

EFFECT OF HERBICIDES ON WEEDS AND SOIL MICROFLORA OF VINEYARDS

E. A. HAKOBIAN, R. G. SARKSIAN, A. A. KALANTAROV, M. A. SEVUMIAN

The effect of successive application of simazine before sprouting and dalapone to vegetating weeds on the microbiological activity of soil and on the change of weeds quantity has been studied. After three years' application the vineyard becomes practically free of weeds. Simazine and dalapone do not depress the activity of soil microorganisms.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Արարատյան Ս. Գ., Աղաջանյան Գ. և Հաշմատյանի մոլիբդենի փոփոխությունը և ցածրարժեք նրա դերը 1 երկան, 1957:
2. Акопян Э. А., Дарбинян Г. А., Амирян М. Е., Калантаров А. А., Апибян Г. Изв. с.-х. наук МСХ АрмССР, 5, 1969.
3. Акопян Э. А., Калантаров А. А., Севумян М. А., Григорян Ж. А. Изв. с.-х. наук МСХ АрмССР, 9, 1975.
4. Акопян Э. А., Калантаров А. А. Изв. с.-х. наук МСХ АрмССР, 4, 1976.
5. Акопян Э. А., Калантаров А. А., Севумян М. А. Тез. докл. сообщ. Всесоюз. конф., М., 1976.
6. Акопян Э. А. Сб. науч. тр. Арм. НИИ ВВиП, 15, 1979.
7. Аринушкина Е. В. Руководство по химическому анализу почв, 487, М., 1970.
8. Звягинцев Д. Г., Асеева И. В., Бабьева И. Г., Мирчинк Т. Г. Методы почвенной микробиологии и биохимии, 223. М., 1980.
9. Калантаров А. А., Акопян Э. А. Защита растений, 1, 1978.
10. Тарлапан М. И., Портной М. М. Инф. листок. М., 1980.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVII, № 9, 1984

УДК 577,122,582:579,253,4:579,222,3

ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ DL- α -АМИНОМАСЛЯНАЯ КИСЛОТА-УСТОЙЧИВЫХ МУТАНТОВ SERRATIA MARCESCENS

А. О. АРМАНДЖЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

У *Serratia marcescens* ATCC 9986 выделены индуцированные УФ-лучами мутанты, устойчивые к аналогу валина DL- α -аминомасляной кислоте. Среди встречающихся с частотой 10^{-7} мутантов отобраны культуры—потенциальные продуценты I-валина. Около 15% аминокислотная кислота-резистентных (АМК-Р) мутантов продуцировали более 10 г/л валина, что в 4—5 раз выше уровня активности родительского штамма.

Ключевые слова: *Serratia marcescens* аналогрезистентные мутанты, УФ лучи, валин.

Одним из наиболее эффективных путей интенсификации производства аминокислот является использование в промышленности продуктивных штаммов микроорганизмов [1, 3, 12]. Поиски новых продуцентов ведутся главным образом в двух направлениях; с одной стороны, вовлекаются в селекционную практику новые микроорганизмы, с дру-

той—разрабатываются новые методы ведения селекции. Одним из наиболее результативных методов является отбор культур среди аналогрезистентных мутантов [6, 9, 15, 16]. В основе применения аналогов в селекции микроорганизмов лежит их способность блокировать различные этапы синтеза или утилизации метаболитов.

При изучении образования *l*-изолейцина из *D*-треонина у *S. marcescens* было обнаружено, что добавление *l*-валина и *l*-лейцина приводит к сильному подавлению накопления *l*-изолейцина с образованием в культуральной жидкости α -аминомасляной кислоты (АМК). На основании этих результатов в ряде лабораторий были начаты работы с целью получения при помощи аналогов дерепрессированных или нечувствительных к ингибированию мутантов, накапливающих в культуральной жидкости аминокислоты с разветвленной цепью (валин, лейцин, изолейцин). Впервые устойчивые к α -аминомасляной кислоте мутанты были получены у *E. coli* [13], а позже у штамма *S. marcescens* [11]. Среди аналогрезистентных мутантов только культуры, устойчивые к α -аминомасляной кислоте (АМК-Р мутанты), синтезировали свыше 8 г/л *l*-валина, при этом биосинтетическая активность, коррелировала со степенью устойчивости к аналогу [11].

Исходя из положительных результатов этих работ, мы поставили перед собой задачу получить серию аналогустойчивых мутантов у *S. marcescens* и изучить их с целью отбора культур, продуцирующих аминокислоты с разветвленной цепью.

Материал и методика. В качестве исходного штамма использовали *S. marcescens* ATCC 9986, дикий штамм, способный продуцировать до 1 г/л *l*-валина. Для выращивания бактерий использовали мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА) и минимальную среду Девиса [7], а в качестве ферментационной среды—модифицированную среду Кисуми и соавторов [12]. Значение pH всех сред 7,0—7,3. Аналогом служила DL- α -аминомасляная кислота, водный раствор которой готовили перед употреблением. В качестве мутагена были использованы ультрафиолетовые лучи.

Для определения ингибирующей дозы DL- α -аминомасляной кислоты был проверен рост исходного штамма на синтетической агаризованной среде Девиса, содержащей различные концентрации аналога. Концентрация аналога, при использовании которой не отмечалось роста культуры после пяти дней инкубации, считалась ингибирующей. АМК-Р мутанты получали с помощью УФ-индуцированного мутагенеза: культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста (титр $1-2 \times 10^8$ кл/мл), дважды центрифугировали в фосфатном буфере (pH—6,8). Суспензию разливали в чашки Петри (диаметр 5 см) по 2 мл и подвергали облучению при постоянном перемешивании. После облучения бактериальную суспензию по 0,2 мл высевали на минимальную агаризованную среду, содержащую ингибирующие концентрации DL- α -аминомасляной кислоты, и инкубировали в течение пяти суток при 37°. Выросшие колонии отбирали путем многократных пересевов и проверяли на устойчивость к аналогу.

Способность полученных мутантов продуцировать аминокислоту определяли ферментацией в колбах. Посевной материал выращивали на скошенном агаре в течение 20—24 ч при 30°. Ферментацию проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл при объеме ферментационной жидкости 10 мл. Аэрацию обеспечивали качанием колб на поступательных качалках с частотой 180 колебаний в минуту при 30°. Продолжительность ферментации—72 ч. Количественное определение амплотокислот в культуральной жидкости (КЖ) проводили методом хроматографии на бумаге в системе *N*-бутанол—уксусная кислота—вода в соотношении 4:1:5. В качестве проявителя использовали нингидрин. Пятна элюировали в системе этанол—вода—хлористый кадмий. Ко-

личество аминокислот определяли колориметрически при длине волны 540 нм по предварительно построенным калибровочным кривым [2, 5].

Результаты и обсуждение. Чувствительность исходной культуры к аналогу аминокислоты определялась путем выяснения максимальной концентрации DL- α -аминомасляной кислоты, при которой подавляется рост культуры (табл. 1).

Таблица 1

Ингибирование роста штамма *S. marcescens* ATCC 9986 DL- α -аминомасляной кислотой

Температура инкубирования	Рост культуры при концентрациях аналога, мг/мл						
	0	0,05	1	3	5	7	10
30°	3	3	3	3	3	3	3
37°	3	3	3	3	2	1	0

Обозначения: 3—нормальный рост, 2—ослабленный рост, 1—слабый рост, 0—отсутствие роста.

Как видно из данных, представленных в табл. 1, уровень устойчивости культуры к аналогу зависит от температуры инкубации. Так, если при 30° культура нормально растет на средах даже с 10 мг/мл DL- α -аминомасляной кислоты, то при 37° концентрация 5 мг/мл начинает тормозить, а 10 мг/мл полностью подавляет рост. Исходя из этого, отбор АМК-Р мутантов производился при температуре 37° при наличии в среде 10 мг/мл аналога.

Для подбора условий мутагенной обработки культуру облучали различными дозами УФ лучей. На рис. 1 представлена кривая инактив-

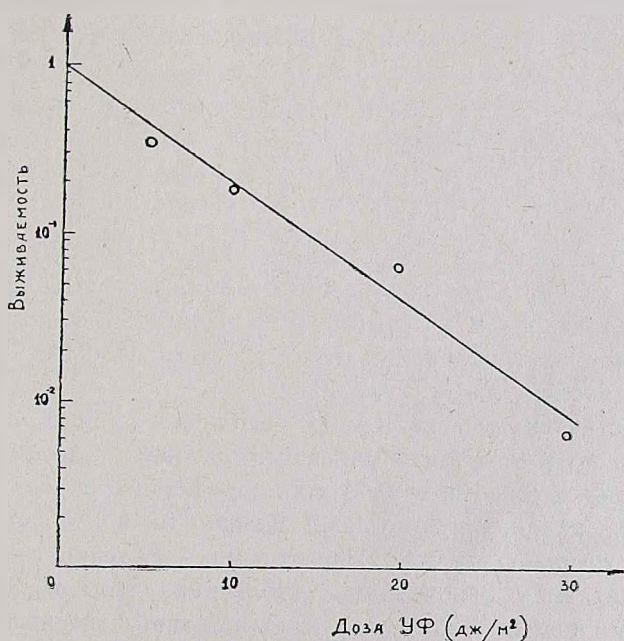


Рис. Кривая выживаемости штамма *S. marcescens* ATCC 9986 после УФ облучения.

вации *S. marcescens* под действием УФ лучей. Характер инактивации культуры типичен для большинства бактерий. Исходя из этого, была выбрана доза 20 Дж/М², обеспечивающая 10% выживаемости культур. Для отбора АМК-Р мутантов облученную в этой дозе суспензию клеток *S. marcescens* инкубировали в течение пяти суток на среде, содержащей 10 мг/мл аналога. Как видно из табл. 2, в пяти независимых опытах было выделено 400 аналогустойчивых мутантов, которые встречались с частотой 10⁻⁷.

Таблица 2

Частота встречаемости УФ-индуцированных АМК-Р мутантов у штамма *S. marcescens*

Серия опытов	Проверено бактериальных клеток, $\times 10^8$	Обнаружено АМК-Р мутантов	Частота встречаемости мутантов, $\times 10^{-7}$
1-ая серия	1,4	10	0,7
2 "	5,0	53	1,1
3 "	4,4	75	1,7
4 "	6,4	170	2,6
5 "	5,6	92	1,6
Всего	22,8	400	1,8

Путем ферментации в колбах у 190 АМК-Р мутантов была определена способность к продуцированию аминокислот. Во всех случаях устойчивость к аналогу приводила к повышенному выходу валина по сравнению с диким штаммом. Все проверенные мутанты по уровню активности были подразделены на 3 класса (табл. 3).

Таблица 3

Валинпродуцирующая активность АМК-Р мутантов *S. marcescens*

Класс мутантов	Количество мутантов	Доля мутантов, %	Накопление l-валина в КЖ, г/л
Высокоактивные	28	15	более 10,0
Активные	126	66	от 4,0 до 10,0
Малоактивные	36	19	от 2,0 до 4,0

Из приведенных в табл. 3 данных видно, что АМК-Р мутанты продуцируют значительное количество l-валина, при этом 15% этих мутантов накапливают в КЖ свыше 10 г/л валина. В качестве сопутствующих аминокислот обнаруживаются следовые количества глутаминовой кислоты, изолейцина и лейцина.

Представленные в настоящем сообщении данные свидетельствуют о том, что АМК-Р мутанты могут быть активными продуцентами l-валина. В настоящее время трудно дать однозначное объяснение механизму повышения валинпродуцирующей активности описанных мутантов. Тем не менее, тот факт, что добавление l-валина и l-лейцина приводит к сильному подавлению накопления l-изолейцина дало основание Кисуми с соавторами предположить, что использованные аминокислоты вызыва-

ют репрессию синтеза или ингибирование активности по механизму обратной связи бифункционального фермента синтетазы ацетогидроксикислоты (АГК, рН—8,0), участвующей в биосинтезе обеих аминокислот [10]. Специальная проверка, действительно, выявила у некоторых АМК-Р мутантов более чем 20-кратное увеличение АГК-синтетазной активности [11]. Вместе с тем у некоторых мутантов была обнаружена пониженная чувствительность АГК-синтетазы к ингибированию l-валином. Такие мутанты были наиболее активными и накапливали в ферментационной среде более 8 г/л валина [11].

По-видимому, АМК-Р мутации обуславливают дерепрессию синтеза АГК-синтетазы, с одновременным снижением ее чувствительности к ингибированию l-валином. Однако изучение АМК-Р и валинрезистентных (ВАЛ-Р) мутантов у *E. coli* показало, что у первых дерепрессирован синтез АГК-синтетазы, а у ВАЛ-Р мутантов отмечается координированная дерепрессия трех ферментов, участвующих в образовании аминокислот с разветвленной цепью биосинтеза (l-треонин дегидрогеназы, дигидроксиацил дегидрогеназы и трансаминазы В). Генетический анализ показал, что биосинтез АГК-синтетазы контролируется оператором В, а трех других ферментов—оператором А [14]. Между тем у АМК-Р мутантов *S. marcescens* отмечается параллельное увеличение количества АГК-синтетазы и l-треонин дегидратазы. Более того, не исключено, что у некоторых АМК-Р мутантов происходит изменение регуляторного гена, контролирующего синтез всех ферментов, участвующих в образовании аминокислот с разветвленной цепью [11]. Если еще учесть, что дерепрессия синтеза ферментов у АМК-Р мутантов может быть обусловлена изменением структуры валил-тРНК синтетазы [8], то станет очевидным, что только дополнительные данные позволят установить, какой из трех возможных механизмов (изменения операторных, регуляторных и валил-тРНК-синтетазных локусов) обуславливает сверхсинтез валина АМК-Р мутантами.

Так или иначе на основании приведенных в настоящем сообщении данных можно заключить, что мутации резистентности к DL- α -аминомасляной кислоте, как правило, приводят к повышению продуцирования l-валина у *S. marcescens* и что получение АМК-Р мутантов является эффективным способом отбора активных штаммов-продуцентов валина у этой культуры. Нельзя исключить, что обнаруженный градиент активности мутантов является отражением каждого из трех механизмов резистентности или их комбинацией.

Наиболее активные АМК-Р мутанты отобраны для дальнейшей работы в качестве перспективных продуцентов l-валина.

Научно-исследовательский технологический институт
аминокислот Главмикробиопрома СССР,
Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 5.XII 1983 г.

DL- α -ԱՄԻՆՈԿԱՐԱԳԱԹԹՎԻ ՆԿԱՏՄԱՄԲ ԿԱՅՈՒՆ ՄՈՒՏԱՆՏՆԵՐԻ
SERRATIA MARCESCENS -ի ՄՈՏ ՍՏԱՅՈՒՄԸ ԵՎ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒՄԸ

Ա. Օ. ՀԱՐՄԱՆՅԱՆ, Մ. Գ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

S. marcescens-ի մոտ ստացված են ՈՒՄ-ճառագայթներով մակածված վալինի անալոգ՝ DL- α -ամինոկարագաթթվի նկատմամբ կայուն մուտանտներ:

10^{-7} հաճախականությամբ հանդիպող մուտանտներին ընտրվել են 1-վալինի սինթեզող հեռանկարային կուլտուրաներ: Ամինոկարագաթթվի նկատմամբ կայուն մուտանտների մոտ 15%-ը սինթեզում են ալվելի քան 10 գրամ վալին կուլտուրալ հեղուկի 1 լիտրում, որը 4—5 անգամ գերազանցում է ծնողական շտամի ակտիվության մակարդակը:

ISOLATION AND INVESTIGATION OF THE DL- α -AMINO BUTIRIC ACID-RESISTANT MUTANTS OF *SERRATIA MARCESCENS*

A. O. ARMANDJIAN, M. G. OGANESSIAN

Valine analogue-DL- α -aminobutyric acid-resistant mutants of *Serratia marcescens* induced by UV-irradiation were isolated. Among the producents of 1-valine were chosen. About 15 per cent of aminobutyric acid-resistant mutants produced valine more than 10 grams, per litre, which is 4—5 times higher than the level of parent strain activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Зайцева З. М. Сб.: Успехи микробиологии, 11, 152—174, М., 1976.
2. Кара-Мурза С. Н., Тимохина Е. А., Жданова Н. И. Прикладная биохимия и микробиология, 17, 6, 813—819, 1981.
3. Рубан Е. Л., Вербина Н. И., Бутенко С. А., Озолин Р. К., Зарин Д. Г. Биосинтез аминокислот микроорганизмами, М., 1968.
4. Степанов А. И. Цитология и генетика, 4, 9, 365—371, 1975.
5. Хейс И. М., Мацек К. Хроматография на бумаге, М., 1962.
6. Alexander R. R., Calvo J. M., Freundlich M. J. Bacteriol, 105, 313—321, 1971.
7. Davis B. D., Mingiot E. S. I. Bacteriol, 60, 17—18, 1950.
8. Freundlich M. and Clarke L. P. Biochem. Biophys. Acta, 170, 271—281, 1968.
9. Jzumi Y., Asano J., Tan Y., Ogata K. Ferment Technol., 55, 5, 452—458, 1977.
10. Kisumi M. J, Biochem, 52, 390—399, 1962.
11. Kisumi M., Komatsubara S., Chibata J. J. Bacteriol, 106, 493—499, 1971.
12. Kisumi M., Kato J., Komatsubara S., Chibata J. Genetics of industrial microorganisms, Academia, Prague, 267—287, 1973.
13. Ramakrishnan T. and Adelberg E. A. J. Bacteriol, 89, 651—550, 1955.
14. Ramakrishnan T. and Adelberg E. A. J. Bacteriol, 87, 566—573, 1974.
15. Sano K., Shiio J. J. Gen. Appl. microb, 16, 373—380, 1970.
16. Tosa T., Pizer L. J. J, Bacteriol, 105, 3, 966—971, 1971.