էջբի սննդամիջավայրում կերակրի աղի բարձր քանակները դրականապես են ազդում Az. chroococcum-ի տարբեր շտամների պիգմենտառաջացման պրոցեսների վրա: Նույնատիպ ազդեցություն են թողնում նաև մի քանի ածխաջրատներ: Նկատվում է ուղղակի հարաբերակցություն կուլտուրայի պիգմենտացիայի ինտենսիվացման և պարկուճավորման միջև՝ կախված կերակրի աղի կոնցենտրացիայի փոփոխությունից: Պիգմենտառաջացման ինտենսիվացմանը զուգընթաց նվազում է ազոտաբակտերների կողմից սինթեզված ֆենոլային խմբին պատկանող նյութերի քանակը: Քիմիական վերծանումից պարզվել է, որ թե՛ արտազատված պիգմենտները և թե՛ ֆենոլները քիմիապես նույնատիպ են:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бабак Н. М. Микробиология 35, вып. 1, 1966.
2. Зиновьева Х. Г. Микробиология 18, вып. 1, 1956.
3. Зопромов М. И. Биохимия катехинов. М., 1964.
4. Кефели В. И. и Турецкая Р. Х. В докл. «Физиологически активные вещества и их применение в растениеводстве», Вильнюс, 1965.
5. Курдина Р. И. Синтез белка и аминокислот микроорганизмами. Изд. АН Казах. ССР, 1968.
6. Метницкий Л. В., Короблева Н. Р. и др. Биохимия иммунитета и покоя растений. М., 1969.
7. Миротворский К. А. и Григорян Т. М. Изв. Туркм. ФАН СССР, 5—6, 1945.
8. Омелянский В. Л. Арх. биол. наук, 20, 1916.
9. Работнова И. Л. и Глаголева Р. М. Микробиология, 22, 5, 1953.
10. Рубенчук Л. И. Азотобактер и его применение в сельском хозяйстве. Киев, 1960.
11. Рубенчук Л. И. Успехи микробиологии, М., 1965.

12. Федоров М. В. Биологическая фиксация азота атмосферы, М., 1952.
13. Федоров М. В. Микробиология, М., 1963.
14. Хаймс И. М. и Мацек К. Хроматография на бумаге, М., 1962.
15. Beijerinck M. W. Zentr. f. Bacter. Abt. 11, 7, 1901.
16. Bukatsch F., Burger K. u. Schluter M. Zentr. f. Bacter. Abt. 11, 1956.
17. Buktasch F. u. Heltzer J. Arch. Microbiol. 17, 1962.
18. Iswaran V. and Sen A. Indian Soc. Sol. 1958.
19. Kuster E. Zentr. Bact. Abt. 11, 13, 1906.
20. Kuster E. Zentr. f. Bact. Abt. 11, 1953.
21. Rippel A. u. Ludwig O. Zentr. f. Bact. Abt. 11, 1925.
22. Stapp C. Bloch. Zeitsch. 141, 1923.
23. Prazmowski A. Zentr. f. Bact. Abt. 11, 1912.