

С. В. ГОРЮНОВА

**ПРИЖИЗНЕННОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ ЛЕТУЧИХ ВЕЩЕСТВ
В ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ СИНЕЗЕЛЕННОЙ ВОДОРОСЛЬЮ
OSCILLATORIA**

(Представлено академиком Б. Л. Исаченко 5 XI 1948)

Изучая биологическую продуктивность водоемов, в частности, возможность обогащения их растворенными органическими веществами за счет выделений растущих водорослей, мы установили, что живые клетки синезеленой водоросли *Oscillatoria splendida* grev. выделяют в окружающую водную среду ряд веществ^(2, 3).

Поводом к определению содержания летучих органических кислот в фильтрах культуры *Oscillatoria* послужили некоторые наши наблюдения за процессами роста и развития самого растения, а также за состоянием исследуемого материала во время проведения анализов. Например, сгущая культуральную жидкость в вакууме при нейтральной реакции, мы заметили, что столь характерный для *Oscillatoria*, да и для некоторых других водорослей, а особенно для лучистых грибов, «тинистый запах» почти целиком переходит в отгон. При этом, повидимому, несмотря на мягкие условия сгущения (32—38° С), происходит некоторое расщепление компонентов, вызывающих этот запах. Так, остаточная жидкость обычно во время отгона обладала чрезвычайно приятным запахом гераниевого масла, который длительное время сохранялся во всей системе прибора. Жидкость отгона в приемной склянке, наоборот, обладала запахом, несколько сходным с первоначальным «тинистым», но в то же время и отличным от него — ясно чувствовался запах горького черного перца. Эти особенности заставили нас предположить в фильтрах культуры наличие эфирных масел. Как известно, эта группа веществ имеет с жирными маслами только чисто внешнее сходство, заключающееся в способности как тех, так и других растворяться только в органических растворителях. По химическим же свойствам они сильно отличаются между собой. Состав эфирных масел может быть очень разнообразен и представляет смесь веществ, относящихся к самым различным отделам органической химии. Так, установлено, что в них входят кислоты, высокомолекулярные спирты, альдегиды, кетоны и другие соединения.

Определения летучих кислот осуществлялись с помощью перегонки сгущенного в вакууме фильтра культуры водорослей с водяным паром. Метод этот основан на свойстве летучих кислот перегоняться в разбавленных растворах по определенным законам, характерным для каждой кислоты. Легкость перегонки возрастает с увеличением молекулярного веса, но до определенного предела, дальше которого наступает постепенный переход к кислотам нелетучим. К числу последних практически относятся монокарбоновые кислоты, начиная с C₁₂. Возможность присутствия трудно отгоняемых кислот, какими являются

кислоты с низким молекулярным весом, особенно муравьиная, вызывает большую продолжительность отгонки. Так, объем отгона должен превышать объем исходной жидкости в 20—30 раз.

В наших опытах для определения летучих кислот из сгущенного в 10 раз фильтрата бралось 400 см³. Раствор подкислялся фосфорной кислотой до посинения конговой бумажки. Отгон, как обычно, собирался в приемную колбу с отметкой на 100 см³. Для удаления углекислоты дестиллят прогревался с обратным холодильником, споласкивался и жидкость титровалась 0,01 N раствором NaOH в присутствии фенолфталеина. Сумма всех результатов титрования давала представление об общем количестве кислот, а начерченная на основании этих данных кривая — представление о количестве компонентов в среде.

Применение 0,01 N раствора NaOH в наших исследованиях обуславливалось сильным разведением кислот в испытуемом растворе. Так, при

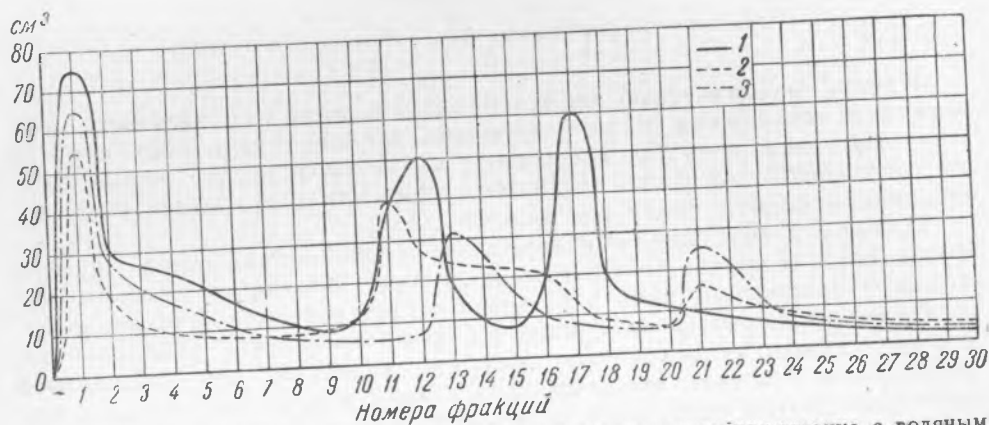


Рис. 1. Кривые титрования летучих кислот фильтрата культуры при отгонке с водяным паром: 1 — культура 2-месячная, 2 — культура 4-месячная, 3 — культура 12-месячная

титровании рекомендуемым 0,1 N раствором Ba(OH)₂ величины титрования фракций достигали порядка 0,2—0,3—0,4—1,0 см³. Естественно, что столь малые количества щелочи, пошедшей на нейтрализацию раствора, и трудности титрования баритом на воздухе при пересчетах могли привести к большим ошибкам и искажению результатов анализа.

По окончании титрования, собранный по основным фракциям (согласно кривой рис. 1) отгон сгущался на водяной бане и использовался затем для проведения качественных реакций отдельно в каждой фракции.

Применялись следующие качественные реакции (1, 4): на муравьиную кислоту — реакция с резорцином и серной кислотой; на уксусную кислоту — образование уксусно-этилового эфира (сравнение со стандартом); на масляную кислоту — образование масляно-бутилового эфира (сравнение со стандартом); на пропионовую кислоту — получение свинцовой соли, растворимой в холодной воде и нерастворимой в горячей. Результаты титрования представлены на рис. 1. (Общепринятыми являются кривые, воспроизведенные по суммарным подсчетам данных титрования; нам кажется более правильным использование кривых, начерченных по непосредственным данным титрования).

На основании представленных кривых совершенно ясно, что в перегоняемой с водяным паром культуральной жидкости содержится 3 летучих кислоты. Но так как качественные реакции дали положительный ответ только на присутствие в растворе муравьиной и уксусной кислот и отрицательный — на наличие масляной и пропионовой, то мы вправе

предположить, что третья кислота должна быть выше их по молекулярному весу. К сожалению, определение таких кислот (выше C_5) представляет большие трудности, связанные с их сильной летучестью. Одним из наиболее характерных внешних признаков для их распознавания служит специфичность запахов как непосредственно самих кислот (валериановая, пеларгоновая и др.), так и образующихся из них эфиров. По нашим предположениям, эта третья кислота ближе всего подходит к пеларгоновой. Но она не была выделена нами в чистом виде и количественно не определена.

Смесь трех кислот не разрешала воспользоваться для определения содержания каждой из них простым методом Дюкло, а чрезвычайная разбавленность кислот в растворе — получение их в виде серебряных солей или простых эфиров.

Анализируя полученный цифровой материал, мы должны признать, что, несмотря на небольшое количество летучих веществ в растворе, абсолютное значение их по отношению к общей массе сухих водорослей чрезвычайно велико, особенно если учесть всю массу этих веществ, выделяемых водорослями в течение всего летнего периода.

В наших определениях представлено не общее количество летучих кислот, а только то, которое находилось в растворе в момент снятия опыта. Кроме того, сам процесс анализа, а именно, сгущение в вакууме при нейтральной реакции, позволял уходить в отгон наиболее летучей из кислот, т. е. пеларгоновой, запах которой чувствовался все время. При перегонке с водяным паром она, вернее, ее остатки, почти целиком переходили в первую фракцию отгона.

Чтобы доказать предположение о выделении водорослями в окружающую внешнюю среду летучих веществ типа эфирных масел, мы сделали попытку определить и другие составные части этих летучих, т. е. вещества типа альдегидов, спиртов и эфиров.

Согласно принятой нами схеме разделения культуральной жидкости (⁵), при сгущении фильтрата в вакууме, при нейтральной реакции в отгон должны были перейти все эти соединения. Для более полного улавливания их за приемной склянкой вакуумного аппарата, в зависимости от поставленной задачи, ставились дополнительные приборы, так называемые ловушки, обычно трубки Пелигота или склянки Тищенко, наполненные соответствующими растворами. В случае определения альдегидов в них наливался раствор кислого-сернистокислого натрия. После сгущения отгон в количестве 9 л экстрагировался серным эфиром. В водном растворе после этого должны были остаться низшие спирты и альдегиды, в эфирном — сложные эфиры, высшие спирты, начиная от C_5 , и высшие альдегиды.

Переходя к определению простых альдегидов в водном растворе возможно, в присутствии спиртов, мы провели только общие определения, дающие представление о суммарном количестве их в данном растворе. Для этой цели 2000 см³ отгона нейтрализовалось 20% раствором сульфита натрия в присутствии розоловой кислоты как индикатора. После нейтрализации раствор при взбалтывании и нагревании титровался соляной кислотой. 1 см³ 2 N кислоты, пошедшей на нейтрализацию щелочности раствора (согласно реакции $RCOH + 2H_2O + H + 2Na_2SO_3 = RC(OH)(NaHSO_3)_2 + 2NaOH$), соответствовал 4,4 мг ацетальдегида. Придерживаясь этих же расчетов и в опытном материале, мы получили содержание ацетальдегида во всем отгоне 62,89 мг.

Вторично подтвердив наличие альдегидов с помощью качественных реакций с фуксинсернистой кислотой и димедоном, мы, несмотря на большую разбавленность их в растворе, пытались все же расфракционировать исследуемую жидкость, применяя дефлегматор. При разгонке мы получили две фракции (до 30° и от 75 до 90°), которые обладали очень резким, душающим запахом. Однако идентифицировать эти ве-

щества нам не удалось ввиду чрезвычайно ограниченного количества имевшегося материала.

Исследования, проведенные со второй частью отгона, перешедшей при разделении в эфир, были проведены нами также очень приближенно, главным образом только по весу остатка их после удаления серного эфира в токе угольной кислоты. Всего этих веществ было получено 0,0834 г в 9 л отгона или 10 л исходного фильтрата культуры (4-месячной, вес абсолютно сухих водорослей 4,0258 г).

Несмотря на такое, казалось бы, ничтожное содержание альдегидов в культуральной жидкости *Oscillatoria* в момент окончания опыта, мы, так же как и в случае летучих кислот, считаем, что они имеют большое значение для жизни данного растения.

Нам кажется, что наблюдавшаяся нами почти полная стерильность водоросли при культивировании ее на синтетических средах объясняется наличием в растворе именно летучих веществ, представляющих в биологическом отношении безусловно вредные соединения для большинства организмов. Действительно, по нашим наблюдениям⁽³⁾, сопутствующими бактериями у *Oscillatoria* обычно бывают только те, которые имеют хороший защитный покров в виде слизистого чехла, противодействующего проникновению в клетку подобного типа веществ в определенных концентрациях.

Поступило
20 X 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ К. Бернгауэр. Окислительное брожение, Л., 1935. ² С. В. Горюнова, ДАН, 60, № 8 (1948). ³ С. В. Горюнова, Микробиология, 17, в. 5, (1948).
⁴ Н. Я. Демьянов и Н. Д. Прянишников, Общие приемы анализа растительных веществ, 1934. ⁵ А. Р. Кизель, Практикум по биохимии, 1934.