



УДК 577.1

Н. А. Козыровская, В. Л. Макитрук, Э. Рукдашел

АЗОТФИКСИРУЮЩИЕ ВИДЫ *KLEBSIELLA* ВЫДЕЛЯЮТ ИНДОЛИЛ-3-УКСУСНУЮ КИСЛОТУ *

Азотфиксирующие бактерии, изолированные из растений (*K. planticola* и *K. oxytoca*), исследованы на способность выделять индольные соединения, включая гормон роста индолил-3-уксусную кислоту (ИУК). Присутствие индолов в культуральной жидкости бактерий изучали методом тонкослойной хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления. Бактерии продуцировали ИУК при добавлении в питательную среду *L*-триптофана. В экстрактах культуральной жидкости бактерий обнаружены также индолил-3-молочная кислота, индолил-3-пировиноградная кислота, индолил-3-ацетальдегид.

Представители многочисленной группы ризосферных бактерий обладают свойством выделять ауксины. Вначале с помощью биотестов, а позднее — инструментальными методами исследования установлена способность к синтезу ауксинов у ризобий [1], ассоциативных бактерий (азоспириллы) [2, 3], свободживущих (азотобактер) [4, 5], штамобактерий [6], фитопатогенных микроорганизмов [7, 8]. Изначальная функция воздействия ауксинов на растение заключается в изменении физических и биохимических свойств клеточной стенки, вследствие этого изменяется тургор клетки, что приводит к ее растяжению и ускоренному делению. У фитопатогенных микроорганизмов ауксин индолил-3-уксусная кислота (ИУК) является одним из факторов патогенности, способствующим формированию галов или волосяного корня на инфицированных растениях [9—12]. Перечисленные выше непатогенные бактерии представляют интерес как потенциальные экологически чистые удобрения. Снабжая растение связанными формами азота, они также способны стимулировать его рост, выделяя фитогормоны. В данном сообщении представлены результаты, свидетельствующие о выделении ИУК и других индольных соединений азотфиксирующими бактериями рода *Klebsiella*, выделенными из растений различных регионов СРБ и Украины. На основе изучения культурально-морфологических, физиологических и молекулярно-биологических характеристик бактерий-изоляты идентифицированы как *K. oxytoca* и *K. planticola* (будет опубликовано отдельно). В работу были взяты также неазотфиксирующие штаммы *K. pneumoniae* 13 883 ATCC и 12 351 IMA и азотфиксирующий штамм *K. pneumoniae* 50 231 CDC (из коллекции Ин-та генетики университета г. Байройта, ФРГ). Бактерии предварительно тестировали на способность к биосинтезу индолов реактивом Сальковского [13]. Индольные соединения идентифицировали методом тонкослойной хроматографии и определяли количественно методом высокоэффективной жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД).

Бактерии инкубировали в средах (минимальной среде А [14] или безазотной [15]), содержащих 0,1 % *L*-триптофана, в течение 1—3 сут при температуре 30 °С. Клетки бактерий собирали центрифугированны-

* Представлена членом редколлегии В. А. Кордюмом.

ем, дважды промывали физраствором, высушивали и взвешивали. Культуральную жидкость доводили до pH 3,0, производные индола экстрагировали равным объемом этилацетата, обезвоживали сульфатом натрия, последний удаляли фильтрацией. Этилацетатные фракции высушивали под струей аргона при 37 °С. Сухой материал растворяли в 1 мл метанола, оставшийся дебрис удаляли фильтрацией (размер пор 0,2 мкм), ТХС проводили на пластинках Alufolien Kieselgel 60 F254 («Мегск», ФРГ) в хроматографической системе хлороформ : вода : уксусная кислота (80 : 15 : 5). На высушенных хроматограммах вещества, содержащие индольный гетероцикл, обнаруживались в УФ-свете и при обработке реактивом Эрлиха [16]. Индолил-3-ацетальдегид (ИААльд) дополнительно идентифицировали 0,4 %-ным раствором 2,4-динитрофенилгидразина (ДНФГ) в 2 н. HCl. Для ЖХВД использовали систему Gold 401 («Вектап», США) с УФ-детектором (модель 167). Индолы разделяли на колонке C18 ODS (150×4,0 мм) с размером частиц 8 мкм. Материал элюировали при комнатной температуре в изократическом режиме хроматографической системой метанол : вода : уксусная кислота (40 : 60 : 1). Скорость элюции 1 мл/мин. Измерение проводили при 280 нм. Анализ и интеграцию площадей пиков осуществляли по программе ЖХВД. Для количественного определения индолов были построены калибровочные кривые стандартных растворов индольных соединений.

Согласно предварительному исследованию культуральной жидкости бактерий реактивом Сальковского, неазотфиксирующие клебсиеллы не способны к образованию индолов и в дальнейшей работе не использовались. В этилацетатных экстрактах азотфиксирующих клебсиелл с помощью ТСХ выявлена ИУК, индолил-3-молочная кислота (ИМолК), индолил-3-пировиноградная кислота (ИПК), ИААльд, индол. ИУК и ИМолК проявлялись на хроматограммах в виде синих пятен, ИПК — серо-желтого, ИААльд — желто-коричневого, индол — фиолетового пятна при орошении пластин реактивом Эрлиха. 2,4-ДНФГ давал специфическую оранжево-коричневую окраску при взаимодействии с ИААльд. Хроматографическая подвижность обнаруженных индольных соединений (RF): ИУК — 0,67; ИМолК — 0,27; ИПК — 0,14; ИААльд — 0,74; индола — 0,83.

При исследовании экстрактов бактерий с помощью ЖХВД все обнаруженные индольные производные показали время удержания на колонке, идентичное таковому соответствующих стандартов. Результаты анализа экстрактов бактерий представлены в табл. 1. Бактерии выделяли в ростовую среду ИУК и другие индолы, если в ней присутствовал *L*-триптофан. Без добавки *L*-триптофана ИУК синтезировалась в следовых количествах. Максимальные количества ИУК бактерии син-

Таблица 1

Выделение ИУК бактериями рода *Klebsiella*

IAA production by bacteria of Klebsiella genus

Питательная среда	<i>K. oxytoca</i> VN-13		<i>K. planticola</i> UK-8	
	мкг/мл	мкг/мг	мкг/мл	мкг/мг
Минимальная	12,35±0,21	12,04±0,025	1,93±0,85	1,61±0,07
Безазотная	11,93±0,35	—	2,01±0,51	—
Питательная среда	<i>K. planticola</i> UK-36		<i>K. pneumoniae</i> 50231 CDC	
	мкг/мл	мкг/мг	мкг/мл	мкг/мг
Минимальная	2,51±0,03	2,39±0,035	5,02±0,1	3,48±0,065
Безазотная	2,35±0,24	—	4,33±0,31	—

тезировали через трое суток после инокуляции, в стационарной фазе роста; ИПК, ИМолК — в логарифмической, и в дальнейшем их количество уменьшалось (табл. 2). Это может быть аргументом в пользу того, что биосинтез ИУК из *L*-триптофана у бактерий рода *Klebsiella* осуществляется через дезаминирование триптофана до ИПК, которая, с одной стороны, декарбоксилируется до ИААльд, легко окисляющегося

Таблица 2
Динамика выделения индольных производных бактериями
K. oxytoca VN-13
Dynamics of indoles production by K. oxytoca VN-13

Индольное производное	Концентрация, мкг/мл		
	1 сут	2 сут	3 сут
ИУК	1,64±0,15	8,58±0,34	12,35±0,21
ИМолК	48,50±0,24	36,21±1,41	28,32±1,52
ИПК	64,52±2,23	52,33±1,24	35,56±3,25

до ИУК, с другой — она восстанавливается с образованием ИМолК, обладающей ауксиноподобным действием [17]. Такой путь превращения *L*-триптофана в ИУК описан для растений и азоспирилл [3, 18]. Фитопатогенные бактерии конвертируют ИУК через индолил-3-ацетамид [19, 20]. Для *A. brasilense* описан путь биосинтеза ИУК через образование триптамина и индолил-3-ацетальдегида [21]. Установление пути биосинтеза ИУК из *L*-триптофана у бактерий рода *Klebsiella* облегчает возможность идентификации генов конверсии *L*-триптофана в ИУК.

Авторы выражают благодарность за техническую помощь Т. Н. Вознюк и А. С. Журавлеву.

NITROGEN-FIXING KLEBSIELLA SPECIES PRODUCE INDOLE-3-ACETIC ACID

N. A. Kozyrovskaia, V. I. Makitruk, E. Ruckdashell

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Lehrstuhl für Genetik, Universität Bayreuth, FRG

Summary

Nitrogen-fixing bacteria isolated from plant *K. planticola* and *K. oxytoca* were examined for their ability to produce indole compounds including the plant hormone indole-3-acetic acid. Indoles presented in culture filtrates were identified by thin-layer chromatography and quantitated by high-performance liquid chromatography. Bacteria produced IAA when liquid media were supplemented with *L*-tryptophan. Additional indoles were found in culture filtrates: indole-3-lactic acid, indole-3-pyruvic acid, indole-3-acetaldehyde.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mass spectrometric identification of indole compounds produced by *Rhizobium* strains / J. Badenoch-Jones, R. E. Summons, B. Entsch, et al. // *Biomed. Mass Spectrom.*— 1982.— 9, N 3.— P. 429—437.
2. Tien T. M., Gaskins M. H., Hubbel D. H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.) // *Appl. Environ. Microbiol.*— 1979.— 37, N 5.— P. 1016—1024.
3. Hartmann A., Singh M., Klingmüller W. Isolation and characterization of *Azospirillum mutants* excreting high amounts of indoleacetic acid // *Can. J. Microbiol.*— 1983.— 29, N 8.— P. 916—923.
4. Lee M., Breckenridge C., Knowles R. Effect of some culture conditions on the production of indole-3-acetic acid and gibberellin-like substance by *Azotobacter vinelandii* // *Ibid.*— 1970.— 16, N 12.— P. 1325—1330.

5. *Barca J. M., Brown M. E.* Effects on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant growth regulating substances // *J. Appl. Bacteriol.*— 1974.— 37, N 4.— P. 583—593.
6. *Неуен Т. К.* Морфологические и физиологические особенности синезеленой водоросли *Haematococcus fontinalis* и возможности ее использования в повышении урожайности сельскохозяйственных культур: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Киев, 1987.— 17 с.
7. *Gruen H. E.* Auxins and fungi // *Annu. Rev. Plant Physiol.*— 1959.— 10.— P. 405—440.
8. *Fett W. F., Osman S. F., Dunn M. F.* Auxin production by plant-pathogenic pseudomonads and xanthomonads // *Appl. Environ. Microbiol.*— 1987.— 53, N 8.— P. 1839—1845.
9. *Smidt M., Kosuge T.* The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan-resistant mutants of *Pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders // *Physiol. Plant Pathol.*— 1978.— 13, N 2.— P. 203—214.
10. *Agrobacterium Ti* plasmid indoleacetic acid gene is required for crown gall oncogenesis / *S. T. Liu, K. L. Perry, C. L. Schardl, C. I. Kado* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*— 1982.— 79, N 2.— P. 2812—2816
11. *Complementation of Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing aux mutant by genes from TR-region of the Ri plasmid of Agrobacterium rhizogenes* / *I. A. Oflringa, L. S. Melchers, A. J. G. Regenburt-Tuin: et al.* // *Ibid.*— 1986.— 83, N 18.— P. 6935—6939.
12. *Dual promoter of Agrobacterium tumefaciens mannopine synthase genes is regulated by plant growth hormones* / *W. H. Langridge, K. J. Fitzgerald, C. Konec et al.* // *Ibid.*— 1989.— 89, N 9.— P. 3219—3223.
13. *Tang Y. M., Bonner J.* The enzymatic inactivation of indoleacetic acid. I. Some characteristics of the enzyme contained in pea seedlings // *Arch. Biochem.*— 1947.— 13, N 1.— P. 11—25.
14. *Миллер Д.* Эксперименты в молекулярной генетике // Под ред. С. И. Алиханяна.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
15. *Chromosomal integration of Klebsiella nitrogen fixation genes in Escherichia coli* / *F. C. Cannon, R. C. Dixon, J. R. Postgate et al.* // *J. Gen. Microbiol.*— 1974.— 80, N 1.— P. 227—241.
16. *Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам* / Под ред. О. Миксш.— М.: Мир, 1982.— 396 с.
17. *Rigaud J.* L'acide indolyl-3-lactique et son métabolisme chez *Rhizobium* // *Arch. Mikrobiol.*— 1970.— 72, N 2.— P. 297—307.
18. *Schneider E. A., Wightman F.* Metabolism of auxin in higher plants // *Annu. Rev. Plant Physiol.*— 1974.— 25.— P. 487—513.
19. *Kosuge T., Heskett M. G., Wilson E. E.* Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. I. The conversion of L-tryptophan to indole-3-acetamide by an enzyme system from *Pseudomonas savastanoi* // *J. Biol. Chem.*— 1966.— 241, N 16.— P. 3738—3744.
20. *Agrobacterium T-DNA gene I codes for tryptophan 2-monooxygenase activity in tobacco crown gall cells* / *H. van Onckelen, E. Prinsen, P. Rudelsheim et al.* // *FEBS Lett.*— 1986.— 198, N 2.— P. 357—360.
21. *Reynders L., Vlassak K.* Conversion of tryptophan to indoleacetic acid by *Azospirillum brasilense* // *Soil. Biol. Biochem.*— 1979.— 11, N 2.— P. 547—548.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев
 Университет, Байройт, ФРГ

Получено 27.04.90

УДК 575.224.46

**Е. Л. Рубашевский, Л. Л. Лукаш, Е. Ф. Лысенко, Л. Н. Неборачко,
 С. И. Кириленко, Ю. В. Пацковский, Т. И. Бужневская**

**ХРОМОСОМНЫЕ МУТАЦИИ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
 ФИБРОБЛАСТАХ КИТАЙСКОГО ХОМЯЧКА,
 ТРАНСФИЦИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДОЙ
 pBR322, СОДЕРЖАЩЕЙ ГЕН ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА**

Было показано, что плазмиды pBR322 и pBR322ins (рекомбинантная плазида, содержащая ген инсулина человека) индуцируют абберации хромосом в культивируемых клетках китайского хомячка как на ранних сроках после трансфекции, так и в последующих поколениях клеток. Необходимо, таким образом, проводить тестирование на мутагенность молекул ДНК, создаваемых как для генотерапии наследственных болезней человека, так и для решения других задач.

© Е. Л. РУБАШЕВСКИЙ, Л. Л. ЛУКАШ, Е. Ф. ЛЫСЕНКО, Л. Н. НЕБОРАЧКО,
 С. И. КИРИЛЕНКО, Ю. В. ПАЦКОВСКИЙ, Т. И. БУЖНЕВСКАЯ, 1990