



деленный из культуральной жидкости (КЖ), используется как биологически активное вещество, а биомасса – как основа инсектицидного препарата. Таким образом, два полезных продукта могут быть получены в одном процессе, без загрязнения окружающей среды. Разработаны технология получения БМ в ферментерах и процесс его выделения и очистки из КЖ [5]. Показана биобезопасность БМ и меланиногенных штаммов *B. thuringiensis* для окружающей среды [6].

Целью представленной работы является изучение биостимулирующего действия БМ на некоторые культуры, имеющие важнейшее значение для сельского хозяйства, и инсектицидной активности меланиногенных штаммов.

**Материалы и методы исследований.** В работе использована коллекция музейных культур *B. thuringiensis* Центра депонирования микробов (отделение НПЦ «Армбиотехнология» НАН РА). Мутагенизацию культур для получения меланиногенных штаммов проводили 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином фирмы Aldrich. Chem. Co. (США) по известной методике [7]. Для культивирования штаммов использовали мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар.

Ферментацию проводили в лабораторном ферментере «Анкум-2М» (Россия) с рабочим объемом 7 л при следующих технологических параметрах: pH 8.0-8.5; температура 30-32°C, KLa=180-220 ч-1; продолжительность ферментации 70–72 ч. Использовали среду следующего состава, %: 20 %-ный сернокислотный гидролизат рыбной муки – 12; пептон – 1; MnCl<sub>2</sub> – 0.01; CuSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.005; MnSO<sub>4</sub> – 0.005; ZnSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O – 0.0005. Полученную КЖ центрифугировали, что приводило к отделению биомассы, используемой в качестве инсектицидного препарата. Водорастворимый БМ получали из надосадочной жидкости.

Уровень пигментообразования определяли на спектрофотометре «PerkinElmer 550S UV-VIS» (США) при длине волны  $\lambda = 315$  нм. В качестве контроля использовали водный раствор (pH 9.0) синтетического меланина (Sigma, США). Обработка растений БМ проводилась тремя способами: замачивание семян, полив почвы и сочетание обоих способов. Инсектицидную активность исследуемых штаммов в лабораторных условиях определяли по значениям ЛК50 на тутовом шелкопряде (ТШ) и златогузке [8]. При полевых испытаниях дубовые деревья обрабатывали рабочими суспензиями исходных и мутантных штаммов. Плотность златогузки находилась в пределах экономического порога вредоносности вредителя [9]. Обработку проводили ранцевым опрыскивателем марки «АО-2». Учет вредителей проводили через 3, 7, 10, 12 дней, на 12-погонных метрах в разных местах кроны.

Статистическую обработку полученных данных проводили по определению t-критерия Стьюдента [10]. Статистические параметры (средняя величина, стандартное отклонение), используемые в экспериментах, вычислены также при помощи программы MSExcel.

**Результаты исследований.** С целью получения меланиногенных штаммов, сохраняющих инсектицидную активность, были исследованы 85 штаммов *B. thuringiensis* с разным спектром инсектицидного действия.

Был отобран 21 штамм *B. thuringiensis* по признаку наибольшей эффективности споро-кристаллообразования (количество свободных спор – 80-90 %; количество кристаллов разных размеров – 100 %). Дополнительно была проверена инсектицидная активность этих штаммов на гусеницах ТШ третьего возраста и златогузки III-IV возрастов. Опыты проводили с определением летальной концентрации, вызывающей гибель 50% особей (ЛК50). На основе отобранных штаммов получены пигментообразующие мутанты.

Для определения вирулентности отобранных меланин-синтезирующих мутантов были проведены испытания в полевых условиях (титр суспензии –  $4.0 \cdot 10^8$  спор/мл) на гусеницах златогузки II-III возрастов и непарном шелкопряде I-III возрастов. Вирулентность оценивали по проценту гибели насекомых. По сравнению с исходными штаммами инсектицидная активность меланиногенных мутантов по отношению к златогузке не только не уменьшилась, но и заметно возросла (8-10 %).

Известно, что в полевых условиях под воздействием УФ-облучения и солнечных лучей споры и кристаллы *B. thuringiensis* быстро теряют инсектицидную активность. Меланины являются природными фотопротекторами и защищают споры и кристаллы от УФ-повреждений и отрицательного воздействия солнечных лучей [11]. Следовательно, инсектицидная активность меланиногенных мутантов повышается в результате пролонгирования времени действия. На основе меланиногенных штаммов *B. thuringiensis* получен БМ, обладающий высокой биологической активностью.

Биологическая активность БМ изучена на ряде овощных, кормовых, фруктовых и декоративных растений. Для обработки семян испытуемых растений и последующего полива почвы в отдельности определяли оптимальные концентрации БМ. Результаты проведенных опытов показали, что для каждого вида растения необходимо выбрать оптимальную концентрацию БМ.

Результаты исследований, проведенных на различных овощных, фруктовых и декоративных растениях, показали, что БМ обладает высоким стимулирующим эффектом.

Применение низких концентраций (0.03-0.08%) раствора БМ оказало положительное влияние на биометрические показатели овощных культур – фасоли, нута, перца, картофеля, свеклы, мелкоплодной моркови и др. (рис. 1-3). Наблюдались ускорение всхожести семян, усиление роста стебля и ветвление его основания, ускорение роста, переход к интенсивному и длительному плодообразованию, созреванию крупных, мясистых, со множеством крупных семян плодов, что значительно (на 20-40 %) повышало урожайность растений.

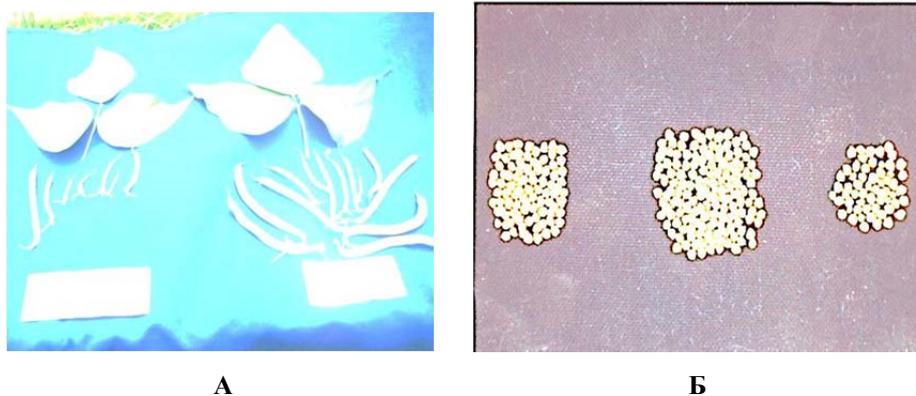


Рис. 1. Влияние БМ на размер листьев и плодов вьющейся фасоли (А) и урожайность нута (Б). А: Cont. – контроль; Vtm – фасоль, обработанная 0.03%-ным раствором БМ. Б: 1 – контроль; 2 – семена нута, обработанные 0.03%-ным раствором БМ; 3 – семена нута, обработанные 0.06%-ным раствором БМ.

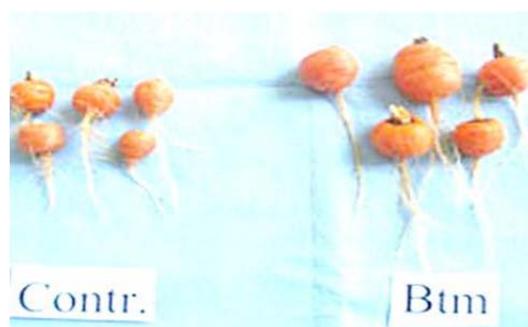


Рис. 2. Влияние БМ на урожайность мелкоплодной моркови: Contr. – контроль; Vtm – морковь, семена которой обработаны 0.03%-ным раствором БМ.

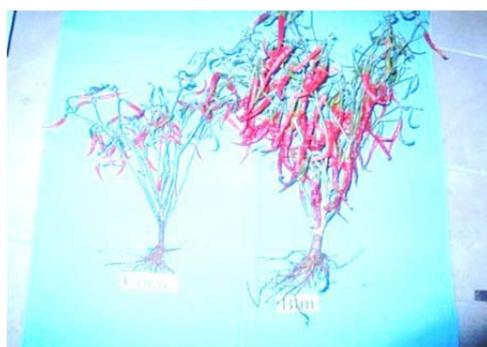


Рис. 3. Влияние БМ на урожайность перца сорта «Кон»: Contr. – контроль; Vtm – перец, семена которого были обработаны 0.03%-ным раствором БМ.

Высокая эффективность БМ наблюдалась на нестратифицированных семенах персика, а также на комнатных цветочных культурах (рэо, камнеломка), на хвойных растениях (ель серебристая), на древесных породах (альбиция).

У обработанных 0.1-0.2%-ным раствором меланина укороченных черенках винограда (16 сортов) через 6-7 месяцев формировалась мощная корневая система, происходила стимуляция роста и вызревание побегов, что гарантирует высокую приживаемость саженцев путем предпосевного замачивания семян (рис. 4).



Рис. 4. Влияние БМ на развитие корневой системы винограда сорта «Меграбуйр»: 1 – контроль; 2 – после обработки черенков 0.2%-ным раствором БМ.

БМ (0.12%-ный) испытан и на кормовых культурах – кукурузе, сорго, подсолнечнике и люцерне, обработка которых проводилась методом предпосевного замачивания семян и полива почвы. У этих культур разрастание корневой системы обеспечило растение водой и минеральными элементами, интенсивный рост стебля в высоту и толщину, а также формирование более длинных и широких листьев темно-зеленого цвета. У всех этих культур меланин способствовал дружному и массовому прорастанию семян, усиленному росту сеянцев, увеличению числа листьев (на 56-62%), разрастанию листовых пластинок (на 65-72%), утолщению стебля, т.е. повышалась масса надземной части (на 30-37%).

БМ также повышает устойчивость растений к абиотическим факторам окружающей среды.

Таким образом, результаты исследований, проведенных на различных растениях, показали, что БМ обладает биостимулирующим эффектом.

**Заключение.** Применение экологически безопасного водорастворимого БМ в различных отраслях растениеводства в значительной мере сократит применение минеральных и особенно азотсодержащих удобрений, использование которых может привести к накоплению нитратов в растительной пище и загрязнению окружающей среды. БМ превосходит другие применяемые стимуляторы роста по ряду свойств: он растворим в воде, быстро разлагается в почве, эффективен в низких концентрациях и имеет низкую стоимость.

Высокая инсектицидная активность полученных меланиногенных штаммов *B. thuringiensis* позволит использовать их для борьбы с сельскохозяйственными вредителями.

Одновременный синтез двух биологически активных веществ – меланина и инсектицидных токсинов в одном штамме обеспечит рентабельность их производства. Экологическая безопасность и доступная цена этих препаратов расширяют возможности его применения в сельском хозяйстве.

НПЦ «Армбиотехнология» ГНКО НАН РА  
e-mail: anichka\_h@mail.ru

**С. В. Аветисян, М. Г. Паронян, С. С. Оганнесян, А. С. Овсепян**

### **Меланиногенные штаммы *Bacillus thuringiensis*: перспективы применения**

На основе инсектицидных штаммов *Bacillus thuringiensis* получена большая коллекция высокоактивных меланин-синтезирующих мутантов, сохранивших инсектицидную активность. Полученный бактериальный меланин обладает высокой биологической активностью. Испытания на различных растениях *in vivo* и *in vitro* показали, что бактериальный меланин является сильным стимулятором роста и развития растений. Инсектицидная активность полученных меланиногенных мутантов *B. thuringiensis* по отношению к вредителям по сравнению с родительскими штаммами заметно возросла благодаря фотозащитной активности синтезируемого меланина. Одновременный синтез двух биологически активных веществ – меланина и инсектицидных токсинов в одном штамме обеспечит рентабельность их производства.

**Մ. Ռ. Ավետիսյան, Մ. Հ. Պարոնյան, Ս. Ս. Հովհաննեսյան, Ա. Ս. Հովսեփյան**

### ***Bacillus thuringiensis*-ի մելանինոգեն շտամերը. դրանց կիրառման հեռանկարները**

*Bacillus thuringiensis* միջատասպան շտամերի հիման վրա ստացվել է ջրալույծ մելանին սինթեզող բարձրակտիվ մուտանտների մեծ հավաքածու, որոնք պահպանել են միջատասպան ակտիվությունը: Ստացված մանրէային մելանինն օժտված է բարձր կենսաբանական ակտիվությամբ: Տարբեր բույսերի վրա *in vivo* և *in vitro* կատարված փորձարկումները ցույց են տվել, որ մանրէային մելանինը համարվում է բույսերի աճի և զարգացման ուժեղ խթանիչ: Շնորհիվ սինթեզված մելանինի լուսապաշտպանիչ հատկության *B. thuringiensis*-ի մելանինոգեն մուտանտների միջատասպան ակտիվությունը վնասատուների նկատմամբ, համեմատած ծնողական շտամերի հետ, զգալիորեն բարձրացել է: Երկու կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի՝ մելանինի և միջատասպան տոքսինների միաժամանակյա սինթեզը մեկ արտադրական պրոցեսում ապահովում է դրանց արտադրության շահութաբերությունը:

S. V. Avetisyan, M. H. Paronyan, S. S. Hovhannesyan, A. S. Hovsepyan

**Melaninogenic Strains of *Bacillus thuringiensis*:  
Prospects for Their Use**

Based on the insecticidal strains of *Bacillus thuringiensis*, a large collection of highly active melanin-synthesizing mutants that retained their insecticidal activity was obtained. The resulting bacterial melanin had high biological activity. Tests performed on various plants in vivo and in vitro have shown that bacterial melanin is a powerful stimulator of plant growth and development. The insecticidal activity of the obtained melaninogenic mutants of *B. thuringiensis* in relation to the pests compared to the parental strains significantly increased due to the photoprotective activity of the synthesized melanin. The simultaneous synthesis of two biologically active substances – melanin and insecticidal toxins - in one strain will ensure the profitability of their production.

**Литература**

1. Барабой В. А. – Усп. совр. биол. 2001. Т. 121. № 1. С. 1–12.
2. Борщевская М.И., Васильева С. М. – Вопр. мед. химии. 1999. № 1. С. 1–11.
3. Макордей Ф. В., Венгер Л. А., Слюсаренко Л. И. и др. – Изв. высш. уч. заведений. Серия: Химия и химическая технология. 1994. № 4–6. С. 3–10.
4. Овсепян А., Агаджанян А., Карабеков Б. и др. Патент РА № 1385 А2, 2003.
5. Aghajanyan A. E., Vardanyan A. A., Hovsepyan A. S. et al.– BioTechnologia. 2017. V. 98(4). P. 315–322.
6. Аветисян С. В. – Вестник МАНЭБ. 2009. Т. 14. № 4, вып. 1. С. 162–164.
7. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. Пер. с англ. Ю.Н. Зографа и др. М. Мир. 1976. 436 с.
8. Чил-Акопян Л. А., Хлистовский Е. Д., Адамян М. О. и др.– Биолог. журн. Армении. 1996. Т. 49. № 1–2. С. 57–61.
9. Рогачева А. Я. Экономические пороги вредоносности главнейших вредных видов насекомых и клещей. М. Агропромиздат. 1986. С. 6.
10. Иванов Ю. И., Погорелюк О. Н. Обработка результатов медико-биологических исследований. М. Медицина. 1990. 224 с.
11. Sansinenea E., Ortiz A.– Biotechnology Letter. 2015.V. 37(3). P. 483-90.