

ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF ARMENIA

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

2008

Լույս է տեսնում 1948 թվականից, հոդվածները հրատարակվում են հայերեն,
ռուսերեն կամ անգլերեն լեզուներով
Выходит с 1948 года, статьи публикуются на армянском, русском
или английском языках
Journal is published since 1948, the articles are published in Armenian,
Russian or English

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԿՈԼԵԳԻԱ

Է.Ս.Գևորգյան (*գլխավոր խմբագիր*), Ռ.Մ.Հարությունյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*), Ա.Ս. Բոյաճյան (*գլխավոր խմբագրի տեղակալ*),
Ա.Հ. Եսայան (*պատասխանատու քարտուղար*), Գ.Ա. Գևորգյան, Ա.Հ. Թոշունյան,
Ռ.Հ. Հովհաննիսյան, Լ.Ռ. Մանվելյան, Ս.Խ. Մայրապետյան, Ժ.Հ. Վարդանյան.

ԽՄԲԱԳՐԱԿԱՆ ԽՈՐՀՆՈՒՐԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Ծ.Մ. Ավագյան, Է.Գ. Աֆրիկյան, Է.Ց. Գաբրիելյան,
Ա.Ա. Գալոյան, Ս.Ա. Դավթյան, Ժ.Ի. Հակոբյան, Վ.Պ. Հակոբյան, Կ.Գ. Ղարաբյոկյան,
Ս.Հ. Մովսիսյան, Կ.Ս. Պողոսյան, Գ.Հ. Փանոսյան, Լ.Լ. Օսիպյան.

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Յ.Ս. Գևորգյան (*главный редактор*), Ր.Մ. Արությունյան (*заместитель главного редактора*), Ա.Ս. Բояджян (*заместитель главного редактора*),
Ա.Գ. Եсаян (*ответственный секретарь*), Զ.Ա. Варданян, Գ.Ա. Գеворкян,
Տ.Խ. Майрапетян, Л.Р. Манвелян, Р.О. Оганесян, А.А. Трчунян

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

Ս.Մ. Ավակյան, Վ.Ս. Ակոպյան, Զ.Ի. Ակոպյան, Յ.Տ. Ալեքսանյան, Յ.Գ. Աֆրիկյան,
Յ.Ս. Գաբրիելյան, Ա.Ա. Գալոյան, Մ.Ա. Դավթյան, Կ.Գ. Կարաբեյան, Ս.Օ. Մովսեսյան,
Լ.Լ. Օսիպյան, Գ.Ա. Փանոսյան, Կ.Ս. Սոփոսյան.

THE EDITORIAL BOARD

Editor in chief: E.S. Gevorgyan, *Vice-editors:* R.M. Aroutiunian, A.S. Boyadjyan,
Secretary-in-charge: A.H. Yesayan, *Members of the Board:* G.A. Gevorgyan,
R.H. Hovanesyan, L.R. Manvelyan, S.Kh. Mayrapetyan, A.H. Trchunyan,
Zh.H. Vardanyan.

THE EDITORIAL COUNCIL

E.G. Afrikyan, Yu.T. Aleksanyan, Ts.M. Avakyan, M.A. Davtyan, E.Ts. Gabrielyan,
A.A. Galoyan, V.P. Hakobyan, Zh.I. Hakobyan, K.G. Karagiozyan, S.H. Movsesyan,
L.L. Osipyanyan, G.H. Panosyan, K.S. Poghosyan.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Փորձարարական և տեսական հոդվածներ

Անտոնյան Մ.Վ., Հարությունյան Ռ.Ա., Նահապետյան Խ.Օ., Մարտիրոսյան Ս.Շ. <i>Brionia alba</i> L. սպիտակ լոշտակի ազդեցությունը առնետների ջերմակարգավորման վրա ստրեսային իրավիճակներում.....	8
Կարապետյան Ս.Գ. Արյան շրջանառության մոդելավորման մոտեցումները օրգանիզմում.....	13
Պարոնյան Ա.Խ., Մարկոսյան Լ.Ս. B խմբի վիտամինների ազդեցությունը <i>Rhodobacter sphaeroides</i> ֆոտոսինթետիկ բակտերիայի կարոտինոիդների պարունակության վրա	22
Համբարյան Պ.Պ., Մուսայելյան Մ.Ս., Մելիքյան Ե.Ա. <i>Hypericum</i> L. ցեղի պաշարների որոշումը Հայաստանում.....	28
Մելիքյան Գ. Ա. Արարատյան դաշտավայրի ձկնաբուծական լճակներում փոքր ջրցուլի բնադրման կենսաբանությունը.....	34
Աղաջանյան Ա.Խ., Չուբարյան Ս.Վ., Թումանյան Լ.Ռ., Աղաջանյան Ա.Ա., Մարտիրոսյան Մ.Ս., Արշակյան Մ.Մ. Ֆորենի ծիլերի հոմոգենատի դիալիզատի բաղադրամասը և դրանց ազդեցությունը <i>Candida guilliermondii</i> HPI-4 խմորասնկերի աճի վրա.....	45
Սահակյան Գ.Վ., Արծրունի Գ.Գ., Բատիկյան Տ.Բ. Առնետների սպերմատոգոնիդների ֆունկցիոնալ ակտիվության փոփոխությունը էլեկտրաստատիկ դաշտերի ազդեցությունից հետո	49
Մնացականյան Մ.Ս. 1,3-Դիբլորբուլեն-2-ի թունաբանական բնութագրությունը կառուցվածք կենսաբանական ակտիվություն տեսության լույսի ներքո	54
Սահակյան Ն.Շ., Պետրոսյան Մ.Թ., Աղաջանյան Ջ.Ա. Ժնկյան Ճանկխտի (<i>Ajuga genevensis</i> L.) մեկուսացված կուլտուրայի հակաբակտերիալ ակտիվությունը	60
Պիպոյան Ս.Խ. Հայկական արագաշարժի <i>Alburnoides Bipunctatus Armeniensis</i> Dadikyan 1972 (<i>Cyprinidae, Pisces</i>), կարգաբանական դիրքի մասին	66
Սահակյան Մ.Ա. Թռչունների կոլիբակտերիոզի հարուցիչի շիջուկաբանական տիպավորումը	72
Սովսիսյան Գ.Գ., Դավթյան Վ.Ա., Խուրշուդյան Ա.Պ. Հիբրիդային արագած բարդինների արտադրողականությունը և նրանց տերևների ֆիզիոլոգիական ակտիվությունը Հայաստանի պայմաններում՝ Երևան	76
Ղազարյան Վ.Վ., Դավթյան Վ.Ա., Ամիրբեկյան Ա.Հ. Սևանի ավազանի մնացորդային անտառների ծառատեսակների արմատների նյութափոխանակության մասին.....	82
Վարդանյան Ա.Հ., Տիրունի Ֆ.Ն., Բալաբեկյան Մ.Ռ., Աղաջանյան Ա.Ե., Սազիյան Ա.Ս. Տարբեր տիպի փրփրամարիչների արդյունավետության ուսումնասիրությունը և գնահատականը L-օրնիթինի կենսասինթեզի պրոցեսում.....	86
Վարդանյան Ա.Հ., Տիրունի Ֆ.Ն., Բալաբեկյան Մ.Ռ., Աղաջանյան Ա.Ե. Տեխնոլոգիական ցուցանիշների ազդեցությունը L-օրնիթինի կենսասինթեզի վրա.....	92
Դանիելյան Ա.Ա., Դավթյան Մ.Ռ., Գրիգորյան Կ.Վ., Ղուկասյան Է.Խ. Հատակային ֆաունայի զարգացման դինամիկան Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանի տարածքում.....	99
Չախալյան Ա.Խ., Քելեշյան Ս.Ղ., Կարապետյան Ժ.Վ., Քոլոյան Հ.Օ., Դավթյան Ա.Գ., Ավետիսով Գ.Ե. Թեստ-կուլտուրաների օգտագործումը մանրէաբանական եղանակով ամինաթթուների որոշման համար.....	103

Հովսեփյան Լ.Մ., Լվով Մ.Վ., Ջաքարյան Գ.Վ., Աղանյանց Մ.Ա., Մարտիրոսյան Ե.Ա., Ղազարյան Գ. Ս. Չեզոք և թթու գլիկոլիպիդների քանակական տեղաշարժերի առանձնահատկությունները սրտամկանում փորձարարական ինֆարկտի ժամանակ.....	109
Վասիլյան Դ.Զ. Նոր բրածո ձկնետեսակ <i>Leuciscus (Telestes) cf. souffia</i> Risso, 1826 Արարատյան սանարդի պլեյստոցենյան նստվածքներից	113
Ռևազյան Ռ.Հ., Սաքոյան Ա.Ս., Սաֆրազբեկյան Ե.Ա. Խոտային ցենոզներում կենսաձին տարրերի միգրացիայի ինտենսիվությունը ըստ լեռնային համակարգերի բարձրադիր գոտիականության.....	118
Նահապետյան Խ.Հ., Բաբախանյան Մ.Ա., Մատինյան Լ.Ա., Գրիգորյան Շ.Վ., Նիկողոսյան Թ.Գ., Հարությունյան Ա.Զ., Նուրբեկյան Լ.Վ. Կիտրոնային ռեհանի (<i>Ocimum</i>) ազդեցությունը առնետների սիրտ-անոթային համակարգի վրա նորմայում և ստրեսային իրավիճակներում.....	125
Հովհաննիսյան Հ. Ա., Մկրտումյան Մ. Կ., Եսայան Ա.Հ. <i>Nerium oleander</i> կալուսային հյուսվածքի բջջազենետիկ նկարագրությունը	130
Հովհաննիսյան Հ. Ա., Մկրտումյան Մ.Կ., Եսայան Ա.Հ. <i>Nerium oleander</i> կալուսային հյուսվածքի պոլիսախարիդային ֆրակիայի ակտիվությունը.....	135
Ռամբանյան Մ.Ռ., Պոպով Յու., Խավազի Կ. Իրանի հյուսիսում բրնձի դաշտերում ֆլուրենցենտ պսևդոմոնադների տեսակների անջատումն ու բնութագրումը	141
Դանիելյան Ֆ.Դ., Առաքելյան Մ. Ս, Ստեփանյան Ի. <i>Darevskia</i> ցեղին պատկանող ժայռային մողեսների հիբրիդների միկրոէվոլյուցիոն գործընթաց.....	147
Ղուկասյան Լ.Է. Տարբերակված ուսուցմամբ աշակերտների հեմոդինամիկայի ցուցանիշների փոփոխությունները քննական սթրեսի պայմաններում	157
Հարությունյան Ս.Գ., Սարգսյան Շ.Ա., Անտոնյան Ա.Պ., Վարդևանյան Պ.Հ. ԴԼԹ-ում կեղծ-օդակաձև կառուցվածքների առաջացումը կովալենտ կապվող լիզանդների հետ կոմպլեքսագոյացման ժամանակ	162
Բազուկյան Ի.Լ., Համբարձումյան Ա.Ա., Անդրեասյան Ս.Ա., Պոպով Յու.Գ. <i>R. aurantiaca</i> KM-1-ից անջատված ֆենիլալանին - ամինոնիակ-լիազի կիրառմամբ արյան մեջ L-ֆենիլալանինի և L-թիրոզինի խտությունների միաժամանակյա չափման մեթոդ.....	167
Առաքելյան Վ.Բ., Հարությունյան Ս.Գ., Սարգսյան Շ.Ա., Վարդևանյան Պ.Հ. <i>cis</i> -DDP-ի փոքր կոնցենտրացիաների ազդեցությունը ԴԼԹ-ի հետ լիզանդների ադառքման վրա.....	175
Առաքելյան Մ.Ս., Դանիելյան Ֆ.Դ., Գազալեյ Ն. Արաքս գետի հովտում ճահճային կրիայի (<i>Emys orbicularis</i>) ձևաբանական հատկանիշների և կենդանաաշխարհագրական վերլուծություն	183
Համառոտ հաղորդումներ	
Նիկողոսյան Վ. Գ. Դիագնոստիկների և նրանց համակցությունների պեկտինի յուրացման ու ֆիքսման ակտիվության մասին	188
<i>Գանոններ հեղինակների համար</i>	

Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

СОДЕРЖАНИЕ

Экспериментальные и теоретические статьи

Антонян М.В., Арутюнян Р.А., Нагапетян Х.О., Мартиросян С.Ш.
Влияние переступня белого *Brionia Alba* L. на регуляцию

температурного гомеостаза крыс при стрессе.....	8
Карпетян С. Г. Подходы к моделированию кровообращения в организме.....	13
Паронян А.Х., Маркосян Л.С. Влияние витаминов группы b на содержание каротиноидов фотосинтезирующей бактерии <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	22
Гамбарян. П.П., Мусаелян М.С., Меликян Е.А. Определение запасов сырья рода <i>Hypericum</i> L. в Армении.....	28
Меликян К.А. Биология гнездования малой выпи <i>Ixobrychus minutus</i> (L.) в рыбоводных прудах Араратской равнины.....	34
Агаджанян А.Х., Чубарян С.В., Туманян Л.Р., Агаджанян А.А., Мартirosян М.С., Ариакян М.М. Состав диализатов гомогената проростков пшеницы и их влияние на рост дрожжей <i>Candida guilliermondii</i> НП-4.....	45
Саакян Г.В., Арируни Г.Г., Батикян Т.Б. Изменение функциональной активности эпидидимальной спермы крыс после действия электростатических полей.....	49
Мнацаканян М.С. Токсикологическая характеристика 1,3-дихлорбутена-2 в свете теории структура-биологическая активность.....	54
Саакян Н.Ж., Петросян М.Т., Агаджанян Дж.А. Антибактериальная активность изолированной культуры живучки женеvской (<i>Ajuga genevensis</i> L.)	60
Пипоян С. Х. О таксономическом положении армянской быстрянки <i>Alburnoides bipunctatus armeniensis</i> Dadikyan, 1972 (Cyprinidae, Pisces)	66
Саакян М. А. Серотипизация возбудителя колибактериоза птиц.....	72
Мовсесян Г. Г., Давтян В. А., Хуришудян А. П. Физиологическая активность листьев и продуктивность быстрорастущих гибридных тополей в условиях Армении: Ереван.....	76
Казарян В.В., Давтян В.А., Амцрбекян А.Н. О метаболизме корней древесных остаточных лесов Севанского бассейна.....	82
Варданян А.А., Тхруни Ф.Н., Балабекян Ц.Р., Агаджанян А.Е., Сагиян А.С. Изучение и оценка эффективности различных пеногасителей на биосинтез L – орнитина.....	86
Варданян А.А., Тхруни Ф.Н., Балабекян Ц.Р., Агаджанян А.Е. Влияние технологических параметров на синтез L–орнитина.....	92
Даниелян А.А., Даллакян М.Р., Григорян К.В., Гукасян Э.Х. Разнообразие бентофауны на территории водосборного бассейна реки Дебед	99
Чахалян А.Х., Келешян С.К., Карпетян Ж.В., Давтян А.Г., Колоян А.О., Аветисова Г.Е. Использование тест-культур для определения аминокислот микробиологическим способом.....	103
Овсепян Л.М., Львов М.В., Захарян Г.В., Аганянц М.А., Мартirosян Е.А., Казарян Г.С. Особенности количественных сдвигов нейтральных и кислых гликолипидов при экспериментальном инфаркте миокарда.....	109
Василян Д. З. Новый ископаемый вид ельца <i>Leuciscus (Telestes) cf. souffia</i> Risso, 1826 из плейстоценовых отложений Араратской котловины Армении	113
Ревазян Р.Г., Сакоян А.Г., Сафразбекян Э.А. Интенсивность миграции биогенных элементов в травяных ценозах по высотным поясам горных экосистем.....	118
Нагапетян Х.О., Бабаханян М.А., Матинян Л.А., Григорян Ш.В., Никогосян Т.Г., Арутюнян А.З., Нурбекян Л.В. Влияние базилика лимонного (<i>Ocimum basilic</i> L. v. <i>citrol</i>) на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы у крыс в норме и при стрессе	125

Ованесян Н.А., Мкртумян М.К., Есаян А. Г. Цитогенетическое описание кallусной культуры <i>Nerium oleander</i>	130
Ованесян Н.А., Мкртумян М.К., Есаян А. Г. Антимутагенная активность полисахаридной фракции кallусной культуры <i>Nerium oleander</i>	135
Рамезанпур М. Р., Попов Ю.Г., Хавази К. Выделение и характеристики флуоресцирующих псевдомонад - видов рисовых полей северного Ирана.....	141
Даниелян Ф.Д., Аракелян М.С., Степанян И. Микроэволюционный прогресс гибридов скальных ящериц рода <i>Darevski</i>	147
Гукасян Л.Э. Изменения ряда кардиогемодинамических показателей учеников в условиях экзаменационного стресса и при получении биологически активных добавок.....	157
Арутюнян С.Г., Саргсян Ш. С., Антонян А. П., Вардеванян П.О. Образование псевдокольцевых структур в молекуле ДНК при комплексообразовании с ковалентно связывающимися лигандами.....	162
Базукян И.Л., Амбарцумян А.А., Андреасян С.А., Попов Ю.Г. Метод одновременного определения L-фенилаланина и L-тирозина с помощью фенилаланин – аммиак-лиазы <i>Rhodotorula aurantiaca</i> КМ-1	167
Аракелян В.Б., Арутюнян С.Г., Саркисян Г.С., Вардеванян П.О. Влияние малых концентраций <i>cis</i> -DDP на адсорбцию лигандов на ДНК.....	175
Аракелян М.С., Даниелян Ф. Д., Газавей Н. Распространение болотной черепахи (<i>Emys orbicularis</i>) в долине реки Аракс.....	183
Краткие сообщения	
Никогосян В.Г. Об усвоении пектина и активность азотфиксации дiazотрофами и их сообществами	188
Правила для авторов	

Biolog. J. Armenia, 1-2(60), 2008

CONTENTS

Experimental and Theoretical articles

Antonyan M.V., Harutyunyan R.A., Nahapetyan Kh.O., Martirosyan S.Sh. The influence of phitopreparate of <i>Brionia alba</i> L. on thermoregulative homeostasis of rats under the stress.....	8
Karapetyan S.G. Mode of the mathematical simulation blood circulation in the organism.....	13
Paronyan A.Kh., Markosyan L.S. The influence of group B vitamins on the content of carotenoids of photosynthetic bacterium <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	22
Gambaryan P.P., Musaelian M.S., Melician E.A. <i>Hypericum</i> L. Genus Raw Material Resources Ditermination in Armenia.....	28
Melikyan K.A. Nest building biology of small bittern in fish-breeder ponds of Ararat flat country.....	34
Aghajanyan A.Kh., Chubaryan S.V., Tumanyan L.R., Aghajanyan A.A. Martirosyan M.S., Arshakyan M.M. The content of dializates of homogenat buds of wheat and it action on <i>Candida Guilliermondii</i> HII-4 yeast growth.....	45
Sahakyan G.V., Artsruni G.G., Batikyan T.B. Changes of functional activity of rat epididymal sperm after the influence of electrostatic field.....	49

<i>Mnatsakanyan M.S.</i> Toxicological characteristic of 1,3-Dichlorobutene-2 from the standpoint of structure - biological activity theory.....	54
<i>Sahakyan N.J., Petrosyan M.T., J.A. Aghajanyan</i> Antibacterial activity of isolated cultures of bugle-weed (<i>Ajuga genevens</i> L.)	60
<i>Pipoyan S. Kh.</i> On the taxonomic status of <i>Albournoides bipunctatus armeniensis</i> Dadikyan, 1972 (Cyprinidae, Pisces)	66
<i>Sahakyan M. A.</i> Serotipization of agent of chicken colibakteriosis	72
<i>Movsesyan G.G., Davtyan V.A., Khurshudyan A.P.</i> Physiological activity of leaves and productivity of quick-growing hybrid poplars in the conditions of Armenia: Yerevan.....	76
<i>Ghazaryan V.V., Davtyan V.A., Amirbekyan A.N.</i> On metabolism of woody roots of Sevan basin residual forests.....	82
<i>A.A.Vardanyan, F.N.Tkhruni, Ts.R. Balabekyan, A.E.Aghajanyan</i> The effect of technological parameters on the L-ornithine synthesis.....	86
<i>A.A.Vardanyan, F.N.Tkhruni, Ts.R. Balabekyan, A.E.Aghajanyan, A.S.Saghiyan</i> The study and estimation of the efficiency of various antifoaming agents on the L-ornithine biosynthesis.....	92
<i>Danielyan A.A., Dallakyan M.R., Grigoryan K.V., Ghukasyan E.Kh.</i> The diversity of zoobenthos in the area of Debed river watershed basin.....	99
<i>Chakhalyan A.Kh., Keleshyan S.Gh., Karapetyan Zh.V., Koloyan H.O., Davtyan A.G., Avetisova G.E.</i> Application of test-cultures for amino acids microbiological testing.....	103
<i>Hovsepyan L.M., Lvov M.V., Zakharyan G.V., Aghayants M.A., Martirosyan E.A., Kazaryan G.S.</i> Neutral and acidic glycolipids qualitative changes features under the conditions of experimental heart attack.....	109
<i>Vasilyan D.Z.</i> A new fossil species of dace <i>Leuciscus (Telestes) cf. souffia</i> Risso, 1826 from the pleistogen sediments of Ararat depression of Armenia.....	113
<i>Revazyan R.H., Sakoyan A.G., Safrazbekyan E.A.</i> The intensity of biogen element migration in grass cenosis by altitudinal belts of mountains ecosystem.....	118
<i>Nahapetyan Kh.O., Babakhanyan M.A., Matinyan L.A., Grigoryan Sh.B., Nikoghosyan T.G., Harutyunyan A.Z., Nurbekyan L.V.</i> The Influence of <i>Ocimum Basilicum</i> on the Rats Functional Condition of Cardiovascular System in the Normal and Stress States.....	125
<i>Hovhannisyan N.A., Mkrtumyan M.K., Yesayan A.G.</i> Cytogenetic description of <i>Nerium oleander</i> callus culture.....	130
<i>Hovhannisyan N.A., Mkrtumyan M.K., Yesayan A.G.</i> Antimutagenic activity of polysaccharide fraction of <i>Nerium oleander</i> L. callus culture.....	135
<i>Ramezanpour M.R., Popov Y., Khavazi K.</i> Isolation and characteristics of fluorescent pseudomonades' species of paddy fields in the north of Iran.....	141
<i>Danielyan F., Arakelyan M., Stepanyan I.</i> The progress of microevolution in hybrids of rock lizards of genus <i>Darevskia</i>	147
<i>Ghukasyan L.E.</i> Changes in some cardiohemo-dynamic parameters of pupils in conditions of examination stress and using biologically active additives.....	157
<i>Haroutiunyan S.G., Sargsyan Sh. A., Antonyan A.P., Vardevanyan P.O.</i> The Pseudo-ring Structures Formation in DNA complexes with covalently binding ligands.....	162
<i>Bazukyan I.L., Hambardzumyan A.A., Andreasyan S.A., Popov Yu.G.</i> Method of the simultaneous determination of L-phenylalanine and L-Tyrosine by means phenylalanine – ammonia-lyase from <i>Rhodotorula aurantiaca</i> KM-1.....	167
<i>Arakelyan V.B., Haroutiunian S.G., Sarkisyan G.S., Vardevanyan P.O.</i> Influence of low concentrations of <i>cis</i> -DDP on the ligand adsorption on DNA.....	175

<i>Arakelyan M., Danielayn F., Gazavey N.</i> The spreading of swampy tortoise (<i>Emys orbicularis</i>) in the Valley of Araks River.....	183
<i>Short communications</i>	
<i>Nikoghosyan V.G.</i> On the assimilation of pectin and nitrogen-fixing activity by diazotrophs communities	188
<i>Guide to authors</i>	



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 612.57

ВЛИЯНИЕ ПЕРЕСТУПНЯ БЕЛОГО *BRIONIA ALBA* L. НА РЕГУЛЯЦИЮ ТЕМПЕРАТУРНОГО ГОМЕОСТАЗА КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

М.В. АНТОНЯН, Р.А. АРУТЮНЯН, Х.О. НАГАПЕТЯН,
С.Ш. МАРТИРОСЯН

Институт физиологии им. Л.А.Орбели НАН Армении, Ереван

Изучено влияние фитопрепарата переступня белого *Brionia alba* L. на механизмы терморегуляции организма крыс, перенесших действие негативно-эмоционально-звукового стресса. Установлено, что благодаря антистрессорным, иммунозащитным, адаптогенным и другим свойствам он способствует регулированию физических и химических механизмов терморегуляции как в норме, так и при стрессовых ситуациях.

Ուսումնասիրվել է սպիտակ լոշտակի *Brionia alba* L. բուսապատրաստկի ազդեցությունը հուզումնա-ձայնային բացասական ստրեսի ազդեցություն կրած առնետների օրգանիզմի ջերմակարգավորման մեխանիզմների վրա: Պարզվել է, որ շնորհիվ հակաստրեսորային իմունապաշտպանիչ, ադապտոգեն /հարմարածին/ և այլ հատկությունների այն նպաստում է օրգանիզմի ֆիզիկական և քիմիական ջերմային մեխանիզմների կարգավորմանը ինչպես նորմայում, այնպես էլ ստրեսային իրավիճակներում:

An influence of phitopreparate of *Brionia alba* L. on thermoregulative mechanisms of rats organism treated by negative emotional sound stress was investigated. It is established, that phitopreparate of *B. alba* ease the thermoregulative control in stressed rats due to its immunoprotective, adaptogenous and antistressive properties.

*Температурный гомеостаз - переступень белый –
эмоционально - звуковой стресс*

Изучение проблемы стресса является весьма актуальным. Стресс, описанный Гансом Селье [13, 15], может возникнуть под воздействием многочисленных факторов, в том числе эмоционального напряжения, боли, холода и тепла, травматических повреждений, физической нагрузки и других многочисленных стрессоров, нарушающих гомеостаз организма [6, 10]. Стрессорные реакции направлены на повышение устойчивости организма к резким воздействиям и носят защитно-приспособительный характер, в котором активное участие принимает гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система.

Разработка методов, способствующих преодолению отрицательных последствий стрессогенных факторов на организм, является весьма важной и актуальной. В настоящее время большое внимание уделяется применению многочисленных биогенных [1, 2, 4, 6, 8, 14], абиогенных [5, 7] и других факторов. С этой целью ныне успешно применяется также фитопрепарат лоштак (ФПЛ) (производство АОЗТ «ПАРСАМЕН ФАРМ») [3, 12].

Задачей данной работы было изучение влияния ФПЛ на механизмы регуляции температурного гомеостаза у крыс, перенесших воздействие негативно-эмоционально-звукового (НЭЗ) стресс-фактора.

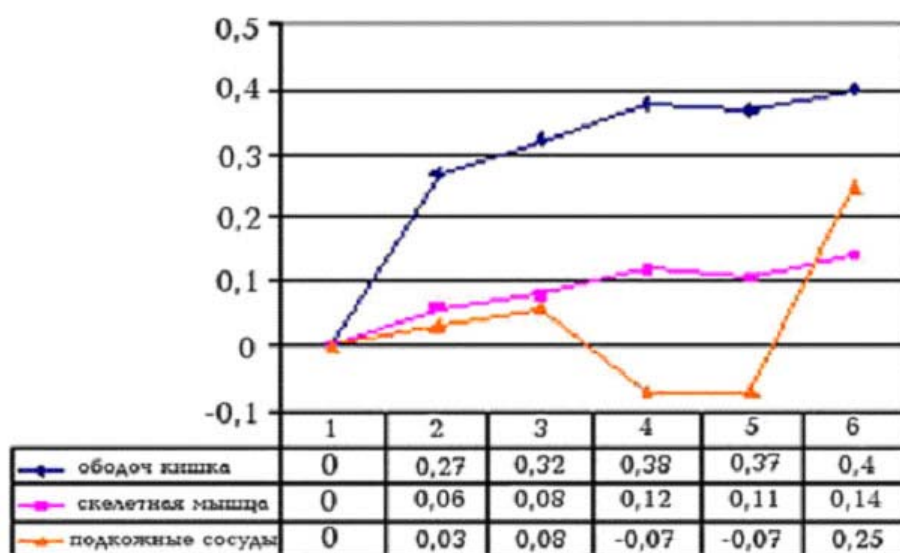
Материал и методика. Изучение влияния ФПЛ на температурный гомеостаз проводили на лабораторных белых крысах-самцах массой 200-250 г в двух сериях: I - контрольная - 7 животных и II- экспериментальная-14. Животных обеих серий содержали в одинаковых условиях на обычном лабораторном рационе. К рациону животных II серии добавляли ФПЛ в количестве 150 мг на животное ежедневно в течение 20 дней. Начиная с 21-го дня крыс обеих групп раз в три дня фиксировали в индивидуальных станках. После 30-минутной адаптации животных к новым условиям регистрировали исходный фон температуры “ядра” (ободочной кишки, скелетной мышцы) и “оболочки” (подкожных сосудов), на 12-точечном потенциометре ЭПП МЗ-09 с использованием константановых термопар с точностью $0,013^{\circ}$ для органов “ядра” и $0,13^{\circ}$ - “оболочки” [7]. Затем крыс подвергали 30-минутному действию НЭЗ фактора – тревожного крысиного писка, записанного на магнитофонную ленту, и в разные сроки после прекращения его действия проводили непрерывную регистрацию тех же температурных показателей. Результаты обрабатывали по Ойвину [9] и Рокицкому [11].

Результаты и обсуждение. Результаты экспериментов, представленные в табл. и на рис.1, показывают, что к 30 мин после прекращения НЭЗ-воздействия у контрольных крыс наблюдается определённое повышение температуры ободочной кишки (на $0,37^{\circ}$), которое продолжается и в последующие сроки исследования: к 45-й мин оно достигает $0,38^{\circ}$, а к 75-й минуте – $0,40^{\circ}$. У животных, получавших фитопрепарат лоштак (рис.2), температура ободочной кишки крыс не претерпевает заметного изменения от исходного уровня. Лишь наблюдается тенденция незаметного её увеличения, которое к 75-й минуте составляет всего $0,05^{\circ}$.

Анализируя полученные данные, можно заключить, что повышение температуры ободочной кишки является следствием увеличения теплопродукции в организме крыс при стрессовых ситуациях. Отсутствие влияния НЭЗ воздействия на температурный гомеостаз ободочной кишки у крыс, получавших ФПЛ, вероятно, связано с приобретением устойчивости животных к стрессорным воздействиям, благодаря повышению иммунологической активности организма к ним.

Таблица. Влияние НЭЗ стресс-фактора на температурный гомеостаз у intactных и получавших ФПЛ крыс

Группа крыс	Исследуемый орган	Температура °С					
		Ис-ход-ная	После воздействия НЭЗ фактором, мин				
			15	30	45	60	75
I – контроль, n=7	Ободочная кишка	38,03	38.30 (ΔT+0.27)	38.35 (ΔT+0.32)	38.41 (ΔT+0.38)	38.40 (ΔT+0.37)	38.43 (ΔT+0.40)
	Скелетная мышца	37,31	37.37 (ΔT+0.06)	37.39 (ΔT+0.08)	37.43 (ΔT+0.12)	37.42 (ΔT+0.11)	37.45 (ΔT+0.14)
	Подкожные сосуды	31,92	31.95 (ΔT+0.03)	31.08 (ΔT+0.06)	31.85 (ΔT - .07)	31.85 (ΔT -0.07)	32.17 (ΔT+0.25)
II-экспери-ментальная, n =14	Ободочная кишка	37,91	37.93 (ΔT+0.02)	37.97 (ΔT+0.06)	37.92 (ΔT+0.01)	37.97 (ΔT+0.06)	37.96 (ΔT+0.05)
	Скелетная мышца	36,89	36.81 (ΔT - 0.08)	36.86 (ΔT-0.03)	36.87 (ΔT - 0.02)	36.82 (ΔT -0.07)	36.88 (ΔT - 0.01)
	Подкожные сосуды	31,29	30.97 (ΔT - 0.32)	30.95 (ΔT-0.24)	31.18 (ΔT - 1.1)	31.08 (ΔT -0.21)	30.81 (ΔT - 0.48)

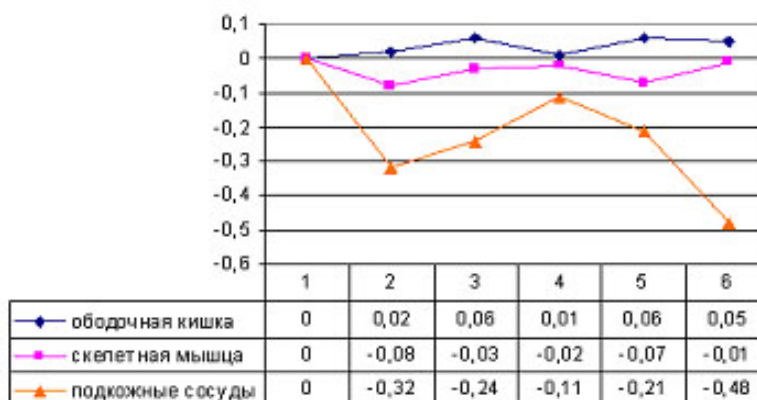


Время, исходное (1) и через каждые 15 мин

Рис. 1. Динамика изменения температуры “ядра” (ободочной кишки, скелетных мышц) и “оболочки” (подкожных кровеносных сосудов) у частично обездвиженных крыс до (1) и в разные сроки (2-6) после воздействия НЭЗ-фактором. По оси абсцисс – время, мин., по оси ординат – отклонение температуры (°C) от исходного (0) уровня.

Температурная реакция скелетной мышцы показала следующую динамику: у контрольных животных воздействие НЭЗ-фактором приводило к небольшому повышению температуры в скелетной мышце на $0,08^{\circ}$ к 30-й мин после прекращения действия этого стрессогена, а в последующие сроки продолжался постепенный рост температуры на $0,12^{\circ}$ к 45-й мин и $0,14^{\circ}$ к 75-й мин исследования.

У экспериментальных животных особо заметных изменений со стороны температуры в скелетной мышце во все сроки исследования не регистрировалось. Эти данные указывают на наличие адаптогенных свойств у ФПЛ, что выражается в сохранении стабильности температуры скелетной мышцы под воздействием стрессогенных факторов.



Время, исходное (1) и через каждые 15 мин

Рис. 2. Динамика изменения температуры “ядра”(ободочной кишки, скелетных мышц) и “оболочки”(подкожных кровеносных сосудов) у частично обездвиженных крыс до (1) и в разные сроки (2-6) после воздействия НЭЗ-фактором и при медикации лошаком. По оси абсцисс – время, мин, по оси ординат – отклонение температуры ($^{\circ}\text{C}$) от исходного (0) уровня.

Изучение температурной реакции подкожных сосудов контрольных крыс показало незначительное её отклонение от исходного уровня (от $0,03^{\circ}$ до $-0,07^{\circ}$) в первые 15-45 мин после прекращения НЭЗ воздействия с последующим ее повышением, достигающим до $+0,25^{\circ}$ от исходного уровня к 75-й мин. У крыс, получавших ФПЛ, воздействие НЭЗ стрессора приводило к постепенному снижению температуры подкожных сосудов. Так, к 15-й мин после прекращения НЭЗ-воздействия она снижалась на $0,32$, доходя до $-0,48^{\circ}$ к 75-й мин регистрации (рис.2).

Из анализа полученных данных можно заключить, что если повышение температуры ободочной кишки и скелетных мышц у контрольной группы животных, перенесших воздействие НЭЗ фактором, носит постепенный характер в указанные сроки исследования, то у экспериментальных животных, получавших ФПЛ, особо заметных изменений температурной реакции не наблюдается.

Повышение температуры скелетной мышцы и ободочной кишки у контрольных крыс, подвергшихся стрессогенному воздействию, можно объяснить возникновением сократительного термогенеза, требующего распад аденозинтрифосфорной кислоты с выделением температуры (химическая терморегуляция, что служит причиной повышения температуры отмеченных органов).

Сохранение температуры ободочной кишки и скелетной мышцы у экспериментальных животных (получавших ФПЛ) в пределах исходных показателей можно объяснить наличием адаптогенных, иммунозащитных, антистрессорных свойств у лекарственного растения – переступня белого (лоштак).

Понижение температуры подкожных сосудов после прекращения воздействия стресс-фактором, по-видимому, связано с сужением периферических сосудов, приводящим к понижению теплоотдачи, и направлено на сохранение температурного гомеостаза организма.

Таким образом, можно утверждать, что ФПЛ, обладая антистрессорными, адаптогенными и нейропротекторными свойствами, способствует сохранению температурного гомеостаза организма при стрессорных ситуациях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян К.Р., Мартиросян С.Ш., Нурбекян Л.В., и др. Докл. науч. сессии Ин-та физиологии им.ак.Л.А.Орбели НАНРА, посв. 60-летию орг. ин-та., 6-7 октября 2003г. Изд. НАНРА. 49-51, 2004.
2. Габрелян Э.С., Амроян Э.А., Паносян А.Г., Маркарян Э.А. Сб. науч.тр., посв. 70-летию Ереванского гос. мед. университета им.М.Гераци. Ереван. с. 424-426. 2000.
3. Казарян А.С. Автореф. канд. дисс., Ереван. 32 с., 1978.
4. Матинян Л.А., Мирзоян В.С., Нагапетян Х.О., Мирзоянц Ж.А., Антонян М.В., Костандян М.Ю., Карапетян К.К., Нерсисян Ж.П. Тез. докл. 2-й Всесоюзной. конф. Л. Наука, с. 223-224. 1989.
5. Матинян Л.А., Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Арутюнян К.Р. Вестник МАНЭБ. С.-П., 1, (13). с. 57-58. 1999.
6. Меерсон Ф.З., Пшеничников М.Г. Медицина. 250 с. М. 1988.
7. Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Матинян Л.А., Арутюнян К.Р. Вестник МАНЭБ. С.-П., № 3 (16). с. 108-110, 1999.
8. Нагапетян Х.О., Арутюнян Р.А., Матинян Л.А., Арутюнян К.Р., Арутюнян В.М. Вестник МАНЭБ. С.-П., 7 (19). с. 167-170. 1999.
9. Ойвин И.А. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 4, с. 38-39. 1960.
10. Панин Л.Е. Биохимические механизмы стресса. Новосибирск. Наука. 1983.
11. Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. Минск. 326 с., 1967.
12. Самвелян В.М., Пашинян С.А., Казарян С.А. Лоштак белый. Айастан. Ереван. 125 с., 1989.
13. Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. Медицина. М., 1960.
14. Mirzoyan V.S., Mirzoyants Zh.A., Antonian M.V., Matinyan L.A., Nahapetian Kh.O., Petrossian A.V. Medical and biological problems of stress. National Acad. of Sci. R.A. Yerevan. p.115, 1997.

Поступила 06.04.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК:612.13:532.5

ПОДХОДЫ К МОДЕЛИРОВАНИЮ КРОВООБРАЩЕНИЯ В ОРГАНИЗМЕ

С. Г. КАРАПЕТЯН

Институт водных проблем и гидротехники Армении, Ереван

Проведено математическое моделирование кровообращения в организме на базе установленной новой закономерности движения жидкости в капиллярах. Предложено уравнение этой закономерности, на основе которого получен ряд формул для определения численных значений параметров кровообращения, работы сердца и процесса обмена веществ в организме.

Մազանոթներում հեղուկի շարժման նոր օրինաչափության հիման վրա կատարվել է օրգանիզմում արյան շրջանառության մաթեմատիկական մոդելավորում: Առաջարկվել է նշված օրինաչափության հավասարումը, որից ստացված բանաձևերով որոշվել են արյան շրջանառության ցուցանիշների, սրտի աշխատանքի և օրգանիզմում տեղի ունեցող նյութափոխանակման թվական արժեքները:

It is carried out mode the mathematical simulation blood circulation in the organism on the base of established new laws governing the motion of liquid in the capillaries. It is proposed the equation of this regularity on bases of which is obtained a number of formulas for determining the numerical values of the parameter of blood circulation, heart work and processes of exchange of substances in the organism.

Кровообращение – математическое моделирование

В работе делается попытка методом математического моделирования определить ряд процессов кровообращения. В основу решения задачи ставится новая закономерность движения жидкости в капиллярной среде [1], которая получена из двухпорционной модели движения жидкости (ДМДЖ) в капиллярах.

Предполагается, что движение крови в организмах происходит по указанной закономерности, выяснение которой является задачей настоящей работы.

Изучалось кровообращение методом моделирования этого процесса, основанного на ДМДЖ.

Задача решается на основе следующих предпосылок.

1. Кровообращение происходит по ДМДЖ, согласно которой кровь циркулируется через две равные модельные емкости кровеносных сосудов и капилляров.

- а) емкость притока крови ($M_{\text{прт}}$) из пищеварительной и дыхательной системы к сердцу и из сердца в капилляры и клетки.
 б) емкость оттока крови ($M_{\text{от}}$) из клеток и капилляров в очистительную систему и сердце (рис. 1).

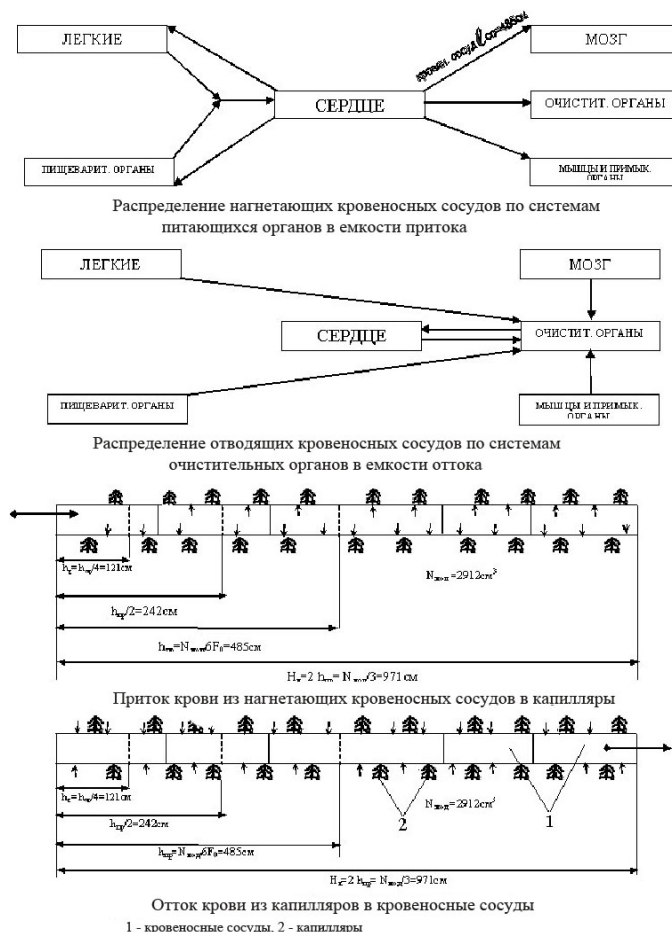


Рис. 1 Схема кровообращения в модельных емкостях по ДМДЖ

- В емкости $M_{\text{прт}}$ происходит снабжение клеток пищей, кислородом, водой, теплом и обмен веществ в них. В емкости $M_{\text{от}}$ кровь очищается от шлака и возвращается в сердце. Эти процессы происходят одновременно в период одного сердечного цикла, который принимается равным $t_0=1\text{ с}$.
- В модельных емкостях в условиях покоя организма приток и отток определенного и однозначного количества крови происходит в условном кровеносном сосуде с единичной площадью сечения ($F_0=1\text{ см}^2$) при постоянных значениях длины сосудов ($L_{\text{мод}}$), их объемного веса (v), плотности крови (ρ), скорости ее движения ($V_{\text{кап}}$), градиента напора (h_g) и числа ударов сердца в минуту (n).
- Исходными данными расчетов являются параметры ρ , v , n , и h_g .

5. Достоверность расчетных величин проверена путем сравнения их значений с фактическими данными, опубликованными в литературе.

Примем, что сердце в минуту выполняет n_i ударов и при частоте сердечного цикла $V_{\text{ц}} = n_i / 60 t_0$ и длительности одного цикла $t_{\text{ц}} = 60 t_0 / n_i$ отмеченная поверхность крови (ОПК) перемещается на длину ℓ_i .

Тогда масса нагнетаемой крови при $\rho_0 = 1 \text{ г/см}^3$ в условном кровяном сосуде с площадью сечения F_0 составит:

$$M = F_0 V_{\text{ц}} t_{\text{ц}} \rho_0 = \frac{F_0 n_i 60 t_0 \rho_0}{60 t_0 n_i} = F_0 V_{0,\text{ц}} t_{0,\text{ц}} \rho_0 = 1 \text{ г} \quad (1)$$

Из (1) следует, что единичная масса крови (M_0) движется с единичной скоростью ($V_0 = 1 \text{ см/с}$). Единичную скорость имеем и в уравнении выявленной закономерности, имеющее следующий вид:

$$V_{0,\text{ф}} = \frac{h_{\text{пр},\text{г}}(1 - 2W_i)}{2W_i t_0} \text{ или } V_{0,\text{ф}} = \frac{h_{\text{пр},\text{г}}(v_i - 2\rho_{\text{ж},i})}{2\rho_{\text{ж},i} t_0}, \quad (2)$$

где размерность $V_{0,\text{ф}}$ выражена в см/мин, $h_{\text{пр},\text{г}}$ - определенный слой гидростатического давления (ГСД), равный слою воды $h_{\text{пр}}$, заполняющей толщу капиллярной каймы ($H_{\text{к}}$) см, W - полная влагоемкость почвогрунта в долях единицы объема $\rho_{\text{ж}}$ или $\rho_{\text{кр}}$ - плотность жидкости или крови г/см^3 , v - объемный вес насыщенной капиллярной среды г/см^3 , t_0 - единичная продолжительность перемещения ОПК на длину 1 см/мин. Для секундной продолжительности ($t_0 = 1 \text{ с}$) нагнетания крови с учетом (2) можем написать:

$$\frac{M_0}{60 t_0} = \frac{F_0 \rho_0 h_{0,\text{г}}(v_i - 2\rho_i)}{2\rho_i t_0} \text{ или } M_0 = \frac{F_0 \rho_0 t_0 60 h_{0,\text{г}}(v_i - 2\rho_i)}{2\rho_i t_0}, \quad (3)$$

где $h_{0,\text{г}}$ - единичный слой ГСД см.

Из (рис. 1) видно, что масса нагнетаемой крови в секунду при $(v_i - 2\rho_i)/2\rho_i t_0 = 1$ равна 60 г. Это значит, что в 60-сантиметровом кровеносном сосуде под воздействием такого же ГСД 1 г крови движется с единичной скоростью, или 60 г крови за 1 с перемещается на 1 см. Примем, что объем сердца меньше объема 60 мл крови в 10 раз. Тогда объем каждого желудочка составит $N_{\text{ж}} = 6 \text{ см}^3$ с площадью $F_{\text{ж}} = 6 \text{ см}^2$ и высотой межжелудочковой перегородки $h_{\text{ж}} = 1 \text{ см}$. При 10-кратном увеличении скорости движения крови в желудочке получаем эквивалентную длину движущейся крови в кровеносных сосудах (60 см) с единичной скоростью. Согласно ДМДЖ, 6 мл крови за 1 с перемещается на 1 см со скоростью V_0 , из правого желудочка поступает в левый и общая масса нагнетаемой крови в сердце удваивается, составляя $M_{\text{сд}} = 12 M_{0,\text{сд}}\rho_{\text{кр}}$. Если примем, что 12-сантиметровый сосуд сердца заполнен ртутью, то под воздействием этого давления количество крови в таком же объеме кровяного сосуда будет двигаться в 13,6 раз большей скоростью. Это условие можно написать равенством:

$$12 N_0 13,6 \rho_{0,\text{рт}} = 12 F_0 t_0 V_{\text{ар}} \rho_{\text{кр}}, \text{ откуда имеем } V_{\text{ар}} = 13,6 N_0 \rho_{0,\text{рт}} / F_0 t_0 \rho_{\text{кр}}.$$

Из этого равенства следует, что под воздействием приведенного давления $13,6 N_0 \rho_{0,pt} / F_0 t_0 \rho_{кр}$ масса крови в 12-сантиметровом сосуде сердца будет двигаться с удельной скоростью $V_{уд}$, определяемой из равенства:

$$12 F_0 t_0 V_{уд} \rho_{кр} = 13,6 N_0 \rho_{0,pt}^2 / \rho_{кр} \text{ по формуле:}$$

$$V_{уд} = \frac{13,6 N_0 \rho_{0,pt}^2}{12 F_0 t_0 \rho_{кр}^2} = \frac{1,133 V_{0,уд} \rho_{0,pt}^2}{\rho_{кр}^2} \quad (4)$$

Для единичной скорости движения крови из (4) получаем следующее значение плотности крови в здоровом типовом организме:

$$\rho_{кр} = \sqrt{1,133 \rho_{0,pt}^2} = 1,0646 \rho_0 \text{ г/см}^3 \quad (5)$$

Согласно [1], плотность крови у здоровых людей составляет $1,052-1,063 \text{ г/см}^3$, т.е. максимальное значение почти совпадает с расчетной величиной. С учетом величины $\rho_{кр}=1,0646 \text{ г/см}^3$ из равенства $V_{ар} = 13,6 N_0 \rho_{0,pt} / 12 F_0 t_0 \rho_{кр}$ получаем следующие значения скорости и массы нагнетаемой крови в артерии:

$$V_{ар} = \frac{12 N_{0,сд} 1,0646^2 \rho_{0,кр}^2}{F_0 t_0 \rho_{0,pt}^2} = 13,6 \text{ см/с} \text{ и } M_{ар} = \frac{12 N_{0,сд} 1,0646^2 \rho_{0,кр}^2}{\rho_{0,pt}} = 13,6 \text{ г} \quad (6)$$

При нагнетании 12мл крови со скоростью 13,6 см/с в артериальном сосуде с площадью сечения F_0 длина перемещения ОПК в нем составляет 163,2 см. Этому слою соответствует определенное давление рт.ст., устанавливаемое из соотношения:

$$1 \text{ м вод. ст.} \rightarrow 73,56 \text{ мм рт.ст.}$$

$$1,632 \text{ м кров. ст.} \rightarrow h_g \text{ мм рт.ст.,}$$

$$\text{откуда имеем } h_g = 120 \text{ мм рт.ст. .}$$

В этом случае уравнение (2) примет вид:

$$V_{0,ф} = \frac{120 h_{0,g} (1 - 2 W_i)}{2 W_i t_0}, \text{ или } V_{0,ф} = \frac{120 h_{0,g} (v_i - 2 \rho_{кр,i})}{2 \rho_{кр,i} t_0} \quad (7)$$

При $\rho_{кр}=1,0646 \text{ г/см}^3$ из (7) получаем:

$V = 2,147 \text{ г/см}^3$ и $W = 1,0646 / 2,147 = 0,4959$. Одновременно формулу (7) можем написать в виде:

$$V_{0,ф} = \frac{120 h_{0,g} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,кр})}{t_0 2,1292 \rho_{0,кр}} \quad (8)$$

Примем, что при определенной продолжительности сокращения сердца ($t_{\text{сок}}$) количество движущейся крови в желудочке составляет $N_{\text{ж}} = 1,133 V_{0,\text{уд}} 60 t_0 / n_i F_0$. Тогда из равенства $6 F_{0,\text{ж}} V_0 t_{\text{сок}} = F_{0,\text{ж}} 1,133 V_{0,\text{уд}} 60 t_0 / n_i$ с учетом (8) получим следующую формулу для определения $t_{\text{сок}}$ или длительности фазы изгнания.

$$t_{\text{с}} = \frac{1,133 \cdot 60 t_0 120 h_{0,\text{г}} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,\text{кр}})}{6 \ell_0 n_i 2,1292 \rho_{0,\text{кр}}} \quad (9)$$

Из (9) видно, что в условиях покоя организма, т.е. при $n_i = 60$ уд/мин, величина $t_{\text{с}}$ составляет 0,189 с. Согласно [3], длительность фазы изгнания равна 0,2-0,25 с. При $n_i = 72$ уд/мин $t_{\text{сок}}$ составляет 0,226 с и совпадает со средним значением фактической величины. Небольшая продолжительность сокращения сердца создает высокую скорость или градиент давления, благодаря которому происходит ток крови из артерии в венозно-капиллярную систему. На основании (6) и (9) можем написать $M_{\text{си}} = 12 N_{0,\text{сд}} \cdot 1,0646^2 \rho_{0,\text{кр}}^2 \cdot t_0 / t_{\text{сок}} \rho_0$, откуда с учетом (9) получаем следующую формулу для определения систолической массы крови:

$$M_{\text{си}} = \frac{12 N_{0,\text{сд}} \cdot 1,0646^2 \rho_{0,\text{кр}} 6 \ell_0 n_i \cdot 2,1292 \rho_{0,\text{кр}}}{1,133 \cdot 60 \cdot 120 h_{0,\text{г}} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,\text{кр}})} \quad (10)$$

Из (9) видно, что при $n_i = 60$ уд/мин $M_{\text{си}} = 72$ г. Согласно [1], этот показатель в норме колеблется от 70 до 80г, т.е. расчетное и среднее фактическое значения близкие величины. Скорость сокращения сердца определяется из равенства $V_{\text{сок}} = 1,133 V_{0,\text{уд}} t_0 / t_{\text{сок}}$, откуда с учетом (9) получаем:

$$V_{\text{сок}} = \frac{6 \ell_0 \cdot V_{0,\text{уд}} \cdot n_i \cdot 2,1292 \rho_{0,\text{кр}}}{60 \cdot 120 h_{0,\text{г}} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,\text{кр}})} \quad (11)$$

При $n_i = 60$ уд/мин из (11) имеем $V_{\text{сок}} = 6$ см/сек. Фактическая величина равна 5см/с [1]. Скорость движения крови в венозно-капиллярной системе при продолжительности сокращения сердца определяется из равенства:

$V_{\text{кап}} = 6 F_{0,\text{ж}} \cdot 1,133 V_{0,\text{уд}} \cdot 1,0646^2 \rho_{0,\text{кр}}^2 t_0 / F_0 \rho_0^2 t_{\text{сок}}$ по формуле:

$$V_{\text{кап}} = \frac{36 \ell_0 \cdot 1,0646^2 \rho_{0,\text{кр}}^2 V_{0,\text{уд}} \cdot n_i \cdot 2,1292 \rho_{0,\text{кр}}}{\rho_0^2 \cdot 60 \cdot 120 h_{0,\text{г}} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,\text{кр}})} \quad (12)$$

При $n_i = 72$ уд/мин из (12) получаем $V_{\text{наг}} = 49$ см/с, что близко к фактическому значению - 50 см/с. При $n_i = 60$ уд/мин $V_{\text{кап}} = 40,8$ см/с.

При единичной площади сечения кровеносных сосудов их длина в каждой модельной емкости равна половине общей длины кровеносных и капиллярных сосудов, где $M_{\text{си}}$ движется со скоростью $V_{\text{кап}}$ и содержащаяся в них кровь за 1 с перемещается на 1см. В этом процессе сердце нагнетает определенное количество крови ($M_{\text{кр}}$), величина которой с учетом (5), (10) и (12) подсчитывается из равенства:

$$M_{\text{кр}} = M_{\text{си}} \cdot V_{\text{кап}} t_0 / \ell_0 \text{ по формуле:}$$

$$M_{кр} = \frac{216 \ell_0 \cdot 12 N_{0,сд} \cdot 1,0646^2 \rho_{0,кр} \cdot n_i^2 \cdot 2,1292^2 \rho_{0,кр}^2}{60^2 \cdot [120 h_{0,г} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,кр})]^2} \quad (13)$$

Как видно из (13), при $n_i^2=60^2$ масса нагнетаемой крови в емкости $N_{прт}$ или $N_{от}$ составляет 2937,6 г. Общее количество крови в организме равно 5875 г. Из сущности формулы (13) следует, что кровообращение происходит по ДМДЖ. Согласно [2], минимальное значение минутного количества крови в покое составляет 5800 г, которое почти совпадает с расчетной величиной.

Распределение 5875 г крови по модельным емкостям несколько неравномерно, что видно из следующего. При $W=1,0646\rho_{0,кр}/2,147v_0=0,4959W_0$ масса крови, находящаяся в $N_{от}$, равна: $M_{от}=5875 M_{0,об} \cdot 0,4959 W_0=2913$ г, а в $N_{прт}$ составляет $M_{прт}=5875 - 2913 M_{от}=2962$ г. Это объясняется тем, что после обмена веществ в емкости оттока плотность крови увеличивается, скорость ее движения падает и объем движущейся крови уменьшается. Одновременно масса крови в указанных емкостях уравнивается.

Систолическая масса крови в кровеносных сосудах нагнетается со скоростью $13,6 V_{0,со}$ см/с и работа сердца в емкостях $N_{прт}$ и $N_{от}$ составляет $A_{со}=72 M_{0,си} 13,6 \cdot V_{0,со} \cdot t_0=979 A_{0,со}$ г см. Эта работа в одной модельной емкости равна $A_{со,прт}=489,5$ г см, что означает на длине 489,5 см 1 г крови перемещается на 1 см. Длина 489,5 см представляет собой параметр $h_{пр}$, или она равна 1/6 части $N_{прт}$. В 6-ти кровеносных сосудах масса движущейся крови составляет 2937 г/см. Если 489,5 мл крови вместить в одном условном кровеносном сосуде, длиной 2937 см и средней площадью сечения $F_{со}$, то из равенства $F_{со} \cdot 2937 \ell_{0,со} = 489 N_{0,кр}$ получаем искомую площадь сечения сосуда, равную $F_{со}=0,166 \text{ см}^2$. Средний диаметр сосуда равняется $d_{со}=0,46$ см.

Систолическая масса крови в капиллярах нагнетается со скоростью $V_{кп}=40,8$ см/с, и работа сердца в емкости притока капилляров составляет $A_{кп,прт}=72 M_{0,си} \cdot 40,8 V_{0,кп} \cdot t_0=2937$ г/см. Такая же масса крови нагнетается в отводящих капиллярах, поэтому общая масса движущейся крови в капиллярах составляет 5875 г. Приток и отток массы крови в указанных капиллярных емкостях равна 72 г, которая за 1 с перемещается на 1 см. При размещении 72 г крови в одной условной капиллярной трубке длиной 5875 см и средней площадью сечения $F_{кп}$ из равенства $F_{кп} \cdot 5875 \ell_{0,кп} = 72 N_{0,си}$ получаем:

$$F_{кп}=0,0123 \text{ см}^2 \text{ и } d_{кп}=0,125 \text{ см.}$$

Единичная масса крови в желудочке за время 1с со скоростью $V_{сок}=6$ см/с перемещается на длину 6 см, и длина движущейся крови в сердце равняется 12 см. Длительность этого перемещения или продолжительность диастолы определяется из равенства $12 F_0 V_{0,сд} \cdot t_{ди} = 6 \ell_{0,ж} \cdot F_0$, откуда получаем $t_{ди} = 0,5$ с. Продолжительность систолы определяется из равенства $t_{си} = 60 t_0 / n_i - 0,5 t_{ди}$, откуда при $n_i=75$ уд/мин имеем $t_{си}=0,3$ с. В [2] указывается, что при $n_i=75$ уд/мин длительность сердечного цикла составляет 0,8, систолы – около 0,3 с и диастолы 0,5 с, т.е. расчетные и фактические данные равны.

Из (7) получаем следующую формулу для определения артериального давления в зависимости от величин $\rho_{кр}$ и v_i :

$$h_{д,i} = \frac{2\rho_{кр,i}}{v_i - 2\rho_{кр,i}} \quad (14)$$

Из (14) видно, что при $\rho_{кр}=1,0646 \text{ г/см}^3$ и $v=2,147 \text{ г/см}^3$ получаем нормальное давление, которое в типовом организме равно 120 мм рт. ст. В каждом организме параметры $\rho_{кр}$ и v имеют определенные значения, поэтому давление в них разное. Оно меняется и при отклонении значений указанных параметров от нормы данного организма.

Из условия $H_{к,гс} = H_k$ следует, что высота ГСД в кровеносных сосудах $N_{от}$ определяется параметром H_k , составляющим $H_{к,от}=2913 M_{0,от}/3 F_0 \cdot 1,0646 \rho_{0,кр}=912 \text{ см}$ кров. столба. Этому слою соответствует 670 мм.рт.ст., или равняется одной атмосфере применительно к средней широте Земли. Это значит, что давление в кровеносных сосудах и в атмосфере данной территории уравнивается.

В процессе обмена веществ плотность крови в отводящих сосудах увеличивается. Ее величина определяется из равенства:

$971 N_{от} \rho_{от}=987 N_{пр} \cdot 1,0646 \rho_{0,кр}$, откуда получаем $\rho_{от}=1,082 \text{ г/см}^3$. После очистки крови $\rho_{от}$ уменьшается до прежней величины $1,0646 \text{ г/см}^3$. Поскольку движение систолической массы крови в $N_{от}$ происходит при повышенной плотности крови и скорости ее движения, то продолжительность ее нагнетания будет меньше единицы, определяемой из равенства $V_0 t_{от} = 1,133 V_{0,уд} \cdot t_0 \rho_0^2 / \rho_{от}^2$, где учтена формула (4). Из этого равенства получаем:

$$t_{от} = \frac{1,133 V_{0,уд} \cdot t_0 \rho_0^2}{V_0 1,082^2 \rho_{от}^2} = 0,968 t_0 \text{ с.} \quad (15)$$

Вышеизложенное позволяет определить работу сердца в здоровом, типовом организме из равенства $A_{об}=M_{си} \cdot V_{кап} t_{0,прт} + M_{си} \cdot V_{кап} t_{от}$, которая с учетом (10), (12) и (15) подсчитывается по формуле:

$$A_{об} = \frac{216 \ell^3_0 \cdot 12 N_{0,сд} \cdot 1,0646^2 \rho_{0,прт} n_i^2 \cdot 2,1292^2 \rho_{0,кр}^2}{60^2 \cdot [120 h_{0,g} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,кр})]^2} + \\ + \frac{216 \ell^3_0 \cdot 12 N_{0,сд} \cdot 1,082^2 \rho_{0,от} \cdot V_0 \cdot 0,968 \cdot t_{0,от} \cdot n_i^2 \cdot 2,1292^2 \rho_{0,кр}^2}{60^2 \cdot [120 h_{0,g} (2,147 v_0 - 2,1292 \rho_{0,кр})]^2} \quad (16)$$

Как видно из (16), при $n_i^2=60^2 \text{ уд/мин}$ получаем минутную работу, равную 5875 г·см, которую сердце выполняет в условиях полного покоя организма (во время сна), расходуемую на функционирование внутренних органов и накопление резервной энергии в клетках. При максимальной нагрузке число ударов сердца достигает 124 уд/мин и максимальная работа сердца равняется $25 \cdot 10^3 \text{ г·см}$. По литературным данным [2], минутный объем сердца у здорового и взрослого человека в покое составляет 5800 см^3 , а при максимальной нагрузке - $25 \cdot 10^3$ и более см^3 , т.е. фактические и расчетные данные почти равны.

Минимальная работа сердца постоянная величина, обеспечивающая положительный баланс вырабатываемой и расходуемой энергии во время сна. При отрицательном балансе происходит истощение организма, а при повышенном положительном балансе - накопление излишнего веса в организме. Анализ формулы (16) показывает, что в процессе притока и оттока 2938 г крови через указанные емкости во всех клетках этих емкостей происходит обмен веществ, который в спокойном состоянии здорового организма определяется постоянным количеством циркулируемой крови $M_{кр}$ по данным параметров $\rho_{кр}$, v , n и h_g соответствующей модели. Если клетки данной емкости по какой-либо причине повреждены, то нормальный процесс обмена веществ нарушается и величины $\rho_{от}$, $v_{от}$ и $M_{кр}$ отклоняются от нормы. Это обычно бывает при нарушении теплового режима. Нарушение обмена веществ в емкости притока обусловлено недостаточной деятельностью снабжающих органов, или болезнью крови, или кровеносных сосудов. Если $M_{кр}$ отклонено от нормы в емкости отвода, то нарушение обмена веществ обусловлено недостаточной деятельностью очистительной системы или кровеносных сосудов, или крови.

Из вышеизложенного следует, что в процессе кровообращения по всей длине кровеносных сосудов и капилляров под воздействием силы тяготения на их стенках в течение 1 с удерживается связанная кровь в количестве 2938 г, расходуемая на питание всех клеток организма (в том числе и клеток кровеносных сосудов емкости отвода) необходимыми жизнеобеспечивающими веществами. Согласно ДМДЖ, такое же количество крови из клеток поступает в отводящую емкость массой 2938 г, где происходит очистка и транспортировка чистой крови к сердцу. В этом и заключается сущность кровообращения и обмена веществ по ДМДЖ.

Предлагаемая модель кровообращения позволяет решать диагностические задачи. Так, если современными диагностическими методами установлено нормальное функционирование сердца, легких, почек, печени и других органов и человек чувствует себя плохо, то большими могут оказаться кровеносные сосуды или кровь. Это значит, что по данным отклоненных значений параметров $\rho_{кр}$, v и $M_{кр}$ можно установить наличие скрытой болезни в больных кровеносных сосудах и крови.

Как отмечалось выше, в основу решения задачи поставлены 4 исходных параметра - $\rho_{кр}$, v , n и h_g . Из них наиболее важными являются плотность крови и кровеносных сосудов, с которыми связаны также тромбические, гипертонические и диабетические заболевания. Откуда следует, что изучение этих вопросов и постоянный контроль над изменением значений указанных параметров являются неотложной задачей медицины, в частности в службе профилактики. С этой целью возникает необходимость в разработке новых методов и аппаратуры для точного определения численных значений указанных исходных параметров, что отсутствует в современной клинической службе. Эти методы и приборы должны быть доступными каждому человеку, чтобы самому контролировать изменение указанных параметров в своем организме и принять соответствующие меры. Одним из них может служить прием определенной пищи по соответствующему объемному весу продуктов, позволяющий регулировать плотность крови.

Отклонение значения объемного веса кровеносных сосудов от нормы можно восстановить с помощью массажа тела определенными смазывающими веществами, или лекарством, что является задачей будущих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Карапетян С.Т.* Мат.-алы шестого международного конгресса “Вода: экология и технология, ЭКВАТЭК-2004”, 4 I, 205, 2004.
2. Малая медицинская энциклопедия, 4, М., изд-во “Советская энциклопедия”, 1966.
3. *Полубаринова-Кочина П. Я.* Теория движения грунтовых вод, М., Гостехтеориздат, 676 с., 1952.
4. *Роде А. А.* Почвенная влага. М., изд-во АН СССР, 456 с.
5. Справочное руководство гидрогеолога Л., Гостехтеориздат, 836 с., 1950.
6. *Ханпель Дж., Бренер Г.* Гидродинамика при малых числах Рейнольдса. М., изд-во “Мир”, 1976.

Поступила 09.07.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 576.8.66.4

ВЛИЯНИЕ ВИТАМИНОВ ГРУППЫ В НА СОДЕРЖАНИЕ КАРОТИНОИДОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩЕЙ БАКТЕРИИ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

А.Х. ПАРОНЯН, Л.С. МАРКОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, Абовян

Изучено влияние витаминов группы В на содержание каротиноидов несерной пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, шт. D-10 при выращивании в фотосинтетических условиях. Микроорганизм в качестве факторов роста требует тиамин, ниацин и биотин. Добавление к питательной среде 10-20 мкг/л витамина В₁₂ увеличивает как выход биомассы, так и общее содержание каротиноидов в клетках. Обнаружено, что витамин В₁₂ особенно благоприятно влияет на биосинтез сфероиденона. В присутствии в среде культивирования цианокобаламина значение соотношения основных каротиноидов сфероиден/сфероиденон уменьшается почти вдвое. Показано, что концентрация витамина В₁₂ выше 30 мкг/л подавляет рост культуры.

Ուսումնասիրվել է В խմբին պատկանող մի քանի վիտամինների ազդեցությունը ոչ ծծմբային պուրպուր բակտերիա *Rhodobacter sphaeroides* D-10 շտամի կարոտինոիդների պարունակության վրա ֆոտոսինթետիկ աճի պայմաններում: Միկրոօրգանիզմը որպես աճի խթանիչներ պահանջում է թիամին, նիացին և բիոտին:

Մանրամիջավայրում 10-20 մկգ/լ վիտամին В₁₂-ի առկայությունը նպաստում է ինչպես կենսազանգվածի, այնպես էլ բջիջներում կարոտինոիդների ընդհանուր քանակի ավելացմանը: Հաստատվել է, որ վիտամին В₁₂-ը բարենպաստ ազդեցություն ունի հատկապես սֆերոիդենոնի կենսասինթեզի վրա: Մանրամիջավայրում ցիանոկոբալամինի առկայության դեպքում հիմնական կարոտինոիդների հարաբերությունը (սֆերոիդեն/սֆերոիդենոն) նվազում է մոտ երկու անգամ: Ցույց է տրվել, որ 30 մկգ/լ քանակից բարձր վիտամին В₁₂-ը ճնշում է կուլտուրայի աճը:

The influence of some vitamins of group В on content of carotenoids of purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter sphaeroides* D-10 during photosynthetic growth has been studied. The microorganism requires thiamin, biotin and niacin as a factor of growth. The addition of 10-20 mkg/l vitamin В₁₂ to nutrient medium increases both the yield of biomass and general content of carotenoids. It was shown that vitamin В₁₂ especially influences on biosynthesis of spheroidenon. The presence of cyanocobalamin in the nutrient medium decreases almost twice as much the correlation of main carotenoids spheroiden/spheroidenon. Concentration of vitamin В₁₂ in nutrient medium more than 30 mkg/l suppresses the growth of culture.

Rhodobacter sphaeroides - сфероиден - сфероиденон - витамины группы В.

Каротиноидные пигменты как биологически активные вещества широко используются в медицинской практике, пищевой промышленности и косметике. Обладая широким антиоксидантным свойством, многие каротиноиды, в том числе β -каротин, ликопин нашли применение в медицинской практике в качестве радиопротекторного, антиканцерогенного средства [1]. В микробиологической промышленности в качестве продуцентов каротиноидов широко используются мицелиальные грибы. Однако по разнообразию каротиноидных пигментов они уступают фототрофным бактериям.

Обзор имеющейся литературы показал, что количество и состав каротиноидов у фототрофных бактерий значительно меняется в зависимости от освещения, аэрации, возраста культуры и других факторов роста [10]. В биотехнологии для интенсификации процесса получения биологически активных соединений часто применяют химические вещества-биорегуляторы. Так, стимуляторами ликопинообразования у мукорового гриба *Blakeslea trispora* являются производные пиридина [5]. Однако не изучено влияние витаминов группы В на биосинтез каротиноидов.

Целью настоящего исследования было изучение влияния витаминов группы В на состав и количество каротиноидов фототрофной бактерий *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10.

Материал и методика. В работе использовали несерную пурпурную бактерию *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10, выделенную нами из гидрокарбонатных минеральных источников Джермука [3]. Штамм депонирован в Республиканском Центре депонирования микробов Армении под номером ИНМИА В-6509. Культуру поддерживали и в дальнейшем выращивали на среде Ормеруда [9]. Для изучения пигментов микроорганизм выращивали в анаэробных условиях в 100 мл колбах с притертыми пробками, заполненных доверху питательной средой, в люминостате при освещении 1000 люкс. Отношение бактерии к витаминам группы В устанавливали посредством добавления их в среду Ормеруда взамен дрожжевого экстракта. Для засева опытных колб использовали 4-суточную культуру, которую вносили в количестве 5% от объема опытной среды. Начальное значение pH среды 7,0. Температура культивирования 28-30°. Рост культуры оценивали спектрофотометрически по измерению оптической плотности суспензии клеток на спектрофотометре СФ-26, а также по сухому весу - высушиванием при 105° до постоянного веса осажденных и промытых клеток.

Спектры поглощения целых клеток культуры снимали на регистрирующем спектрофотометре Perkin Elmer, Lambda-800 UV-VIS в диапазоне длины волн 400-550 нм. Для выделения каротиноидов использовали четырехсуточную культуру, выращенную в фотосинтетических условиях. Биомассу собирали и отмывали водой центрифугированием при 6000 об/мин. Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена смесью ацетона с метанолом (7:2 по объему) [8]. Во избежание разрушения пигментов, к клеточным экстрактам добавляли стабилизатор фенозан-30 в концентрации 5×10^{-4} моль/л, отобранный нами ранее для стабилизации каротиноидов фототрофных бактерий [4]. Идентификацию каротиноидов проводили на основании спектров поглощения и величин R_f отдельных пигментов, разделенных путем тонкослойной хроматографии на силикагелевых пластинках Silufol ("Кавальер", Чехия).

Разделение пигментов проводили в восходящем токе растворителя бензол: петролейный эфир : ацетон (17:2:1) в темноте. После разделения смеси пигментов на отдельные зоны последние элюировали с пластинок петролейным эфиром (40-60°), измеряли объем и фотометрировали на спектрофотометре. Содержание их в биомассе рассчитывали по формуле (мг на 1г абсолютно сухого вещества).

$$C = \frac{D \times V \times 10}{E^{1\%}_{1\text{ см}} \times P},$$

где D – оптическая плотность раствора по максимуму поглощения; V – объем элюата, мл; $E^{1\%}_{1\text{ см}}$ – коэффициент экстинкции соответствующего пигмента (слоя толщины 1см 1%-ного раствора каротиноида); P – навеска сухой биомассы, взятой на экстракцию, г. При расчете количества каротиноидов использовали коэффициенты экстинкции, приведенные Иенсеном для фотосинтезирующих бактерий [8]. Для сфероидена он составляет 2765, для сфероиденона-2065, а для нейроспорина-2900.

В работе использовали витамины и дрожжевой экстракт фирмы “Serva”(Германия).

Результаты и обсуждение. Пурпурная несерная бактерия *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10 растет в анаэробных условиях на свету и в аэробных - в темноте. Оптимальная температура роста 28-30°. Фотосинтетическими пигментами являются бактериохлорофилл а и каротиноиды сфероиденовой группы. Последние являются производными ликопина. Бактерия нуждается в факторах роста. Витаминами, необходимыми для их роста являются тиамин (1 мг/л), ниацин (1 мг/л) и биотин (0,04 мг/л), которые можно заменять дрожжевым экстрактом. Культура не имеет потребности в цианокобаламине. Однако, при изучении физиологических особенностей штамма, нами была обнаружена связь между биосинтезом каротиноидов и содержанием в питательной среде витамина В₁₂. Поэтому для более подробного выявления этого процесса нами было проведено сравнительное изучение роста и каротинообразования штамма при выращивании с указанными витаминами, которые вводились в среду выращивания в разных сочетаниях. Накопление биомассы *Rh. sphaeroides* и содержание в клетках отдельных каротиноидов при выращивании с разными факторами роста подробно представлены в таблице. Контролем служила среда Ормеруда с дрожжевым экстрактом (вариант 1). При фотосинтетическом росте с дрожжевым экстрактом (0,02%) спектр поглощения целых клеток культуры показывает три основных максимума поглощения при 450, 478 и 510 нм (рис.)

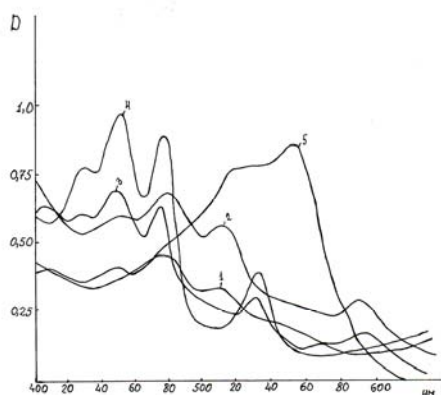


Рис. Спектры поглощения целых клеток *Rh. sphaeroides*, шт. Д-10, выращенных в фотосинтетических условиях с разными факторами роста: 1-с дрожж. экстрактом; 2- с тиамином, биотином, ниацином; 3- с тиамином, биотином, ниацином и витамином В₁₂ (10 мкг/л), 4- с тиамином, биотином, ниацином и витамином В₁₂ (20 мкг/л); 5 - спектр поглощения водного раствора витамина В₁₂.

Общее содержание каротиноидных пигментов составляет 1,37% сухой массы клеток. В одинаковых условиях роста синтез каротиноидов несколько увеличивается, когда взамен дрожжевого экстракта к среде выращивания добавляется тиамин, ниацин и биотин (вариант 2). Спектр поглощения целых клеток имеет те же максимумы, что и в случае дрожжевого экстракта. В этом случае при некотором понижении выхода биомассы, несколько увеличивается общее содержание каротиноидов до 1,43%. В обоих случаях синтезируется заметно больше сфероидена и меньше сфероиденона.

Интересная картина наблюдается, когда на фоне 3-х витаминов к ферментационной среде добавляется витамин В₁₂. Количественные изменения, происходящие в общем содержании каротиноидов и содержании отдельных каротиноидов совпадают с изменениями максимумов в спектре поглощения целых клеток, которые обнаруживаются при 428, 452 и 476 нм (рис). Опыты показали, что рост и каротиногенез активно протекает при концентрации цианокобаламина 10 мкг/л (вариант 3) и 20мкг/л (вариант 4), а выше 30 мкг/л витамин подавляет рост культуры. Следует отметить, что максимумы поглощения водного раствора чистого витамина В₁₂ не совпадают с максимумами поглощений изучаемых каротиноидов (рис.). Из приведенных данных видно, что в присутствии в среде витамина В₁₂ общее количество каротиноидов увеличивается на 43% по сравнению с дрожжевым экстрактом и на 37% по сравнению с тиамином, ниацином, биотином. Выраженное изменение происходит и в соотношении основных каротиноидов сфероидена и сфероиденона. В присутствии в среде выращивания витамина В₁₂ соотношение сфероиден/сфероиденон уменьшается почти вдвое (табл).

Таблица. Влияние факторов роста на содержание и состав каротиноидов клеток *Rh. sphaeroides*, шт.Д-10 при анаэробном росте на свету

Варианты питательных сред	Биомасса, г/л	Общее содержание каротиноидов, %	Каротиноиды, мг/г сух. биомассы			Соотношение сфероиден/сфероиденон
			Сфероиден	Сфероиденон	Нейроспорин и др. каротиноиды	
Первый	1,12	1,37	11,1	3,45	0,45	3,21
Второй	1,08	1,43	11,6	3,4	0,42	3,4
Третий	1,22	1,83	12,83	8,8	0,67	1,45
Четвертый	1,34	1,96	14,9	10,57	0,78	1,41

Примечание- содержание вариантов см. в тексте.

Несерные пурпурные бактерии рода *Rhodobacter*, в том числе *Rh. sphaeroides*, содержат две формы светособирающих антенных комплексов - LH1 (B875) и LH2 (B800-850), локализованных в внутрицитоплазматических мембранах. Бактериохлорофилл *a* и каротиноиды являются важными структурными и функциональными компонентами антенных комплексов. Сфероиден и сфероиденон являются двумя основными каротиноидами, синтезируемыми бактерией как при выращивании анаэробно на свету, так и аэробно в темноте. У изучаемой культуры сфероиден является промежуточным продуктом биосинтетического пути каротиноидов, когда сфероиденон конечный продукт биосинтеза каротиноидов[2]. Трансформация сфероидена в сфероиденон представляет собой включение 2-оксигруппы в молекулу каротиноида. Количество сфероиденона в клетках культуры увеличивается при высокой интенсивности света, а также при переходе от анаэробных к аэробным условиям, когда культура адаптируется к новым условиям роста [7].

Биологическая активность каротиноидов обусловлена их способностью взаимодействовать с активными формами кислорода или возникающими в процессе свободнорадикальных реакций соединениями. Показано, что небольшое количество синглетного кислорода образуется при выращивании *Rh. sphaeroides* в условиях повышенной освещенности, и это не влияет на рост культуры. Синглетный кислород образуется не только при фотохимической реакции внутри фотосинтетического аппарата, но также под влиянием разных фотосенсибилизаторов. Известно, что метиленовый синий является фотосенсибилизатором и влияет на биосинтез каротиноидов путем образования синглетного кислорода [6].

Известно, что витамин В₁₂ также является фотосенсибилизатором, и его присутствие в среде выращивания приводит к усилению образования синглетного кислорода и увеличению содержания сфероиденона. В связи с тем, что наши опыты проводились в анаэробных условиях при достаточно высоком освещении (1000 люкс), то и это может стать причиной увеличения сфероиденона [7]. Следует отметить, что фотопротекторное действие сфероиденона в клетках *Rh. sphaeroides* выражено сильнее по сравнению сфероиденом.

В связи с тем, что витамин В₁₂ имеет большую биологическую активность и широкие метаболические функции, то возможно, что увеличение сфероиденона связано с более сложными процессами, происходящими в фотосинтетическом аппарате культуры, что может стать предметом дальнейших исследований.

Представленные данные могут быть использованы при направленном получении каротиноидов сфероиденовой группы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гесслер Н.Н., Соколов А.В., Белозерская Т.А. Прикл. биохимия и микробиология, 39, 4, 435-437, 2003.
2. Елисеев А.А., Каплан С. Прикл. биохимия и микробиология, 35, 1, 25- 30, 1999.
3. Малатян М.Н., Арутюнян Т.Г., Паронян А.Х., Кеннен О.И., Александрушкина Н.И. Микробиология, 51, 3, 517-520, 1982.
4. Паронян А.Х., Малатян М.Н., Пудель М.Е., Гольденберг В.И. Прикл. биохимия и микробиология, 26, 5, 714-717, 1990.
5. Феофилова Е.П., Терешина В.М., Меморская А.С. Микробиология, 64, 6, 734-740, 1995.
6. Anthony J.R., Warczak K.L., Donohue T.J. PNAS, 102, 18, 6502-6507, 2005.
7. Yeliseev A.A., Erazo J. M., Kaplan S. J. Bacteriology, 178, 20, 5877-5883, 1996.
8. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoids and their bearing on biosynthetic problems. Trondheim., 199 p. 1962.
9. Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H. Arch. Biochem. Biophys., 94, 3, 449-463, 1961.
10. Takaichi S., Shimada K. Methods in Enzymol., 213, 2, 374-386, 1992.

Поступила 15.08.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК: 581.6; 615.19; 615.20

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАПАСОВ СЫРЬЯ РОДА *HYPERICUM* L. В АРМЕНИИ

П.П. ГАМБАРЯН¹, М.С. МУСАЕЛЯН¹, Е.А. МЕЛИКЯН²

¹Институт ботаники НАН РА, Ереван, ²Ереванский государственный
медицинский университет им. М.Гераци: кафедра
фармакологии и ботаники

Зверобой продырявленный с древности широко используется в традиционной медицине для лечения ран, вирусных заболеваний и депрессий, а в последнее время в онкологии. В связи с возросшим интересом к видам зверобоя определение запасов и качества сырья в настоящее время представляется весьма актуальным.

Դեռևս վաղ ժամանակներից արոհունդ խոցվածք լայն կիրառվում է ավանդական բժշկության մեջ՝ տարբեր հիվանդությունների, վերքերի, վիրուսային հիվանդությունների և դեպրեսիաների բուժման համար, իսկ վերջերս նաև օնկոլոգիայում: Ներկայումս, հաշվի առնելով արոհունդի տեսակների նկատմամբ աճող հետաքրքրությունը, առաջնահերթ է դառնում արոհունդի պաշարների և հումքի որակի գնահատումը:

H. perforatum L. from ancient is wide spread in traditional medicine for different diseases treatment: wound, virus diseases and depression, and recently in oncology also. As the species of St. John's-wort are now of a great interest, the determination of St. John's wort resources and stuff quality are very actual.

Hypericum - запасы сырья - качество – применение

Нами произведена оценка биологических и эксплуатационных запасов видов зверобоя, произрастающих в Армении.

Материал и методика. Объектом исследования служили следующие ядовитые виды рода *Hypericum* L. [1, 4, 6]. Исследования проводились на 188 га в различных климатических зонах.

Изучение запасов сырья и определение его массы проводили в 1998 г. маршрутным методом [3]. Число растений (товарных экземпляров и побегов) подсчитывали по маршрутному ходу в полосе шириной 2,5 м. Собирали каждый пятый экземпляр, взвешивали, а затем вычисляли средние показатели ($M \pm m$) (листья, стебли и соцветия). Величину эксплуатационного запаса рассчитывали как произведение средней урожайности на общую площадь заросли.

Согласно полученным данным [2], большинство видов *Hypericum* L., произрастающих на территории Армении, в сырье содержит красные гиперичиновые красители, дубильные вещества, тритерпеновые сапонины, гликозид азулен, желтый краситель гиперичин.

В настоящее время дается качественная оценка армянского сырья р. *Hypericum* L. в надземных органах, где авторами выяснено, что у некоторых видов практически гиперичин отсутствует.

Эти исследования продолжаются в совместных фармакологических работах с фирмами Planta Med Arzneimittel (ФРГ) и Neurotech S.A. (Швейцария) с целью выяснения количества гиперичина, который варьирует в собранном воздушно-сухом растительном сырье из различных местопроизрастаний (марзах, флористических районов) Армении.

Результаты и обсуждение. *H. perforatum* L. – зверобой продырявленный – *սրճիկնիկ խոզված* [7, 8]. Растет повсеместно до верхнего пояса и достигает плотности в среднем 1 кг/га.

H. hyssopifolium Chaix - зверобой иссополистный – *սրճիկնիկ զոլաշուկ* [7, 8]. Растет в сухих каменистых местах от нижнего до верхнего горного пояса. Вид менее распространен.

H. scabrum L. – зверобой шероховатый - *սրճիկնիկ անհարթ* [7, 8]. Растет в нижнем и верхнем горных поясах на сухих каменистых местах.

H. helianthemoides (Spach) Boiss - зверобой атропатенский – *սրճիկնիկ անրշուշանիկ* [7, 8]. Растет на сухих местах в нижнем горном поясе.

H. alpestre subsp. *polygonifolium* (Rupr.) v. *avet* - зверобой альпийский – *սրճիկնիկ անշիշանիկ* [7, 8]. Растет в верхней горной зоне, заходя в альпийскую.

Хотелось бы отметить, что на изучаемой территории три вида (см. табл. 3-5) не могут служить лекарственным растительным сырьем из-за редкой встречаемости, своих габаритов, но самое главное из-за самосохранения генофонда.

Согласно табл. 1, вид нами обнаружен в 38 пунктах следующих флористических районов: Апаранском-1, Ереванском-7, Зангезурском-3, Иджеванском-1, Лорийском-10, Мегринском-2, Севанском-14. Места произрастания по марзам обнаружены в вышеуказанных флористических районах, а именно в Арагацотне-2 пункта, в Арарате-4, в Вайке-1, в Гегаркунике-12, в Котайке-4, в Лори-10, в Сюнике-4 и в Тавуше-1. Таким образом установлено, что в восьми марзах нами обнаружен зверобой продырявленный в 38 указанных пунктах.

Согласно табл. 2, вид нами найден в 22 пунктах следующих флористических районов: Апаранском-1, Ереванском-6, Иджеванском-1, Мегринском-2, Севанском-12, Вайодзорском-1, Гегамском-1.

Распределение по марзам следующее: Арагацотн-1, Арарат-3, Гегаркуник-12, Котайк-5, Тавуш-1. Отметим, что пункт - Урцадзор-Ехегнадзор, в котором произрастал зверобой иссополистный, обнаружен на стыке двух марзов и двух флористических районов.

Таблица 1. Определение запасов воздушно-сухого сырья вида
H. perforatum L. в Армении

Дата	Местопроизрастание			Обследо- ванная площадь, га	Масса воз- душно- сухого сырья, кг/га
	М а р з	Ближайший населенный пункт	Флористический район		
13.06	Арагацотн	Цахкеванк	Апаранский	2	2,0
18.07	Арарат	Ерасх Боз- Бурун	Ереванский	10	0,1
18.07	Арарат	Кярки	Ереванский	6	3,0
18.07	Котайк	Аван-Джрвеж	Ереванский	2	0,4
18.07	Котайк	Джрвеж- Шорбулаг	Ереванский	8	0,1
18.07	Котайк	Джрвеж- кладбище	Ереванский	0,5	0,5
9.07	Арарат	Урцадзор	Ереванский	10,0	1,0
9.07	Арарат	Урцадзор- Ехегнадзор	Ереванский	2,0	0,4
9.07	Сюник	Горис-Капан	Зангезурский	3,0	3,0
9.07	Сюник	Горис-Капан	Зангезурский	5,0	9,0
5.09	Вайк	Сараван	Зангезурский	5,0	68,0
20.09	Тавуш	Окр. с. Кармир	Иджеванский	4,0	11,0
7.08	Лори	Ванадзор- Туманян	Лорийский	1	0,1
7.08	Лори	Туманян - Алаверди	Лорийский	2	1,0
7.08	Лори	Алаверди- Одзун	Лорийский	1	0,5
8.08	Лори	Лалвар	Лорийский	4	2,0
8.08	Лори	Окр. Одзуна	Лорийский	5	2,5
8.08	Лори	Шамлуг	Лорийский	4	4,0
9.08	Лори	Ахтала	Лорийский	2	1,0
9.08	Лори	Дзорагет-Лорут	Лорийский	1	0,3
9.08	Лори	Озеро Атан	Лорийский	5,0	5,0
9.08	Лори	Дсех	Лорийский	0,5	0,1
4.07	Сюник	Капан-Мегри	Мегринский	3,0	4,5
9.07	Сюник	Мегри- Шванидзор	Мегринский	0,5	2,5
06.09	Гегаркуник	Севан	Севанский	0,5	0,05
06.09	Гегаркуник	Севан-Ахтамар	Севанский	3,0	0,13
06.09	Гегаркуник	“Ласточка”	Севанский	2,0	4,5
06.09	Гегаркуник	Шоржа	Севанский	2,0	1,0
06.09	Гегаркуник	Артаниш- Джил	Севанский	2,0	0,4
06.09	Гегаркуник	Джил- Бабаджан	Севанский	4,0	0,2
20.09	Гегаркуник	Лчашен- Чкаловка	Севанский	4,0	2,0
20.09	Гегаркуник	Чкаловка- Норашен	Севанский	1,0	6,0
20.09	Гегаркуник	Айриванк	Севанский	4,0	0,6
27.06	Гегаркуник	Севан-Ахтамар	Севанский	5	7,0
27.06	Гегаркуник	“Голубой Севан”	Севанский	6	30,0
27.06	Гегаркуник	Ахтамар-Севан	Севанский	2	8,0
27.06	Котайк	Фонтан	Севанский	3	1,5
18.07	Талин	Арег	Севанский	1	0,1

Таблица 2. Определение запасов воздушно-сухого сырья вида *H. hyssopifolium* Chaix, кг/га

Дата	Местопроизрастание			Обследованная площадь, га	Масса воздушно-сухого сырья, кг/га
1998	М а р з	Ближайший населенный пункт	Флористический район		
13.06	Арагацотн	Егвард-Цахкеванк	Апаранский	2	2,0
13.06	Котайк	Гегард	Гегамский	1	0,01
16.04	Котайк	Джрвеж-Вохчаберд	Ереванский	16	0,01
21.06	Котайк	Егвард-Нор-Гаджн	Ереванский	4	4,0
18.07	Котайк	Джрвеж-Шорбулаг	Ереванский	8	16,0
18.07	Арагат	Кярки	Ереванский	6	6,0
9.07	Арагат	Урцадзор	Ереванский	10	2,0
9.07	Арагат	Урцадзор-Ехегнадзор	Ереванский Вайоцдзорский	2	0,6
20.09	Тавуш	Окр. с. Кармир	Иджеванский	4	3,0
27.06	Гегаркуник	Севан-Ахтамар	Севанский	5	15,0
27.06	Гегаркуник	“Голубой Севан”	Севанский	6	12,0
27.06	Гегаркуник	Ахтамар-Севан	Севанский	2	6,0
16.09	Гегаркуник	Севан-Ахтамар	Севанский	0,5	1,5
16.09	Гегаркуник	Ласточка	Севанский	3	1,0
16.09	Гегаркуник	Шоржа	Севанский	2	1,0
16.09	Гегаркуник	Артаниш-Джил	Севанский	2	1,0
16.09	Гегаркуник	Джил-Бабаджан	Севанский	2	0,1
20.09	Гегаркуник	Чкаловка-Норашен	Севанский	4	2,0
9.07	Гегаркуник	Айриванк	Севанский	1	0,3
9.07	Котайк	Фонтан	Севанский	3	6,0

Таблица 3. Определение запасов воздушно-сухого сырья вида *H. scabrum* L., кг/га

Дата	Местопроизрастание			Обследованная площадь, га	Масса воздушно-сухого сырья, кг/га
1998	М а р з	Ближайший населенный пункт	Флористический район		
13.06	Котайк	Цахкеванк-Егвард	Ереванский	2	3
18.07	Арагат	Ерасх	Ереванский	10	0,2
18.07	Арагат	Кярки	Ереванский	6	0,9
18.07	Котайк	Джрвеж-Шорбулаг	Ереванский	8	0,8
9.07	Арагат	Урцадзор	Ереванский	10	0,1

В Ереванском флористическом районе нами обнаружен зверобой шероховатый в двух марзах (Арагат-3) и (Котайк-2), итого обнаружено пять мест произрастания, у которых масса воздушно-сухого сырья собрана в небольших количествах, поэтому этот вид не может быть рекомендован для сбора сырья и применения в народном хозяйстве или же медицинской промышленности.

Таблица 4. Определение запасов воздушно-сухого сырья вида *H. helianthemoides* (Spach) Boiss, кг/га

Дата	Местопроизрастание			Обследованная площадь, га	Масса воздушно-сухого сырья, кг/га
	М а р з	Ближайший населенный пункт	Флористический район		
1998	Арагат	Ерасх	Ереванский	10	0,2
18.07	Арагат	Ерасх Боз-Бурун	Ереванский	10	0,05

Рассматривая табл. 4, можно отметить, что в Арагатском марзе Ереванского флористического района обнаружены всего три популяции. Считаем, что данные популяции необходимо сохранить для генофонда.

Таблица 5. Определение запасов воздушно-сухого сырья вида *H. alpestre* Stev. ssp *polygonifolium* (Rupr.) v. avet, кг/га

Дата	Местопроизрастание			Обследованная площадь, га	Масса воздушно-сухого сырья, кг/га
	М а р з	Ближайший населенный пункт	Флористический район		
1998	Арагат	Азатское водохранилище	Ереванский	15	0,09
21.06	Арагат	Ахтамар-Севан	Севанский	2	1,0
18.07	Арагат	“Голубой Севан”	Севанский	6	6,0

Из табл. 5 видно, что зверобой альпийский в изученных пунктах встречается редко, поэтому для сохранения генофонда не может быть рекомендован для сбора на сырье.

Отметим, что сырье необходимо заготавливать во время бутонизации или начала цветения растений, срезая надземную часть длиной 25-30 см.

Сушить собранное сырье нужно только в закрытых от солнца, хорошо проветриваемых помещениях или же в сушилках при температуре 35-40°.

По ГОСТ-у сырье должно состоять из верхних частей стеблей с листьями, бутонами и цветками, а также частично с незрелыми плодами. Цвет стеблей с листьями серовато-зеленый, а лепестков – ярко-желтый с черными точками. Запах слабый, своеобразный, вкус горьковатый, слегка вяжущий. В сырье допускается содержание, %: влаги не более 13, золы общей – 8, стеблевых частей – 50 г, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, 2 мм, – 10, органических примесей и минеральных по 1. Экстрактивных веществ, извлекаемых 40%-ным раствором этилового спирта, должно быть не менее 25%. Готовое воздушно-сухое сырье упаковывают в мешки и хранят в сухих помещениях на стеллажах. Срок хранения – 3 года.

Применяется в медицинской, парфюмерной, ликеро-водочной и консервной промышленности.

Таким образом, в Гегаркуникском марзе Севанского флористического района, по маршруту Гагарин-Севан, который расположен в горно-степном поясе с умеренным теплым летом, где среднегодовое количество осадков 400-600 мм, на изучаемой территории в 6 га запасы составляли 30 кг сухой массы.

На этой же территории по маршруту Лчашен-Чкаловка-Норашен-Айриванк-с.Кармир (Тавушский марз, Иджеванского района) в 4 га запасы составили 11 кг.

В Сюникском марзе Зангезурского флористического района виды зверобоя обнаружены в горно-степном поясе с умеренно теплым влажным климатом, где среднегодовое количество осадков 600-700 мм. Запасы в этом регионе по маршруту Горис-Сараван на территории в 5 га составляли 68 кг.

В среднем плотность у вида *H. perforatum* L. составляет 1 кг/га (см. табл. 1).

H. perforatum L. в Армении растет на территории 188 га.

Вид зверобоя продырявленного в среднем достигает плотности 1 кг/га, то есть общий запас в Армении составляет 1000 т. Зверобой достигает полной зрелости к 10 годам, тогда его эксплуатационный запас составляет 100 т.

Сбор сырья лишает зверобой семенного возобновления и, чтобы не подорвать популяции на изучаемой территории, следует ограничить заготовки, доводя их сбор до 30 т.

Остальные виды на этой же территории встречаются редко и не могут быть рекомендованы к сбору как лекарственное сырье.

Род *Hypericum* в Армении и его запасы сырья в настоящее время необходимы для разработки рационального использования лекарственного растительного сырья с учетом качества и количества гиперического или отсутствия его у некоторых видов, это необходимо знать для создания препаратов антидепрессивного действия, а также с противовирусной и противоопухолевой активностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусынин И.А. Токсикология ядовитых растений, изд. 4, М., 624 стр., 1962.
2. Золотницкая С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении, 1, 1958., 326 стр., 1965, 2, 372 стр., Ереван, изд. АН АрмССР.
3. Методика определения запасов лекарственных растений, М., 51 стр., 1986.
4. Мусаелян М.С., Чарчоглян А.А. Латино-русско-армянско-английско-немецко-французский словарь названий ядовитых растений, изд-во «ԵՊՀ», Ереван, 183 стр., 2004.
5. Растительные ресурсы СССР, Ленинград, Л., 2, изд. Наука, 336 стр., 1986.
6. Ревазова Л.В., Мусаелян М.С. Латино-русско-армянский словарь названий лекарственных растений, изд. ЕГУ им. М.Гераци, Ереван, 218 стр., 1997.
7. Тахтаджян А.Л., Флора Армении, изд. АН Арм.ССР, Ереван, 5, стр. 9, 1966.
8. Тахтаджян А.Л., Федоров А.А., Флора Еревана, изд. Наука, Л., 344 стр., 1972.
9. Чопик В.И., Дудченко Л.Г., Краскова А.Н. Справочник, Киев, «Наукова думка», 399 стр., 1981.
10. Panossian A., Gabrielyan E., Manwelian V., Jurcic K., Wagner H. Phytomedicine 2, p. 309-317, 2, 1996.

Поступила 17.10.2007



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 598.3/-15

БИОЛОГИЯ ГНЕЗДОВАНИЯ МАЛОЙ ВЫПИ *IXOBRYCHUS MINUTUS* (L.) НА РЫБОВОДНЫХ ПРУДАХ АРАРАТСКОЙ РАВНИНЫ

К.А.МЕЛИКЯН

Научный центр зоологии и гидроэкологии НАН РА, Ереван

Изучены сезонная динамика численности, сроки пребывания, образования пар, гнездостроения, питание взрослых птиц и птенцов, а также особенности повторного гнездования малой выпи *Ixobrychus minutus* (L., 1766). Выявлен инкубационный период, биоритм насиживания. Установлены сроки откладки яиц и вылупления, биоритм кормления, а также изменения массы новорожденных и подрастающих птенцов. Дано описание поведения взрослых птиц и их птенцов. Вычислен процент естественного отхода яиц и птенцов. В результате биометрических измерений получены данные по промерам гнезд и яиц.

Ուսումնասիրվել է փոքր ջրցուլի *Ixobrychus minutus* (L., 1766) թվաքանակի սեզոնային դինամիկան, կենման, բազմացման ժամկետները, հասուն անհատների և ձագերի սնունդը, ինչպես նաև կրկնակի բնադրման առանձնահատկությունները: Բացահայտված է թխսակալման ժամանակաշրջանը և կենսառիթմը: Պարզվել են ձվեր ածելու և ձագերի ծնվելու ժամկետները, նորածինների և դեռահաս ձագերի քաշի փոփոխությունը դրանց զարգացման և աճման շրջանում, ձագերի կերակրման հաճախականությունը: Նկարագրված է հասուն անհատների և ձագերի վարքագիծը: Հաշվարկված է ձվերի և ձագերի բնական կորուստի քանակը: Չափագրումների արդյունքում ստացվել են բների և ձվերի կենսաչափական տվյալներ:

The season movement of numbers, the times of sojourn, pair formation, nest building, the times of the laying of eggs, the times and rhythm of incubation and also specifics of the second nesting of little bittern *Ixobrychus minutus* (L., 1766) have been studied. Hatching chicks, and also weight of the chicks and fledglings in the developing period have been observed. Had been established feeding of the adult birds, chicks and fledglings, the rhythm of diet of the chicks. The behavior of the adult birds and chicks have been described. Had been counted also the percent of the natural die of the eggs and chicks. The dates of eggs, nests were based on the biometrics measurements.

Малая выпь - биология - рыболовные хозяйства

В Армении малая выпь *Ixobrychus minutus* (L., 1766) обычная гнездящаяся перелетная птица [9,10,13,14]. Изучение биологии этого вида, в частности биоритмологии, является актуальным. Накопленный материал может быть

применен при оценке хозяйственного значения и выяснения биоценологической роли малой выпи в искусственных биоценозах.

Материал и методика. Работа проводилась в 1989-1992 гг. на территории Армашского рыбоводного хозяйства, состоящего из 21 нагульного и 8 выростных прудов с общей площадью водного зеркала 1515 га. Материалом для настоящей работы послужили данные учета численности, содержимого пищевых остатков желудков взрослых птиц и кормовых проб, изъятых у птенцов, промеры яиц, гнезд и данные о биоритмологии.

Учеты численности вели двукратно по методу Лаптева и Теплова [7,12] в течение одного месяца. Маршрут проходил между двумя рядами нагульных прудов. Длина полосы учетов составила 8 км, ширина-700 м.

За период исследований проанализировано содержимое желудков 7 взрослых птиц и 32 кормовых проб птенцов. Из них у взрослых птиц выявлено 3 кормовых объекта, у птенцов - 8. Обнаружено и промерено 23 гнезда и 76 яиц. Параметры биометрических промеров обработаны по методу вариационной статистики [6,11]. Продолжительность репродуктивного периода вычислена по данным регистраций кладок и степени их насиженности. По многочасовым наблюдениям в течение 6 дней (19.06.91 г., 21.06.91 г., 22.06.91 г., 23.06.91 г., 3.07.91 г., 4.07.91 г.) нами установлены параметры по режиму насиживания яиц, а в течение одного дня (7.08.91г.) – по режиму кормления птенцов.

Результаты и обсуждение. На территории рыбоводных прудов Армашского хозяйства в 1989 г. было отмечено 53, в 1990г.-61, а в 1991г.-75 птиц. Приведенные данные свидетельствуют об увеличении численности этой птицы в 1.4 раза, что объясняется благоприятными экологическими факторами. Весной пик численности отмечен в мае, в период массового прилета, летом - в июне, что связано с массовым вылетом лётных птенцов. Число птиц значительно уменьшается в августе, в период осенних миграций (табл. 1).

Таблица 1. Динамика численности *I. minutus* L. на территории Армашского рыбоводного хозяйства

1989 г.											
Весна		Лето			Осень			Зима			
III	IV	V	VI	VII	VII	IX	X	XI	XII	I	II
—	2	18	14	14	5	—	—	—	—	—	—
1990 г.											
Весна		Лето			Осень			Зима			
III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	I	II
—	—	3	8	40	6	4	—	—	—	—	—

Анализ содержимого желудков взрослых птиц, добытых в июле, а также кормовых проб, полученных из 5-11-дневных птенцов, приводится в табл. 2.

Таблица 2. Анализ содержимого желудков взрослых птиц и кормовых проб птенцов *I. minutus* L.

N ПП	Название кормовых объектов	Количество		Встречаемость		Общая масса кормов	
		шт.	%	абс.	%	г	% от общей массы
	Взрослые птицы (n=7)						
1.	Карп-Cyprinus carpio	4	20,0	1	25	3,6	21,7
2.	Остатки рыб (мальки)	5	25,0	1	25	5,8	34,9
3.	Головастики озерной лягушки-Rana ridibunda	3	15,0	1	25	6,0	36,1
4.	Остатки вод. насекомых larv., imago	8	40,0	2	50	1,2	7,2
	Всего	20	100	-	-	16,6	100
	Птенцы (n=32)						
1.	Толстолобик Hypophthalmichthys molitrix	6	6,7	3	9,4	27,0	9,9
2.	Серебряный карась Carassius auratus	29	32,2	12	37,5	106,5	39,2
3.	Полупереваренная рыба - мальки	25	27,8	11	34,4	61,0	22,5
4.	Озерная лягушка Rana ridibunda	3	3,3	3	9,4	14,5	5,3
5.	То же головастики	8	8,9	7	21,9	28,8	10,6
6.	Птенцы Acrocephalus sp.	2	2,2	2	6,2	29,0	10,7
7.	Клопы Hemiptera, imago	2	2,2	1	3,1	0,2	0,07
8.	Жуки Coleoptera, imago	2	2,2	1	3,1	0,3	0,1
9.	Стрекозы, подотр. Zygoptera, imago	2	2,2	2	6,2	0,1	0,04
10.	Стрекозы, подотр. Anisoptera, larv.	3	3,3	3	9,4	3,6	1,3
11.	Остатки вод. насекомых larv., imago	8	8,8	2	6,2	0,5	0,2
	Всего	90	100	-	-	271,5	100

Основу питания малой выпи составляют рыбы, лягушки и насекомые, что свидетельствует о характере ее питания как ихтиоэнтомофага. Отмечены также случаи использования птиц в качестве пищи.

По массе в пище взрослых птиц преобладает молодь рыб, а по количеству - насекомые и лягушки. В пище птенцов как по количеству экземпляров, так и по частоте встречаемости и массе доминировали рыбы. Из них значительную часть составила молодь “сорных” рыб (серебряный карась). По свидетельству Langley [15], на юго-западе Капской провинции в пище птенцов доминировала молодь рыб. Сходные данные получены также нами.

Брачные пары формируются в течение 1-3 недель после весеннего прилета. Первыми появляются самки, самцы прилетают на несколько дней позднее. С образованием пар каждая из них занимает и охраняет гнездовой участок в размере, вероятно, не более 4-10 м в диаметре, который агрессивными нападками хозяева охраняют от соседних пар. Подобный случай был отмечен 19/V 91 г. Наиболее ранним сроком формирования брачных пар, вероятно, следует считать первую половину мая.

Гнездостроение занимает 3-4 дня. Гнезда обычно расположены в зарослях тростника на расстоянии 15-200 м от берега пруда, иногда в небольших куртинках этого растения, произрастающего вдоль прибрежной части прудов.

Малая выпь чаще всего гнездится в одиночку, по соседству с малой поганкой, рыжей цаплей, белоглазым нырком, камышовкой, лысухой, усатой синицей, тростниковой и дроздовидной камышовкой. 30/VI 90 г. гнездо малой выпи было найдено по соседству с гнездом сороки. В одном случае (6/VII 90 г.) зарегистрирована смешанная кладка, состоящая из 4 яиц хозяина и 2 неизвестной утки, вероятно, белоглазого нырка.

Расстояние между гнездами колеблется в пределах от 4 до 8 м, редко 15,0-200 м. Расстояние между гнездами малой выпи и птенцами, гнездящимися по соседству, составило 2,7-8,0 м.

В качестве гнездостроительного материала малая выпь обычно использует сухие, иногда зеленые стебли и листья тростника. Из 23 гнезд, обследованных за 1990-91 гг., 7 (30,4%) располагались на прошлогодних стеблях скошенного тростника, ближе к поверхности воды. Остальные гнезда находились на значительной высоте от воды, среди зеленых стеблей этого растения (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика гнезд *I. minutus* L.

NN	Диаметр гнезда, мм	Диаметр лотка, мм	Глубина лотка, мм	Общая высота, мм	Высота гнезда над водой, мм
1	170 x 150	150 x 150	47	100	65
2	160 x 190	140 x 140	50	155	535
3	170 x 150	120 x 100	50	120	120
4	140 x 130	120 x 110	50	240	290
5	190 x 150	135 x 120	48	120	—
6	150 x 150	130 x 120	45	100	—
7	140 x 130	125 x 125	45	65	270
8	210 x 210	160 x 160	40	90	—
9	200 x 180	150 x 150	45	180	150
10	180 x 170	165 x 160	48	100	—
11	190 x 190	180 x 180	45	200	—
12	180 x 170	140 x 140	45	140	—
13	190 x 180	160 x 140	50	220	130
14	220 x 180	—	55	150	380
15	250 x 200	—	50	110	580
16	290 x 190	—	55	112	215
17	200 x 180	—	30	100	245
18	200 x 180	—	80	155	725
19	250 x 200	—	48	300	500
20	233 x 190	—	35	110	725
21	200 x 200	—	40	100	—
22	260 x 230	—	55	140	235
23	200 x 165	—	45	220	680
М	199 x 177	144 x 138	48	145	365

Откладка яиц начинается обычно с III декады мая и заканчивается в I половине июля. Наиболее ранние кладки, по-видимому, могут иметь место во II декаде мая. За два года наблюдений наибольшее количество яиц отложено в период с 15 июня по 5 июля (табл. 4).

Судя по самым ранним (23-28/V 90 г.) и поздним (14-16/VII 91г.) данным откладки первого яйца, вероятно, имеет место второй цикл репродукции или же повторная кладка взамен потерянной.

Зарегистрирован случай поведения взрослых птиц у гнезда с мертвыми птенцами. 27/VII 91г. в гнезде было 3 погибших и два недавно вылупившихся птенца. 29/VII 91г. в том же гнезде птенцы отсутствовали, однако на этом же гнезде сооружалось новое гнездо. 30/VII 91г оно было почти готово, а 1/VIII 91г. полностью разрушено. Это свидетельствует о том, что после потери первой кладки за короткой срок малая выпь может отложить вторую. Однако в этом случае величина кладки обычно ограничивается в пределах трех яиц. В одном из “двухэтажных гнезд”, где второе гнездо было построено недавно, находились три слабонасиженных яйца.

Таблица 4. Данные о гнездовании *I. minutus* L

NN	Даты		Содержимое гнезда		Расчетные даты откладки яиц	
	находок	проверок	яйца	птенцы	первого	последнего
1	29/05.90	-	1 свежее	-	28.05.90	-
2	29/05.90	-	5 слабо-насиженных	-	23/05.90	27/05.90
3	23/05.90	-	-	4 (1-6-дневных)	28/05.90	31/05.90
4	28/06.90	-	-	4 (1-4-дневных)	06/06.90	08/06.90
5	28/06.90	-	3 сильно-насиженных	2 (1-2-дневных)	06/06.90	10/06.90
6	28/06.90	-	4 свежих	-	23/06.90	26/06.90
7	06/07.90	-	2 свежих	-	05/07.90	06/07.90
8	06/07.90	-	4 насиженных	-	26/07.90	29/07.90
9	06/07.90	-	3 свежих	-	03/07.90	05/07.90
10	06/07.90	-	4 сильно-насиженных	-	22/06.90	25/06.90
	-	13/07.90	2 сильно-насиженных	2 (1-2-дневных)	-	-
11	10/07.90	-	5 слабо-насиженных	-	02/07.90	06/07.90
12	19/05.91	-	пусто		-	-
	-	25/06.91	2 свежих	-	24/05.91	28/05.91
	-	15/06.91	1 наклонутое	4 (1-2-дневных)	-	-
	-	16/06.91	-	вылупился пятый	-	-
13	13/06.91	-	пусто		-	-
	-	15/06.91	3 свежих	-	15/06.91	17/06.91
14	15/06.91	-	5 слабо-насиженных	-	08/06.91	12/06.91
	-	27/06.91	4 наклонутых	-	-	-
	-	30/06.91	-	5 (1-3-дневных)	-	-
15	15/06.91	-	1 свежее	-	15/06.91	-
	-	20/06.91	отложено шестое яйцо	-	-	20/06.91
	-	09/07.91	-	6 (1-4-дневных)	-	-
16	18/06.91	-	6 слабо-насиженных	-	09/06.91	14/06.91
	-	30/06.91	2 наклонутых	4 (1-2-дневных)	-	-
	-	02/07.91	-	6 (1-4-дневных)	-	-
17	02/07.91	-	7 слабо-насиженных	-	22/06.91	28/06.91
	-	15/07.91	Седьмое наклонутое	6 (1-4-дневных)	-	-
18	05/07.91	-	1 свежее	-	05/07.91	08/07.91
	-	13/07.91	3 слабо-насиженных	-	-	-
19	07/07.91	-	5 сильно-насиженных	-	21/06.91	25/06.91
20	07/07.91	-	5 свежих	-	03/07.91	07/07.91
	-	24/07.91	-	3 однодневных	-	-
	-	25/07.91	-	вылупился четвертый	-	-
	-	27/07.91	-	вылупился пятый	-	-
21	14.07.91	-	3 слабо-насиженных	-	07.07.91	09.07.91
22	26.07.91	-	3 насиженных	-	14.07.91	09.07.91
	-	03.08.91	-	2 однодневных	-	-

Количество яиц в полной кладке колеблется в пределах 4-9 [3,4,8], по другим данным от 4-х до 7-и [2,5]. На территории Армашского стационара полные кладки содержали 3-6, чаще 5 яиц. В одном гнезде (2/VII 91 г.) было отмечено 7 яиц. Среднее число яиц в кладке составило 4,5. Масса и размеры яиц, характеризующие разные кладки, приведены в табл. 5.

Таблица 5. Масса и размеры яиц *I. minutus* L. в разных кладках

N n/n	Число яиц в клад- ке, шт.	Масса яиц, г		Длина яиц, мм		Ширина яиц, мм		Масса каждой кладки, г
		lim	M	lim	M	lim	M	
1	4	11,3-12,2	11,7	31,0-37,0	34,7	26,0-28,0	26,9	46,8
2	4	11,6-12,5	12,06	36,0-38,0	37,1	26,0-27,0	26,7	48,25
3	4	10,0-11,1	10,6	31,0-33,5	32,3	26,5-26,5	26,1	42,5
4	3	11,1-12,62	12,1	31,0-37,5	34,7	26,5-28,0	27,3	36,35
5	5	9,6-10,55	9,9	32,0-34,5	33,5	21,0-27,0	24,2	48,99
6	5	7,4-12,3	10,7	31,0-38,0	35,6	24,0-27,0	25,8	53,6
7	6	10,0-11,45	10,7	31,0-32,5	31,7	25,0-26,0	25,6	64,3
8	3	9,4-10,1	9,8	32,0-33,5	32,8	24,0-25,0	24,3	29,3
9	6	11,7-13,3	12,4	29,0-35,0	32,3	21,0-26,0	25,0	74,2
10	5	10,7-11,3	11,8	32,0-34,0	33,0	26,0-27,0	26,4	55,4
11	5	10,0-12,1	10,7	31,0-33,0	32,2	24,0-26,0	25,2	53,5
12	7	10,9-11,7	11,3	29,0-35,0	32,4	26,0-27,0	26,6	79,4
13	3	11,0-13,6	12,06	33,0-38,0	35,3	25,0-26,0	25,5	36,2
14	5	9,8-11,0	10,3	29,0-33,0	31,2	25,0-26,0	25,4	51,5
15	3	12,0-12,4	12,1	34,0-36,0	34,7	26,0-26,5	26,2	36,5
16	5	10,2-10,3	10,2	33,0-35,0	33,5	26,0-26,5	26,2	51,1
17	8	10,0-11,62	10,7	34,0-35,0	34,3	25,0-26,0	25,3	32,06

Размеры яиц, мм ($n=76$) 21,0-28,0 ($M=25,8\pm 0,14$); масса, г: ($n=76$) 7,4-13,6 ($M=11,05\pm 0,12$).

Средняя масса одной кладки ($n=17$) 49,4 г.

По нашим наблюдениям, откладка яиц происходит в утренние и ночные часы. В одном из гнезд очередное яйцо было отложено примерно в 22:00, в другом гнезде 11:15, интервал между откладкой яиц составляет 34-38 ч. К инкубации яиц птицы приступают обычно после откладки третьего яйца. В кладках, состоящих из трех яиц, птица насиживает со второго яйца. В насиживании кладки участвуют оба пола.

В процессе насиживания хозяева временами занимаются обновлением гнезда или поправкой гнездового материала. При необходимости из гнезда выбрасываются неудачно лежащие стебли и листья тростника. Гнезда тщательно охраняются от других пар своего вида. Продолжительность насиживания яиц составляет 18-19 дней.

На гнезде насиживающая кладку птица периодически привстает над кладкой, занимается чисткой оперения, переворачиванием яиц и изменением их расположения, иногда питается, хватая клювом мелких насекомых с листьев и стеблей тростника. Птицы на гнезде периодически сменяют друг друга. Смена партнеров при их встрече сопровождается ритуалом приветствия. Иногда птицы не встречаются друг с другом на гнезде, в этом случае насиживающая птица по истечении времени уходит, а ее партнер спустя 2-3 мин возвращается в гнездо, продолжая процесс насиживания. Иногда сразу после встречи друг с другом на гнезде самка и самец по неизвестной причине могут вновь оставить гнездо в течение 30 мин без присмотра.

19/VII 1991г. за время наблюдений с 7:30 по 20:45, что составило 13 ч 15 мин, смена партнеров на гнезде произошла однократно (7:30 самку сменил самец). Самка насиживала кладку один раз, в течение одной минуты, самец- с перерывами от 2 до 11 мин, 26 раз в течение 10 ч 52 мин 21/ VI-91г. и 22/VI-91г. с 6:00 кладку насиживала самка, 23/VI-91г. 7:30-10:32 – самец. Смена партнеров 22/VI-91г. отмечалась 4 раза, 9:50; 10:00; 16:28-16:30 и 16:53. Перерыв между первой и второй сменой партнеров составил 9 мин (9:51-10:00). Во второй половине дня период наблюдений составил 4 ч 43 мин, с 13:30 по 18:13 самка насиживала кладку 6 раз в течение 4 ч 5 мин, с перерывами от 1 до 2 мин, самец- один раз 22 мин 30 с с перерывами 1 мин 23/VI-91г. с 7:30 по 10:32 , что составило 3 ч 2 мин, кладку с перерывами от 2 до 6,5 мин пятикратно насиживал только самец.

3/VII-91г. с 7:30 по 19:19 время наблюдений составило 11 ч 50 мин. За это время смена партнеров произошла двукратно 8:49-8:50 и 14:03-14:05. Наименьшую часть времени 4 ч 23 мин с 8:50 по 14:03 с перерывами от 2 до 9 мин кладку 12 раз насиживала самка. Самец насиживал 12 раз в течение 5 ч 26 мин с перерывами от 1 мин до 47 мин 30 с. Минимальный период насиживания составил 1 мин, максимальный 59 мин 45 сек. 4/VII 91г. с 8:30 по 17:40, что составило 9 ч 10 мин, кладку в течение 7 ч 56 мин 25 раз с перерывами от 1 до 9 мин насиживала только самка.

Наибольший период насиживания составил 2ч 17мин, наименьший - 1 мин. Многочисленными наблюдениями было установлено, что интервал вылупления птенцов обычно колеблется в пределах от 19 до 38 ч, в среднем - 27, 8 ч. В кладках, состоящих из 6 яиц, интервал вылупления между птенцами (первым и третьим) колеблется в пределах 2-7 ч, в среднем - 4,5 ч.

По данным, представленным в табл. 4, можно заключить, что наиболее раннее вылупление птенцов имеет место во II декаде июня, позднее - в первых числах августа; массовое вылупление происходит в период с 20 июня по 25 июля. Вылет птенцов из гнезда прослеживается со II декады июня до III декады августа. В целом репродуктивный цикл занимает 4 месяца (с мая до III декады августа).

Масса недавно вылупившегося птенца (n=8) 7,6-9,0 г, в среднем 8,1 г, однодневного (n=4) 13,4-17,6 г, в среднем 15,2 г, 4-5-дневного (n=5) 43,0-48,9 г, в среднем 45,6 г. Масса одного 15-дневного птенца равнялась 90,0 г.

В первые 5 дней птенцы в гнезде сидят почти неподвижно. Сверху видны только их спины, головы, а ноги упрятаны под грудь и брюхо. Птицы покрыты пухом средней густоты соломенно-оранжевого цвета, удачно имитирующего цвет подстилки гнезда. В этот период птенцы в лотке гнезда располагаются настолько густо, что оставляют впечатление комка пуха, нередко подбирая под себя яйца, из которых должны вылупиться очередные птенцы. Демонстрируя угрожающую позу, птенцы проявляют реакцию опасения на 3-4 день жизни, раскрывая клюв с сильно раздвинутыми углами уздечки. Шестидневные птицы становятся значительно подвижными и агрессивными по отношению к внешним факторам беспокойства, нередко ударяя клювом по рукам наблюдателя. Защитная реакция птенца заключается как в затаивании в лотке, так и в его уходе за пределы гнезда. В тревожной ситуации вышедший из гнезда птенец отдалается на довольно большое расстояние, карабкаясь по стеблям тростника. В возрасте 15-16 дней птенцы свободно лазают по стеблям тростника, однако передвижение птенцов в этом возрасте ограничивается пределами гнездовой территории. Птенцы становятся вполне самостоятельными к двадцатому дню жизни.

Нами установлены существенные различия защитного поведения между самцом и самкой, охраняющих кладку или птенцов. Встревоженный самец начинает насиживать кладку спустя 7 мин после первой тревоги. Успокоившись, выпь осторожно спускается по тростнику к гнезду, несколько раз вытягивает шею, дергает головой, может принять позу угрозы; чуя безопасность - успокаивается. В случае нарастающей опасности самец оставляет гнездо, затаившись в зарослях тростника на расстоянии 1.5 м. Стараясь привлечь на себя внимание объекта опасности, самец, широко расставляя ноги, хватается за стебли тростника, делает

качающиеся движения телом, издавая периодически тревожные крики. В критический момент возбужденная птица старается наносить удар клювом, незаметно приближаясь к объекту беспокойства.

В период насиживания и обогрева птенцов самка ведет себя значительно доверчивей. Она хорошо маскируется, так как ее окраска имитирует цвет тростника. Настороженная птица вытягивает шею, внимательно следит за каждым движением объекта опасности. В этой позе с раскрытым клювом она временами демонстрирует ярко-оранжевую ротовую полость, часто раздувая шею, издает громкие тревожные крики, одновременно готовясь нанести удар по объекту беспокойства клювом.

Нередко самка становится настолько доверчивой, что привыкает к присутствию человека у гнезда. Более того, в некоторых случаях её не тревожит даже поглаживание по спинке. В ночное время самка и самец охраняют гнездо совместно. Ночью насиживающие птицы подпускают наблюдателя на близкое расстояние. Птенцов кормят обе птицы. В течение 9 ч наблюдений (с 8:19 по 17:30) самка кормила птенцов шесть раз, а самец-два. С появлением самца или самки на гнезде птенцы активно пищат, принимая позу выпрашивания корма. Обычно кормящая птица наклоняет голову к птенцам, наиболее активный из них цепляется за основание клюва, птенец водит свой клюв по всей длине подклювья кормящей птицы, что вызывает у нее реакцию отрывивания пищи. Пищевой комок постепенно скользит к кончику клюва, птенец достает пищу и глотает. Первыми корм берут старшие по возрасту птенцы, а затем младшие, остатки корма съедает взрослая птица. Во время кормления встревоженная птица отрывивает пищу в лоток гнезда. В этом случае птенцы часть корма склевывают самостоятельно из лотка гнезда. Иногда взрослая птица отказывается кормить птенцов, выпрашивающих у нее пищу. Такое поведение наиболее характерно для самца, что, вероятно, обусловлено настороженным состоянием птицы. В течение 9 ч наблюдений птенцы выпрашивали корм у самца 4 раза, хотя за это время он прилетал в гнездо многократно.

Из 75 отложенных яиц эмбриональная и постэмбриональная смертность составила 42,7%, среднее количество слетков на одну кладку равнялось 2,7. В 15 гнездах, находившихся под наблюдением, вылупление птенцов составило 100% от количества отложенных яиц. Отход яиц имел место при потере кладок по разным причинам, в частности, в брошенных и перевернутых ветром гнездах. По этим же причинам значительные потери наблюдались среди гнездовых птенцов.

Гибель птенцов составила в 1990 г.-40,9%, в 1991г.-20,4%. Яйца и птенцы малой выпи могут стать жертвой хищничества птиц (камышовый лунь, сорока, ворона), мелких млекопитающих (водяная полевка – *Arodemus terrestris* L.). Интересно отметить случай находки гнезда малой выпи 27/VII 91г. с остатками туловища двух недавно загрызанных птенцов 2-3-дневного возраста.

Автор выражает большую благодарность доктору биологических наук М.С. Адамяну за ценные советы при работе над статьей.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Даль С.К.* В кн.: Позвоночные животные, Ереван, Изд. АН Арм. ССР, 1, 413, 1954.
2. *Дарангиев А., Нанкинов Д., Хаджиев С.* //Науч. Тр. Пловдив. Ин-т. биол.- 22, 1. –с. 179-188, 1984.
3. *Дементьев Г.П. и др.* Птицы Советского Союза, 2. М., Советская наука. стр. 480, 1951.
4. *Долгушин И.А.* Птицы Казахстана, I.Изд. Академии наук Казахской ССР.Алма-Ата.- I.-с.1-113, 1960.
5. *Емтыль М.Х., Иваненко А.М.* К биологии размножения малой выпи (*Ixobrychus minutus* L., 1766) в Краснодарском крае. Фауна и экология некоторых видов беспозвоночных и позвоночных животных Предкавказья. Кубан. гос. ун-т. Краснодар.- с.78-80, 1990.
6. *Лакин Г.Ф.* Биометрия. М., Высш.шк., 1990.
7. *Лаптев М.К.* //Тр. Средне-Азиатского гос. ун-та, серия VIII, Зоол., вып II.-Ташкент, 352. с, 1930.
8. *Ломадзе Н.Х.* Автореф. канд. дисс. Ростов на Дону, 32 с., 1973.
9. *Ляйстер А.Ф., Соснин Г.В.* Материалы по орнитофауне Армянской ССР (*Ornis Armenia*). АН СССР. Ар. филиал биолог. ин-та. Ереван, 402 , 1942.
10. *Меликян К.А.* Автореф. канд. дисс., Ереван, 22 с., 1996.
11. *Плохинский Н.А.* Математические методы в биологии. М., Изд. МГУ. 265 с., 1978.
12. *Теплов В.П.* Методы учета численности и географического распределения наземных животных. М.,Изд. АН СССР. 1952.
13. *Adamian.M.S., Daniel Klem. Jr. A.*Field Guide to Birds of Armenia. American Univ.of Armenia, an affiliate of the Univ. of California, 223 p., 1997.
14. *Adamian.M.S., Daniel Klem. Jr.* Handbook of the Birds of Armenia. American Univ.of Armenia, an affiliate of the Univ. of California, 649 p., 1999.

Поступила 24.10.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 591.1.05

СОСТАВ ДИАЛИЗАТОВ ГОМОГЕНАТА ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА РОСТ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA GUILLIERMONDII* НП-4

А.Х. АГАДЖАНИЯН, С.В. ЧУБАРИАН, Л.Р. ТУМАНИАН,
А.А. АГАДЖАНИЯН, М.С. МАРТИРОСЯН, М.М. АРШАКЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии

Установлено стимулирующее влияние диализата гомогената проростков пшеницы и его остатка на рост дрожжей, причем термическая обработка не снижала стимулирующего влияния диализатного остатка. Анализ содержания кристаллических фаз диализатов гомогената (полученных ступенчатым диализом) показал, что они содержат бутиленэфир, 1-пролинамин и N-метилпролин (гигриновая кислота), являющийся продуктом расщепления гигрина, кукусгигрина и никотина.

Հաստատվել է ցորենի ծիլերի հոմոգենատի դիալիզատի և դիալիզատային մնացորդի խթանիչ ազդեցություն խմորասնկերի աճի վրա, ընդ որում պարզվել է, որ ջերմային մշակումը չի նվազեցնում մնացորդի խթանիչ ազդեցությունը:

Գատարվել է նաև աստիճանական դիալիզի ճանապարհով ստացված դիալիզատային տարբերակների բյուրեղային ֆազերի կառուցվածքային բաղադրամասերի ուսումնասիրություն: Պարզվել է, որ նրանք պարունակում են 1-պրոլինամին, N-մեթիլպրոլին, բուտիլէնէթեր: Ընդ որում N-մեթիլ-պրոլինը /գիգրինաթթու/ համարվում է գիգրինի, կուկսգիգրինի և նիկոտինի ճեղքման արդյունք:

It is established the influence of dialyzate and its remnant of homogenat buds of wheat on growth of yeasts. The thermal treatment of dialyzate don't increase the stimulation of yeast growth. The crystals of dialyzates contents 1-prolineamin, N-methylproline, butilenether. N-methylproline it is the product of splitting of gigrin, kuksgigrin and nikotin.

Пролин - диализат - биомасса - дрожжи

В медицине используются различные виды лекарственных растений, лечебные свойства которых связаны с наличием биологически активных веществ, оказывающих то или иное физиологическое влияние на организм человека, имеющих разнообразный состав и содержащих химические вещества, принадлежащие к различным классам.

В качестве показателя накопления биомассы дрожжей можно использовать количество свободного пролина, который, образуясь в клетках, используется в синтетических реакциях. Проллин является высококалорийным субстратом [1,4], акцептором и донором водорода [5], физико-химическим медиатором в метаболических процессах.

Целью настоящей работы является изучение влияния диализата гомогената проростков пшеницы и его остатков на накопление биомассы дрожжей *Candida guilliermondii* HN-4.

Материал и методика. Объектом исследования служили дрожжи *Candida guilliermondii* HN-4. Подготовку посевного материала дрожжей осуществляли по следующей схеме: музейная культура, двухсуточная культура на 2%-ном суслоагаре, культура, выращенная в жидкой синтетической среде. Состав жидкой питательной синтетической среды, г: глюкоза-10, KH_2PO_4 -1.23, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0.625, NaCl - 0,125, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -3.12, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -0.125 на 1 л водопроводной воды. Среду распределяли по 100 мл в литровые конические колбы и подвергали стерилизации под давлением 0,5 атм. в течение 20 мин. К стерильной среде добавляли стерильный раствор биотина в расчете 0.8 мг на каждые 100 мл. Инкубирование проводили в течение 20-22 ч при 30-32° и интенсивном взбалтывании. Подготовленную к опыту культуру центрифугировали, промывали, суспензировали в воде (12 мл). 1 мл суспензии доводили водой до 50 мл и нефелометрировали. Исходя из показаний ФЭК-а, по стандартной кривой определяли количество дрожжей. Сухой вес затем уточняли взвешиванием. Проллин определяли методом Блюменкратца [3].

Результаты и обсуждение. Как известно, экстракт проростков пшеницы стимулирует активность некоторых ферментативных реакций. В последние годы в нашей лаборатории было выявлено, что экстракт 7-дневных проростков пшеницы стимулирует рост дрожжей, увеличивая их биомассу в 2,0-2,5 раза.

Для выяснения природы веществ, стимулирующих рост дрожжей (высокомолекулярные или низкомолекулярные), гомогенаты проростков пшеницы были подвергнуты диализу (20 ч). На рис.1 представлены результаты исследований влияния диализата (диализный буфер) и его остатка (содержание диализного мешка) на рост дрожжевых клеток.

Из рис. 1 видно, что гомогенат стимулирует рост дрожжей. Что касается диализата и его остатков, то они оказывают одинаковое влияние, причем после кипячения стимулирующее влияние диализатного остатка не снижается.

Чтобы проверить наличие аминокислот в составе веществ, стимулирующих рост дрожжей, мы подвергли гомогенат (29 мл) ступенчатому диализу в трис-НСI буфере, pH – 7,4. В течение 4 ч буфер менялся ежечасно, после чего гомогенат был оставлен в буфере до утра. Варианты диализатов условно обозначили следующим образом, час диализа: I; II; III; IV; V- диализ до утра.

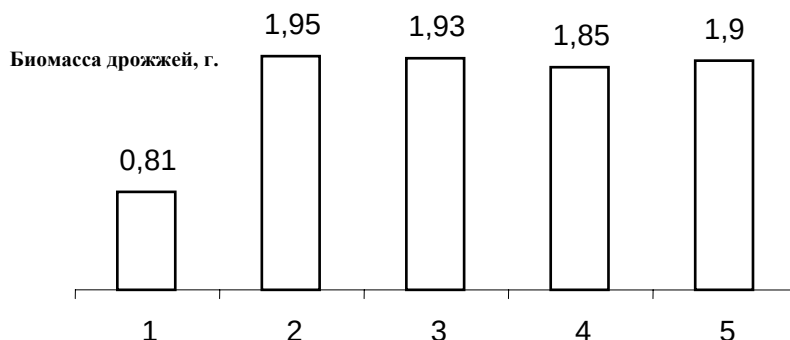


Рис. 1. Влияние гомогената проростков пшеницы, диализата и его остатка на накопление биомассы дрожжей. 1. Контроль. 2. Гомогенат. 3. Диализат. 4. Остаток диализата. 5. Прокипяченный остаток диализата.

Для сгущения гомогенаты всех вариантов были подвергнуты выпариванию в фарфоровых чашках. Сгущенные диализаты ($\approx 1,5$ мл) были перенесены в пробирки с 95%-ным этанолом (конечный объем 3 мл). По перенесении в пробирки во всех вариантах наблюдалось кристаллообразование: содержимое разделилось на 2 фазы - кристаллическую и жидкую. Последний вариант диализата (V) при сгущении осмолался, а кристаллы образовывались сразу и в большом количестве.

Нам не удалось определить аминокислотный состав диализатов, поскольку при нанесении проб жидкой фазы на хроматографическую бумагу образовались кристаллы, которые препятствовали току растворителя.

В жидкой фазе диализатов было определено содержание свободного пролина. Данные приведены в табл. 1.

Таблица 1. Содержание свободного пролина в жидкой фазе диализатов, мкг про/г ($n=6$)

Количество пролина по вариантам, мкг				
I	II	III	IV	V
0.85 ± 0.07	0.72 ± 0.06	0.55 ± 0.05	0	0

Согласно данным табл. 1, в ходе диализа содержание пролина постепенно снижается. Через 3 ч в диализатах наблюдается полное отсутствие пролина. В кристаллической фазе I, II и III вариантов, жидкая фаза которых содержала свободный пролин, газовой хроматографией обнаружили 1-пролинамин, N-метилпролин и другие соединения. N-метилпролин, называемый гириновой кислотой, является продуктом

расщепления таких алкалоидов, как гигрин, куксигрин и никотин [2]. В следующей серии экспериментов мы изучали влияние кристаллов жидких фаз и стуженных диализатов гомогенатов проростков пшеницы на накопление биомассы дрожжей (табл.2).

Таблица 2. Влияние кристаллов и жидких фаз стуженных диализатов гомогенатов проростков пшеницы на накопление биомассы дрожжей, г и содержание свободного пролина, мкг про/г (n=6)

Вариант диализата	Кристаллы		Жидкая фаза	
	биомасса	свободный пролин	биомасса	свободный пролин
контроль	0.85 ± 0.05	0.34 ± 0.04	0.85 ± 0.05	0.34 ± 0.04
I	0.95 ± 0.06	0.30 ± 0.04	1.50 ± 0.07	0.22 ± 0.03
II	1.59 ± 0.07	0.21 ± 0.03	1.63 ± 0.08	0.20 ± 0.03
III	1.39 ± 0.07	0.19 ± 0.02	1.72 ± 0.09	0.10 ± 0.01
IV	1.45 ± 0.07	0.19 ± 0.02	1.57 ± 0.07	0.19 ± 0.02
V	1.69 ± 0.08	0.10 ± 0.01	1.68 ± 0.08	0.10 ± 0.01

Согласно данным табл. 2, кристаллы всех вариантов, кроме первого, стимулировали рост дрожжей, а количество свободного пролина снижалось с увеличением биомассы дрожжей. Это подтверждает сделанный ранее вывод, что снижение количества пролина, вследствие его включения в состав белковых молекул, может служить показателем активирования роста клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бритиков Е.А., Биологическая роль пролина, М., 1975.
2. Кэппер П. Курс органической химии, Л., 1960.
3. Blumenkrantz N. Clin. Biochem. 138, 177-183, 1980.
4. Brosemer R. W., Veerabhadrapa P.S. Biophys, Acta., 110,102-111, 1965.
5. Meister A. Biochemistry of aminoacids 2 , 1965.

Поступила 05.11.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 616.681-018:5383

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЭПИДИДИМИАЛЬНОЙ СПЕРМЫ КРЫС ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ПОЛЕЙ

Г.В. СААКЯН, Г.Г. АРЦРУНИ, Т.Б. БАТИКЯН

НИИЦ ЕрГМУ им. М.Гераци, Ереван

Исследовано влияние электростатических полей на процесс созревания и функциональную активность эпидидимальных сперматозоидов крыс. Показано, что однократное влияние электростатического поля напряженностью 200 кВ/м активизирует сперматогенез и приводит к дополнительному выбросу в хвостик эпидидимиса сперматозоидов, у которых нарушена текучесть мембран. Дробное воздействие поля (6 сут, по 6 ч той же напряженности) оказывает повреждающее влияние на качество эпидидимальной спермы.

Ուսումնասիրվել է էլեկտրաստատիկ դաշտերի ազդեցությունը առնետների էպիդիդիմիալ սպերմատոզոիդների հասունացման և ֆունկցիոնալ ակտիվության վրա: Ցույց է տրվել, որ 200 կՎ/մ լարվածությամբ էլեկտրաստատիկ դաշտի մեկժամյա ազդեցությունը բերում է սպերմատոզոնեզի ակտիվացման և դեպի մակամորձու պոչիկ փոփոխված մեմբրանային մածուցիկությամբ սպերմատոզոիդների լրացուցիչ արտանետման: Նույն պարամետրերով դաշտի կոտորակային ազդեցությամբ (6 օր, օրական 6 ժ) էպիդիդիմիսում նվազում է կենսունակ սպերմատոզոիդների կոնցենտրացիան:

The influence of electrostatic fields on maturation and functional activity of rat epididymal sperm was investigated. The data obtained show that one-hour influence of electrostatic field with 200kV/m tension leads to the activation of sperm emission to the epididymis with decreased membrane fluidity. The long-term influence (6 days, for 6-hour period) of the field with the same parameters has a damaging action on epididymal sperm membrane structure and decreases the concentration of viable sperm in epididymis.

Электростатические поля – сперматогенез – спермальная мембрана - соотношение холестерина/фосфолипид - резазуриновый зонд

Ранее нами было показано, что действие электростатических полей (ЭСП) выше фоновых напряженностей изменяет количественный и качественный состав липидной компоненты эритроцитарных мембран [2], структурно-функциональное состояние семенников и уровень гормонов, регулирующих сперматогенез [3, 4]. Биохимический состав и текучесть спермальных мембран меняются во время эпидидимального созревания.

Это обусловлено соотношением количеств мембранных фосфолипидов и холестерина. Так, плазматическая мембрана головки сперматозоида содержит большое количество холестерина, которое, как известно, регулирует текучесть липидного бислоя и повышение отрицательного заряда спермальной мембраны в процессе эпидидимиального созревания [14, 15]. Известно, что соотношение холестерин/фосфолипид (ХЛ/ФЛ) есть определенная величина для спермальных мембран данного вида и является важным параметром оценки функциональной активности сперматозоидов [5, 21]. Для созревших сперматозоидов крыс в норме ХЛ/ФЛ равняется единице [15]. Целью данной работы явилось исследование влияния ЭСП на функциональную активность эпидидимиальных сперматозоидов и оценка влияния поля на процесс созревания сперматозоидов.

Материал и методика. Объектом исследований служили мембраны эпидидимиальных сперматозоидов белых беспородных крыс массой 130-150 г, подвергшихся кратковременному (1 ч) и дробному (6 сут по 6 ч) воздействию ЭСП напряженностью 200 кВ/м. ЭСП создавали при помощи установки конденсаторного типа с контролируемыми параметрами поля [1].

Для каждой экспозиции и контрольных опытов использовали по 20 животных.

Животных забивали сразу после действия поля. Непосредственно после декапитации у всех исследуемых животных извлекали хвостик придатка семенника (эпидидимис).

Сперматозоиды выделяли по методике, предложенной Gustave et al. [13]. Измельченный эпидидимис инкубировали в растворе Рингер-Трис в соотношении 1:9 (мг/мл) при 4° в течение 30 мин. Крупные частицы ткани отделяли фильтрованием. Полученную суспензию центрифугировали при 130 g (10 мин при 4°) для отделения мелких частей эпидидимиальной ткани. Супернатант центрифугировали вторично при 650 g для осаждения неразрушенных сперматозоидов.

Спермальные мембраны выделяли по методу Luzio and Bailyes [20]. Сперматозоиды гомогенизировали в 0,25 мМ сахарозе, забуференной 50 мМ Трис/НСl буфером, содержащим 1 мМ EDTA (pH 7,4) при 4° в течение 5 мин. Полученную суспензию центрифугировали при 1000 g (10 мин при 4°). Полученный мембраносодержащий супернатант хранили в глубокой заморозке. Белок определяли по методу Lowery et al. [19].

Фосфолипиды, экстрагированные по методу Bligh and Dyer [7], разделяли одномерной ТСХ в системе растворителей: петролейный эфир-диэтиловый эфир-муравьиная кислота (60:40:2, об/об). Оставшиеся на старте хроматографии фосфолипиды соскребали в колбочки Кьельдаля. Их суммарное количество определяли согласно методу Ernster et al. [10]. Определение холестерина проводили по методу Courchain et al. [8].

Используя реззуриновый зонд, оценивали функциональную активность эпидидимиальных сперматозоидов. В основе реззуринового теста лежит спектрофотометрическая оценка сокращения количества реззурина за счет образования реззурина. Показано, что оптическая плотность (ОП) прямо пропорциональна концентрации созревших сперматозоидов с интактной акросомой [12, 22]. Выделенные из придатка сперматозоиды разбавляли в 50 мкл растворе Рингер/Трис. Вводили 5 мл 0,1%-ного раствора реззурина. После одночасовой инкубации при температуре 48-50° измеряли ОП при 610 нм.

Каждое экспериментальное условие было воспроизведено в четырех различных опытах по 3 параллели для каждой точки.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Как показывают полученные нами результаты (табл. 1), в мембранах сперматозоидов, выделенных из хвостика эпидидимиса интактных крыс, соотношение ХЛ/ФЛ равняется 0,95, что вполне коррелирует с литературными данными [15, 21]. После одночасового воздействия ЭСП количество холестерина в мембранах не меняется, а суммарное содержание ФЛ повышается вдвое, что приводит к изменению соотношения ХЛ/ФЛ (1/3). Интересно, что дробное влияние поля приводит к обратному результату: на фоне неизменного количества суммарных ФЛ содержание холестерина снижается вдвое, приводя к соотношению ХЛ/ФЛ, равному 1/2.

Таблица 1. Количество суммарных фосфолипидов и холестерина в спермальных мембранах крыс в норме, при кратковременном и дробном воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м, мг/мг белка

Воздействие ЭСП	Фосфолипиды	Холестерин	ХЛ/ФЛ
Контроль (0)	$0.53 \pm 0,02$	$0.50 \pm 0,01$	0.95
1-часовое	$1.78 \pm 0,1$	$0.49 \pm 0,03$	0.28
Дробное	$0.47 \pm 0,04$	$0.24 \pm 0,01$	0.51

Холестерин, являясь одним из важных компонентов спермальной мембраны, играет ключевую роль в архитектуре ее стабильности. Извлечение холестерина из мембраны приводит к дестабилизации спермального бислоя, что необходимо для оплодотворения яйцеклетки [6]. К тому же холестерин предотвращает слипание и кристаллизацию углеводородных цепей, ингибирует фазовые переходы, связанные с изменением температуры и таким образом предотвращает резкое уменьшение текучести мембран, которое в противном случае имело бы место при низкой температуре. Но, согласно литературным данным, созревание сперматозоидов и наличие в них интактной акросомы обусловлены также фосфолипидным компонентом мембраны. Так, известно, что во время эпидидимиального созревания сперматозоиды из окружающей среды интегрируют фосфолипиды, которые прочно ассоциируются с индукцией их прогрессивной подвижности.

Все липидные компоненты спермальной мембраны участвуют в регуляции созревания спермы, сперматогенеза, акросомной реакции и в особенности мембранной проницаемости. Пероксидация спермальных липидов может привести к нарушению всех вышеперечисленных процессов и в экстремальном случае может полностью подавить процесс сперматогенеза [9, 11].

Очевидно, что изменение липидного состава спермальных мембран приведет к нарушениям всех функций сперматозоидов, в том числе подвижности, акросомной реакции и, следовательно, оплодотворяющей способности.

Согласно литературным данным, уменьшение соотношения ХЛ/ФЛ приводит к понижению мембранной анизотропности каудальной спермы [14]. Так как анизотропность и микровязкость мембраны являются обратно пропорциональными величинами, то соответственно понижение степени анизотропности приводит к повышению текучести мембраны [15]. Сопоставление этих фактов позволяет заключить, что понижение соотношения ХЛ/ФЛ приводит к увеличению микровязкости бислая.

Следовательно, полученные нами результаты свидетельствуют о том, что одночасовое воздействие ЭСП стимулирует интенсивную интеграцию фосфолипидов в спермальную мембрану эпидидимальной спермы, не влияя на содержание холестерина, что приводит к повышению микровязкости мембранного бислая.

Исследование дробного воздействия ЭСП на вышеперечисленные процессы, показало, что количество фосфолипидов не меняется, а холестерина уменьшается вдвое. Так как мембранный холестерин играет важнейшую роль во время оплодотворения яйцеклетки [17, 18], то можно полагать, что дробное воздействие приводит как к понижению текучести спермальной мембраны, так и к определенной потере оплодотворяющей способности спермы.

Проведенные нами исследования функциональной активности каудальной спермы после воздействия ЭСП при помощи реззуринового зонда показывают, что по сравнению с контролем одночасовое влияние приводит к достоверному повышению ОП на 8,57%, а дробное - к ее понижению на 9,71% (табл. 2).

Эти результаты свидетельствуют о том, что после одночасового влияния поля происходит активация выброса сперматозоидов в хвостик придатка, что вполне коррелирует с данными наших ранних гормональных и морфологических исследований, согласно которым одночасовое влияние поля приводит к активации сперматогенеза [3, 4].

Таблица 2. Результаты реззуринового теста эпидидимальной спермы в норме, при кратковременном и дробном воздействии ЭСП напряженностью 200 кВ/м

Воздействие ЭСП	Оптическая плотность
Контроль (0)	$1,75 \pm 0,006$
1-часовое	$1,90 \pm 0,012$
Дробное	$1,58 \pm 0,02$

Однако, как показано выше, одночасовое воздействие ЭСП приводит к изменению соотношения ХЛ/ФЛ, что свидетельствует о нарушении структуры и, соответственно, функционального состояния спермальной мембраны.

Снижение ОП при дробном воздействии ЭСП также подтверждается нашими ранними исследованиями, согласно которым при дробном влиянии нарушаются именно начальные стадии сперматогенеза, что приводит к уменьшению количества эпидидимальной спермы. Сопоставление значения ОП и ХЛ/ФЛ соотношения подтверждает повреждающее влияние длительного действия ЭСП также на конечную стадию сперматогенеза.

Результаты, приведенные в данной работе, и результаты наших ранних исследований свидетельствуют о том, что однократное влияние ЭСП напряженностью 200 кВ/м активизирует сперматогенез, приводит к дополнительному выбросу в хвостик эпидидимиса сперматозоидов и к нарушению текучести их мембран. Дробное воздействие поля тех же параметров оказывает повреждающее влияние как на начальные стадии сперматогенеза, так и на качество эпидидимальной спермы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Арицруни Г.Г.* Камера для изучения действия ЭСП на мелкие лабораторные животные. Удост. на рац. предложение, 134, 1983.
2. *Арицруни Г.Г.*, Глобус науки, 1 (1). - С. 33-37, 2001.
3. *Довлатян Р.А., Авакян Л.А., Арицруни Г.Г.* Мед. наука Армении, XLIV, 2, с. 33-37, 2004.
4. *Саакян Г. В., Арицруни Г.Г.* Биолог. ж. Армении, 58, 1-2, ст. 80-84, 2006.
5. *Alvarez J. G., Storey B. T.*, Mol Reprod Dev, 42, 334-46, 1995.
6. *Benoff S.*, Hum Reprod, 8, 2001-2008, 1993.
7. *Bligh and Dyer*, Canadian J. of Biochem. and Physiology, 37, 911-917, 1959.
8. *Courchaine A.J., Miller W.H., Stein D.B., Jr.* Clin.Chem., 5, p. 609, 1959.
9. *Dorota Sanocka, Maciej Kurpisz*, Reproductive Biology and Endocrinology, 2:12, 2004.
10. *Ernster I.R., Zetterstrom R., Lindberg O.*, Acta Chem. Scand., 4, p.942, 1950.
11. *Furimsky A. et al.*, BOR Papers in Press., 2004.
12. *Fuse H, Okumura M, Kazama T, Katayama T.* Andrologia, 25(3):153-7, 1993.
13. *Gustave A. Basone, Jerry L. Hedrich*, Biol. of Reprod., 66, 1203-1209, 2002.
14. *Haidl G., Oppel C.* Human Reproduction, 12, 2720-2723, 1997.
15. *Hall J. C., Hadley J., Doman T.* Journal of Andrology, 12, Issue 1 76-87, 1991.
16. *Lalumiere G., Bleau G., Chapdelaine A., Roberts K. D.* Steroids, 27, 247-60, 1976.
17. *Langlais J., Roberts K. D.*, Gamete Res, 12, 183-224, 1985.
18. *Langlais J., Zollinger M., Plante L., Chapdelaine A., Bleau G., Roberts K. D.*, Proc Natl Acad Sci USA, 78, 7266-70, 1981.
19. *Lowery O. H., Rosebrough N. J., Farr R. H., Randal P. J.*, J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
20. *Luzio, J. P. and Baillyes, E. M.*, Methods in Molecular Biology, 19, 295, 1993.
21. *Parks J. E., Hammerstedt R. H.*, Biol Reprod, 32, 653-68, 1985.
22. *Rahman NA, Kula K.* Int. J. Androl., 20, 1, 17-22, 1997.

Поступила 15.01.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 613.632

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА 1,3-ДИХЛОРБУТЕНА-2 В СВЕТЕ ТЕОРИИ СТРУКТУРА-БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

М.С. МНАЦАКАНЯН

*Национальный институт здравоохранения МЗ РА,
кафедра гигиены, Ереван*

Установлено, что 1,3-дихлорбутен-2 обладает умеренно выраженными токсическими свойствами. По LC_{50} он относится ко II классу опасности, по LD_{50} – к III классу, по зоне острого действия – ко II, по зоне хронического действия – к I, по ПДК в.р.з. – ко II.

Причиной выраженного различия в токсичности дихлорбутенов являются различные физико-химические параметры и структурные особенности, в частности, наличие и количество терминальных хлорметильных групп в молекуле, а также место локализации кратной связи и атомов хлора по отношению к кратной связи.

Որոշված է, որ 1,3-դիքլորբութեն-2-ը օժտված է չափավոր արտահայտված թունավոր հատկություններով. ըստ միջին մահացու խտության չափանիշի նա պատկանում է վտանգավորության II դասին, ըստ միջին մահացու դոզայի (թունաչափի)՝ վտանգավորության III դասին, ըստ սուր ազդեցության գոտու՝ II դասին, ըստ քրոնիկ ազդեցության գոտու՝ I դասին և ըստ աշխատանքային գոտու օդի սահմանային թույլատրելի խտության՝ II դասին:

Դիքլորբութենների թունավորության արտահայտված տարբերության պատճառ են հանդիսանում դրանց ֆիզիկաքիմիական հատկությունները և կառուցվածքային առանձնահատկությունները, մասնավորապես, մոլեկուլում թերմինալ քլորմեթիլային խմբերի առկայությունը և քանակը, կրկնակի կապի և քլորի ատոմների տեղաբաշխությունը իրար հանդեպ:

Established, that 1,3-dichlorobutene-2 possesses moderate toxic effects. By LC_{50} it classified as a II class of danger, by LD_{50} – as a III class, by a range of acute effect – as a II class, by chronic effect area – as a I class, by MPC working air – as a II class of danger.

The reason of the expressed difference in toxicity between dichlorobutenes are the various physicochemical parameters and structural features, specifically, presence and quantity of terminal chloromethyl groups in a molecule, as well as a place of localization of multiple bond and atoms of chlorine with respect to multiple bond.

Дихлорбутены - токсичность - связь структура

1,3-Дихлорбутен-2 (1,3-ДХБ) встречается в производстве хлоропреновых каучуков ЗАО "Наирит-1" в качестве промежуточного и побочного продукта. Его применяют также в качестве мономера в производстве полихлоропреновых каучуков [13]. Возможное количество 1,3-ДХБ в выбросах завода в атмосферу составляет около 9 т/год.

Будучи постоянным "спутником" производства хлоропрена из ацетилен, 1,3-ДХБ привлек внимание токсикологов еще в 30-е годы прошлого века - наряду с налаживанием производства хлоропрена на заводе синтетических каучуков в Ереване. Интенсивные исследования токсических свойств 1,3-ДХБ были проведены армянскими исследователями в 50-70-е годы [1-4]. В последние годы наблюдается активизация этих исследований в США и других странах [7,13].

Целью настоящей работы являлось на основании собственных исследований и данных литературы выявление закономерности связи между физико-химическими свойствами и структурными особенностями молекулы 1,3-ДХБ в проявлении его биологической активности.

Материал и методика. В рамках исследований по разработке ПДК 1,3-ДХБ в атмосферном воздухе мы проводили острые однократные опыты с целью определения среднесмертельных доз (LD_{50}) и концентраций (LC_{50}) 1,3-ДХБ у белых крыс и мышей, интегрального порога острого действия (*Limac. int.*), порога однократного гонадотоксического действия (*Limac. sp.*), а также изучали токсичность при хроническом трехмесячном круглосуточном ингаляционном воздействии минимальных концентраций этого соединения (почти на уровне его ПДК в воздухе рабочей зоны (ПДК в. р.з.) - 1,0 мг/м³) - 1,19 и 0,31 мг/м³. На этих же уровнях и режиме воздействия исследовали гонадотоксическое, эмбриотоксическое и цитогенетическое действия 1,3-ДХБ. В целом в опытах использовали 306 крыс и 72 мыши.

Пользуясь литературными данными о токсических свойствах структурных аналогов 1,3-ДХБ - 1,4-дихлорбутена-2(1,4-ДХБ) и 3,4-дихлор-бутена-1(3,4-ДХБ), нами изучена связь между физико-химическими свойствами, структурными особенностями молекул и токсиметрическими показателями этих соединений. С этой же целью проводили корреляционно-регрессионный анализ между указанными параметрами. Из физико-химических показателей использовали удельную массу, температуру кипения, упругость паров, насыщающую концентрацию, растворимость в воде, коэффициент распределения между маслом и водой, коэффициент преломления [8,9,10]. Из токсико-метрических параметров применяли среднесмертельную концентрацию (LC_{50}) и дозу (LD_{50}) у крыс и мышей, пороги острого интегрального действия (*Limac. int.*), однократного гонадотоксического действия (*Limac. sp.*), хронического действия (*Limch*), коэффициент возможности ингаляционного отравления (КВИО), ПДК в воздухе рабочей зоны (ПДК в.р.з.) [1,2].

Результаты и обсуждение. Пороговую концентрацию однократного гонадотоксического действия 1,3-ДХБ определяли на уровне 115 мг/м³, что в 2,1 раза ниже порога острого интегрального действия этого соединения (245 мг/м³). При этом чувствительными показателями оказались длительность движения сперматозоидов и количество мертвых сперматозоидов. Хроническое (3 мес.) отравление крыс 1,3-ДХБ в концентрации 1,19 мг/м³ вызывало функциональные изменения в печени

(увеличение продолжительности гексеналового сна, снижение активности микросомальных ферментов этого органа) и почках (повышение диуреза, увеличение хлоридов в моче и креатинина в моче и сыворотке крови), а также морфологические изменения в этих же органах – белковая дистрофия гепатоцитов, дистрофические изменения в клубочках и нефроцитах проксимальных отделов извитых канальцев почек. Концентрация 1,19 мг/м³ оказалась пороговой в хроническом опыте. При изучении отдаленных эффектов выявлено, что хроническая (3 мес.) ингаляционная круглосуточная интоксикация крыс-самцов 1,3-ДХБ на уровне порога хронического действия (1,19 мг/м³) вызывает умеренно выраженное гонадотоксическое действие, проявляющееся статистически недостоверным, но заметным снижением концентрации сперматозоидов, увеличением количества мертвых сперматозоидов, уменьшением продолжительности их движения, а также увеличением количества семяродных канальцев со слущенным зародышевым эпителием. Эмбриотоксический эффект ингаляционного круглосуточного воздействия 1,3-ДХБ в концентрации 1,3 мг/м³ на беременных крыс в течение всего срока беременности (21 день) был более выражен, чем гонадотоксический, и проявлялся статистически достоверным повышением уровня доимплантационной гибели эмбрионов, существенным, но недостоверным повышением общей эмбриональной смертности, а также снижением количества нормальных плодов и увеличением числа плодов с кровоизлияниями в брюшной полости. Хроническое трехмесячное круглосуточное ингаляционное отравление 1,3-ДХБ в концентрации 1,19 мг/м³ крыс-самцов вызвало заметное (но статистически незначимое) повышение уровня хромосомных aberrаций в клетках костного мозга животных.

Сравнительный анализ физико-химических показателей дихлорбутенов и их сопоставление с токсикологическими параметрами показывает, что с увеличением удельной массы, температуры кипения и коэффициента преломления их токсичность возрастает (табл. 1). И наоборот, токсичность дихлорбутенов снижается с возрастанием упругости паров насыщающей концентрации.

Корреляционно-регрессионный анализ между физико-химическими и токсикометрическими показателями дихлорбутенов выявил тесную, высокодостоверную корреляцию между параметрами острой токсичности и большинством физико-химических показателей. Так, коэффициенты корреляции между ЛК₅₀ и удельной массой, температурой кипения, упругостью паров и показателем преломления составляли 0,69-0,89, между ЛД₅₀ и перечисленными показателями - 0,82-0,99, между интегральным порогом острого действия, порогом однократного гонадотоксического действия и указанными показателями - 0,65-0,99, между КВИО и этими показателями - 0,93-0,99. Показатели хронической токсичности и ПДК в.р.з. дихлорбутенов также хорошо коррелировали с физико-химическими показателями. Растворимость в воде и коэффициент распределения между маслом и водой сравнительно плохо коррелировали с токсикометрическими показателями.

Анализ литературных данных о связи между токсичностью и строением химических веществ указывает на важную роль структуры соединения, в частности, места локализации атомов хлора и кратной связи в молекуле, в проявлении биологической активности [4,11].

Таблица 1. Физико-химические и токсикометрические показатели дихлорбутенов

Показатели		1,3-ДХБ	1,4-ДХБ	3,4-ДХБ
Молекулярная масса		125	125	125
Удельная масса		1,157	1,185	1,150
Температура кипения, °С		130	155	115
Упругость паров, мм рт.ст.		8,2	2,03	13,0
Насыщающая концентрация, мг/л		56,0	13,8	88,9
Растворимость в воде, г/л		1,16	1,05	0,96
Коэффициент распределения масло/вода		2511	2187	512
Коэффициент преломления		1,472	1,486	1,455
ЛК ₅₀ , мм/м ³	крысы	23,2	10,8	193,6
	мыши	33,2	7,52	45,6
ЛД ₅₀ , мм/кг	крысы	2,8	1,76	7,04
	мыши	3,0	1,28	5,79
КВНО		11,6	5,0	15,8
Limac. int., мм/м ³		1,96	1,20	6,90
Limac. sp., мм/м ³		0,92	0,44	3,32
Limch., мм/м ³		0,08	0,04	0,56
ПДК в.р.з., мг/м ³		1,0	0,1	1,0

Как видно из табл. 2, 1,4-ДХБ почти по всем параметрам токсичнее 1,3-ДХБ и 3,4-ДХБ, 1,3-ДХБ в свою очередь токсичнее 3,4-ДХБ. Анализ структурных особенностей трех дихлорбутенов показывает, что атомы хлора в молекуле 1,4-ДХБ расположены у терминальных углеродов, у 1,3-ДХБ и 3,4-ДХБ один атом хлора находится у терминального углерода, а второй - внутри углеродной цепи, в положении 3. По сведениям многих исследователей, молекулы химических соединений взаимодействуют с субстратами в основном своими терминальными группами. В молекуле 1,4-ДХБ оба атома хлора расположены у терминальных углеродов в аллильном положении, что объясняет его высокую токсичность.

Однако указанное правило не может объяснить более высокую токсичность 1,3-ДХБ по сравнению с 3,4-ДХБ, поскольку оба соединения имеют по одной хлорметильной группе и по одному атому хлора в положении 3. Однако, наряду с этими сходствами, они имеют существенное структурное различие – локализацию кратной связи в молекуле. У 1,3-ДХБ кратная связь находится у второго углерода, а у 3,4-ДХБ – у первого. При локализации кратной связи в положении 2 (в центре молекулы, как у 1,3-ДХБ), атом хлора терминальной хлорметильной группы находится в аллильном положении, а аллильный хлор, по данным многих исследователей [6,12], обладает более выраженной биологической активностью, чем их аналоги с неаллильным хлором. В молекуле 3,4-ДХБ атом хлора в хлорметильной группе находится в неаллильном положении, а аллильный хлор находится внутри цепи в положении 3 и, будучи экранированным, обладает слабой химической и биологической активностью.

Таблица 2. Связь между структурными особенностями и токсичностью дихлорбутенов

Название вещества	Структура вещества	ЛК ₅₀ (крысы), мМ/м ³	ЛД ₅₀ (крысы), мМ/кг
1,4-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & & \text{Cl} \end{array}$	10,8	1,76
1,3-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{H} \end{array}$	23,2	3,3
3,4-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{H} \end{array}$	193,6	7,04

Таблица 3. Пути метаболизма дихлорбутенов по данным литературы [5,6]

Название вещества	Исходное вещество	Эпоксид	Первый устойчивый метаболит
1,3-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \nabla & \text{C} - \text{CH} \\ & & \text{O} & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{O} \\ & & & \text{H} \end{array}$
1,4-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & & \text{Cl} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \nabla & \text{C} - \text{CH} \\ & & \text{O} & \\ \text{Cl} & & & \text{Cl} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{H} & \text{O} \\ & & & \text{Cl} \end{array}$
3,4-ДХБ	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} = & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & \text{H} & \text{H} & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \nabla & \text{C} - \text{CH} \\ & & \text{O} & \\ \text{Cl} & & \text{Cl} & \text{Cl} \end{array}$	$\begin{array}{cccc} \text{H} & & & \text{H} \\ & & & \\ \text{H} & - \text{C} - & \text{C} - & \text{CH} \\ & & & \\ \text{H} & & \text{O} & \text{Cl} \\ & & & \text{Cl} \end{array}$

1. Таким образом, 1,3-ДХБ обладает умеренно выраженными токсическими свойствами. Согласно классификации опасности промышленных химических соединений [6], 1,3-ДХБ по ЛК₅₀ относится ко II классу опасности, по ЛД₅₀ – III классу, по зоне острого действия – ко II, по зоне хронического действия – к I, по КВНО – ко II, по ПДК в.р.з. – ко II классу опасности.
2. Причина выраженного различия в токсичности трех дихлорбутенов – структурных аналогов, кроется как в различных физико-химических параметрах соединений, так и в их структурных особенностях. При этом важное значение имеют наличие и количество терминальных хлорметильных групп в молекуле, а также место локализации кратной связи и атомов хлора по отношению к кратной связи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барсегян Г.Б. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1974.
2. Гижларян М.С. Автореф. докт. дисс., Киев, 1986.
3. Межелумян Л.М. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1974.
4. Мхеян В.Е. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1959.
5. Шахназарян Г.М. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1980.
6. Bonse G. et al. Biochem. Pharmac., 24, pp. 1929-1834, 1975.
7. Du Pont Co. Unpublished data, Report N16227., October 4, 2005.
8. Esposito. Genium Publishing Corporation, New York, McGraw-Hill, pp. 1041-1042, 1999.
9. Howard P., Meylan M. Handbook of Physical Properties of Organic Chemicals. Lewis, Boca Raton, p.536, 1997.
10. Lide D.R. Handbook of Physics and Shemistry. CKC Pres LLC, Boca Raton, pp. 3-104, 2000.
11. Menon G.K., Cammarata A. I. Pharmaceutical Sciences, 66, 3, pp. 304-314, 1977.
12. Neudecker T. et al. Biochem. Pharmac., 29, pp. 2611-2617, 1980.
13. SIDS Initial Assessment Report; OECD SIDS, 2-Buten-1,3-dichloro // UNEP Publications, Paris, France, 18-21 April, p. 1-131, 2006.

Поступила 14.12.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581.3

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННОЙ КУЛЬТУРЫ ЖИВУЧКИ ЖЕНЕВСКОЙ *AJUGA GENEVENSIS* L.

Н.Ж. СААКЯН, М.Т. ПЕТРОСЯН, ДЖ.А. АГАДЖАНИЯН

Ереванский государственный университет, кафедра микробиологии и биотехнологии микроорганизмов и растений, E-mail:physiol@ysu.am

Исследована антимикробная активность экстрактов изолированной культуры *Ajuga genevensis* L. в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, как непатогенных, так и патогенных и условно патогенных. Дана зависимость антибактериальной активности от цикла роста культуры, степени ее дифференциации, гормонального состава питательной среды, способа экстракции.

Ուսումնասիրվել է *Ajuga genevensis* L.-ի մեկուսացված կուլտուրայի լուծամզվածքների հակաբակտերիական ակտիվությունը մի շարք գրամ-դրական և գրամբացասական, ինչպես ոչ ախտածին, այնպես էլ՝ ախտածին ու պայմանական ախտածին միկրոօրգանիզմների նկատմամբ: Տրվել է հակաբակտերիական ակտիվության կախվածությունը կուլտուրայի աճի ցիկլից, դիֆերենցման աստիճանից, սննդամիջավայրի հորմոնային կազմից և լուծամզվածքի ստացման եղանակից:

The antibacterial activity of extractions of isolated culture of *Ajuga genevensis* L. toward both grampositive and gramnegative pathogenic, nonpathogenic and conditionally pathogenic microorganisms was investigated. Dependence of antibacterial activity on the growth cycle of culture, level of its differentiation, hormonal composition of nutrient medium and extraction mode was established.

Ajuga genevensis - изолированная культура – каллус - мериклон,
питательная среда - антибактериальная активность

Растительный мир хранит огромные запасы биологически активных веществ, которые относятся к продуктам вторичного метаболизма. Но обеспечить потребности общества в этих соединениях за счет сбора и переработки дикорастущих растений, многие из которых являются уникальными, не представляется возможным, ввиду ограниченных природных источников сырья и низкого содержания активных компонентов в интактных растениях, что делает их получение экономически невыгодным. В связи с этим возрастает значение использования клеточных культур растений для получения целого ряда экономически ценных биологически активных веществ [1].

Имеющаяся литература указывает на высокую метаболическую активность рода *Ajuga*. Многие виды вырабатывают цитотоксичные (8-0-ацетилгарпагид, гарпагид [6, 10]), противооплазмодийные (аюгарин-1, 8-0-ацетилгарпагид [13]), инсектицидные (20-гидроксиэкдизон [11]), антибактериальные (дитерпены [9]), противовирусные [16], антимикробактериальные [8] вещества. Учитывая эти данные, нами была поставлена цель получить изолированные культуры некоторых принадлежащих к этому роду малоизученных видов, растущих в Армении и находящихся широкое применение в народной медицине как противовоспалительные, противомаларийные, гемостатические, ранозаживляющие, противолихорадочные средства, и содержащих такие биологически активные вещества, как иридоиды, флавоноиды, терпеноиды, стероиды, дубильные вещества, эфирные масла [2, 6-16].

Как правило, процессы образования вторичных соединений в культуре *in vitro* отличаются от таковых в интактных растениях, а данные об установлении закономерностей в культуре клеток при синтезе метаболитов противоречивы [4,5]. В процессе культивирования может произойти изменение качественного и количественного состава активных метаболитов. Состав биологически активных веществ меняется и в течение одного цикла выращивания: обычно усиление синтеза вторичных метаболитов в условиях *in vitro* наблюдается в конце выращивания при замедлении или остановке клеточной пролиферации [4]. Но возможны и исключения из общих правил, что делает изучение закономерностей роста и метаболической активности полученной изолированной культуры обязательным.

Целью настоящей работы было изучение антибактериальной активности полученной нами клеточной культуры *Ajuga genevensis* L.

Материал и методика. Изолированная культура *A. genevensis* L. была получена на питательной среде Мурасиге – Скуга (МС) [3]. Дальнейший стабильный рост каллусной ткани поддерживался как на среде МС, так и на модифицированной среде, условно обозначенной нами N7, отличающейся составом фитогормонов. В отличие от традиционной среды МС, в модифицированном варианте отсутствует индолил-3-уксусная кислота (ИУК) и глицин, но добавлены, мг/л: гибберелловая кислота (ГК) в концентрации 0,2, α -нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,5, 6-бензиламинопурин (БАП) – 1, концентрация кинетина доведена до 1.

Антибактериальную активность определяли путем нанесения экстрактов из различных частей интактного растения, мериклонов и каллусных тканей на газон тест – микроорганизмов и измерением диаметров зон отсутствия роста, образовавшихся вокруг колодцев с экстрактом. Один грамм ткани экстрагировали в 10 мл жидкости (этанол, метанол, вода) в течение 20 ч на магнитной качалке и при температуре 4⁰. Полученную суспензию центрифугировали и надосадочную жидкость использовали как грубый экстракт антибиотика. Опыты были поставлены в трехкратной повторности. В качестве тест-организмов использовали штаммы микроорганизмов, хранящиеся в коллекции музея Республиканского центра депонирования микроорганизмов, а также из коллекции культур микроорганизмов кафедры микробиологии и биотехнологии растений и микроорганизмов.

Результаты и обсуждение. Результаты тестирования изолированных культур, полученных нами из *A. genevensis* L., произрастающей в районе г. Арагац, показали, что они проявляли высокую антибактериальную активность. На рис. 1 можно рассмотреть довольно обширные стерильные зоны на чашках Петри с газоном *Bacillus subtilis*, образовавшиеся вокруг каллусов и мериклонов *A. genevensis*, что указывает на высокий уровень синтеза в этих тканях веществ с антимикробными свойствами.

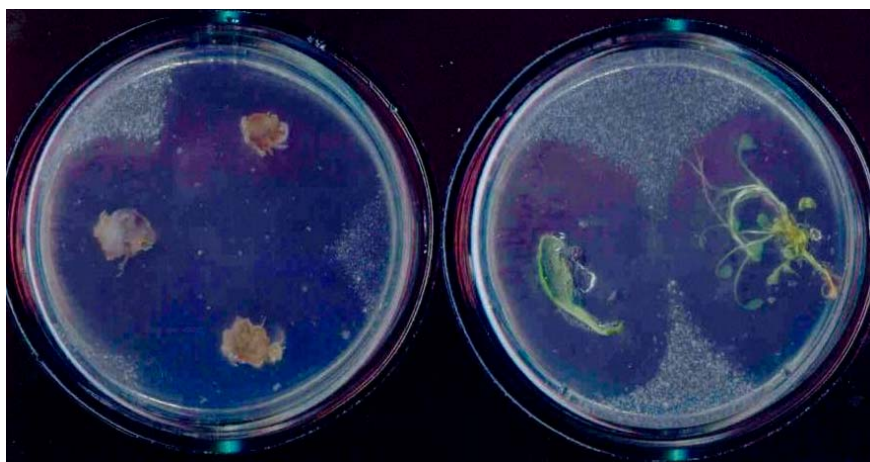


Рис.1. Зоны отсутствия роста вокруг каллусов и мериклонов *A.genevensis* L. (тест-организм - *Bacillus subtilis*)

Тестирование экстрактов, полученных из каллусов и разных частей мериклонов, также выявило высокую антимикробную активность культуры в отношении различных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Причем выяснилось, что синтез вторичного метаболита, обладающего противомикробной активностью, зависел от ряда условий: цикла роста и пассажа, состава питательной среды, штамма тест-микроорганизма. Эта зависимость приводится в табл. 1, которая показывает, что в течение одного цикла выращивания пик активности синтеза исследуемого метаболита отмечался на 20-й день культивирования каллусов. Эта закономерность сохранялась независимо от пассажей, а к 39 – 40-му пассажу достигала наивысшей отметки.

Наиболее чувствительными оказались *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *Staphylococcus citreus* и *Escherichia coli* (табл. 1), тогда как эти же микроорганизмы проявляли слабую чувствительность в отношении интактных растений, для которых диаметры стерильных зон не превышали одного см.

Таблица 1. Ингибирование роста тест-организмов каллусными тканями
A. genevensis на среде МС

Тест-организм	Пассаж	Диаметр зон отсутствия роста, см			
		Дни роста каллуса			
		5	10	20	35-40
1. <i>B. subtilis</i> 205	4	0.3 x 0.4	1.5 x 1.8	2.8 x 2.6	3.3 x 3.5
	18	0.5 x 0.5	1.8 x 2.0	4.0 x 4.3	3.4 x 3.5
	39	0.7 x 0.9	2.3 x 2.5	4.1 x 4.3	3.3 x 3.6
2. <i>B. subtilis</i> 1759	4	0.3 x 0.3	1.5 x 1.7	3.3 x 3.4	2.8 x 3.0
	18	0.4 x 0.5	1.7 x 1.9	3.7 x 3.9	3.0 x 3.0
	39	0.4 x 0.6	2.4 x 2.6	3.9 x 4.1	3.0 x 3.2
3. <i>B. mesentericus</i>	4	-	1.2 x 1.5	3.2 x 3.4	3.0 x 3.2
	18	0.4 x 0.7	1.4 x 1.7	3.7 x 3.8	3.5 x 3.6
	39	0.8 x 1.0	1.5 x 1.7	4.0 x 4.1	3.7 x 3.7
4. <i>Staphylococcus citreus</i>	4	-	0.8 x 1.0	3.0 x 3.2	2.3 x 2.5
	18	-	1.4 x 1.5	3.5 x 3.7	2.5 x 2.6
	39	0.5 x 0.6	1.7 x 1.8	4.2 x 4.3	3.3 x 3.4
5. <i>S. aureus</i> 209	4	-	2.2 x 2.4	2.8 x 3.0	2.3 x 2.6
	18	0.3 x 0.5	2.2 x 2.4	2.9 x 3.0	2.4 x 2.5
	39	0.8 x 0.9	2.3 x 2.5	2.9 x 3.2	2.6 x 2.8
6. <i>Escherichia coli</i> 5009	4	-	-	2.0 x 2.2	-
	18	-	1.3 x 1.4	2.0 x 2.2	-
	39	0.3 x 0.5	1.8 x 1.9	2.7 x 2.8	-
7. <i>E. coli</i> 205	4	-	1.8 x 2.0	2.8 x 3.0	-
	18	-	2.0 x 2.2	3.2 x 3.4	-
	39	-	2.1 x 2.2	3.5 x 3.6	-
8. <i>Salmonella typhimurium</i> 1474	4	-	-	0.9 x 1.2	1.7 x 1.8
	18	-	-	1.1 x 1.5	1.8 x 2.1
	39	-	-	2.1 x 2.3	2.1 x 2.3

Примечание: поскольку зоны отсутствия роста не имели форму правильного круга, указаны максимальный и минимальный диаметры зон.

Преимуществом использования *in vitro* условий является возможность целенаправленного изменения метаболизма культуры. Для повышения антимикробной активности ткани было испытано влияние различных сочетаний фитогормонов. Выяснилось, что увеличение суммарного количества цитокининов, а также изменение вида ауксина в питательной среде N7 способствовали значительному увеличению синтеза веществ с антимикробной активностью в тканях изолированной культуры *A. genevensis* L. (рис. 2).

Важность исследований антибактериальной активности *in vitro* культуры *A. genevensis* L. подтверждается также тем фактом, что ингибирующее действие ткани распространяется и на некоторые патогенные микроорганизмы. Так, в рамках сотрудничества с Центром профилактики особо опасных инфекций им. Мкртчяна выяснилось, что

такие патогенные микроорганизмы, как возбудители чумы (*Yersinia pestis*), кишечного иерсиниоза (*Y. enterocolitica*), бруцеллеза (*Brucella abortus*) и ложносибирской язвенной болезни (*Bacillus anthracoides*) проявляли высокую чувствительность к водным экстрактам из надземных частей, корней мериклонов и каллусных тканей *A. genevensis* L. (рис. 2).

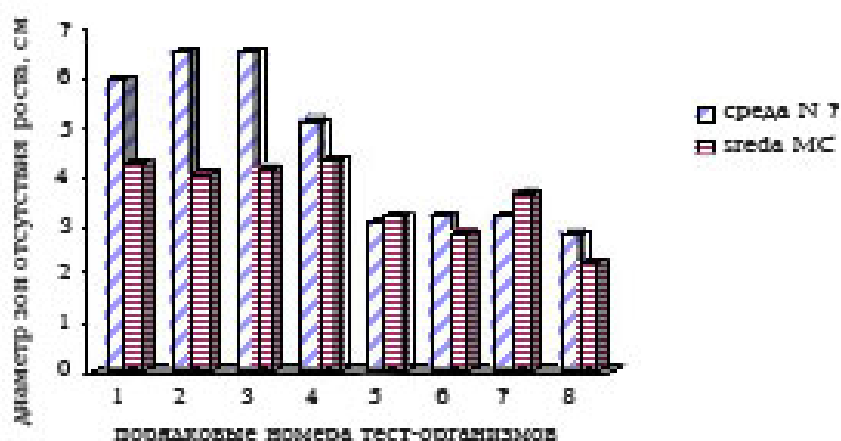


Рис.2. Ингибирование роста тест-микроорганизмов каллусными тканями *A. genevensis* 39-го пассажа на 20-й день культивирования, выращенными на питательных средах MC и N7. Порядковые номера тест-организмов соответствуют тест-организмам, приведенным в табл. 1.

Таблица 2. Угнетение роста патогенных микроорганизмов изолированной культурой *A. genevensis*

Тест - организмы	Диаметр зон отсутствия роста, см		
	Надземная часть мериклонов	Корни мериклонов	Каллусные культуры
<i>Yersinia pestis</i>	1,5 x 1,5	3,5 x 4,0	5,5 x 6,0
<i>Y. enterocolitica</i>	4,0 x 4,2	3,5 x 4,6	---
<i>Brucella abortus</i>	---	---	3,0 x 3,5
<i>Bacillus anthracoides</i>	0,8 x 1,4	0,7 x 1,0	3,0 x 3,5

Несмотря на полное отсутствие какой-либо антимикробной активности у интактного растения по отношению к патогенным тест-микроорганизмам, каллусные культуры и мериклоны проявляли довольно высокое ингибирующее действие на их рост.

Наивысшая активность была выявлена у каллусных культур, которые более эффективно ингибировали рост почти всех тестируемых микроорганизмов. Экстракты корней мериклонов проявляли одинаково высокую активность как в отношении *Yersinia pestis*, так и *Y. enterocolitica*.

Эти микроорганизмы проявляли высокую степень чувствительности и в отношении водных экстрактов надземных частей мериклонов, тогда как влияние на *B. anthracoides* было слабым, а рост *B. abortus* вовсе не был подавлен.

Уровень антибактериальной активности экстрактов каллусов зависел также от природы экстрагирующего вещества – наивысшую активность проявлял водный экстракт каллусов *A. genevensis* L.

Таким образом, данные исследований интактных и культивируемых *in vitro* растений *A. genevensis* L. указывают на довольно высокое антимикробное действие водных экстрактов полученных нами изолированных культур в отношении различных грамположительных и грамотрицательных патогенных и непатогенных микроорганизмов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Битченко Т.И., Синкевич Н. М., Юрин В.М. Биотех. часть 1, с. 114, 2005.
2. Золотницкая С. Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении, II, Ереван, 1965.
3. Калинин Ф.Л., Сарнацкая В. В., Полищук В.Е. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений, Киев, 1980.
4. Кунах В.А. Физиология растений. М., Наука, 46, 6, С. 919, 929, 1999.
5. Носов А. М. - Физиол. растений. 41, 6., с. 873 – 878, 1994.
6. Akbay P., Calis I., Heilmann J., Stricher O. - Z Naturforsch [c]. Mar-Apr; 58 (3-4): 177-80, 2003.
7. Ben Jannet H., Harzallah – Skhihi F., Mighri Z., Simm Blaney WM. - Fitoterapia. Apr; 71 (2): 105 – 12, 2000.
8. Cantrell CL., Rajab MS., Franzblau SG., Fronczek FR. - Planta Med. Dec; 65 (8): 732-4, 1999.
9. Chen H., Tan RX., Liu ZL., Zhao CY., Sun J. - Acta Crystallogr. C. Jun 15; 53 (60): 814-6, 1997.
10. Dinan L., Whiting P., Bourne P., Coll J. Insect Biochem Mol Biol. Oct; 31 (11): 1077-82, 2001.
11. Fujimoto Y., Ohyama K., Nomura K., Hyodo R., Takahas V., Yamada J., Norisaki M. - Lipids. Mar; 35 (3): 279-88, 2000.
12. Khan PM., Malik A., Ahmad S., Nawaz HR – J. Nat Prod. Sep; 62 (9):1290 – 2, 1999.
13. Kuria KA, Chepkwony H., Govaerts C., Roets E., Buss Witte P., Zupko I., Hoornaert G., Quirynen L., Maes Janssens L., Hoogmartens J., Laekeman G. J.Nat Prod May, 65, 5, 789-93, 2002.
14. Nomura K., Fujimoto Y. Chem Pharm Bull (Tokyo). Mar; 48, 2000.
15. Takasaki M., Yamauchi I I., Haruna M., Konoshima T., J Nat Prod. Sep; 61 (9): 1105 – 9, 1998.
16. Tang X., Chen H., Zhang X., Quan K., Sun M. J. Tradit Chin Med. Mar; 14 (1): 10-3, 1994.

Поступила 30.11.2007



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 597.554.3

**О ТАКСОНОМИЧЕСКОМ ПОЛОЖЕНИИ АРМЯНСКОЙ
БЫСТРЯНКИ *ALBURNOIDES BIPUNCTATUS ARMENIENSIS*
DADIKYAN, 1972 (CYPRINIDAE, PISCES)**

С. Х. ПИПОЯН

*Армянский государственный педагогический университет
им. Х. Абовяна, Ереван*

На основании анализа морфометрических признаков, а также нечеткого разграничения ареалов армянской и восточной быстрянок на территории Закавказья армянская быстрянка *Alburnoides bipunctatus armeniensis* Dadikyan, 1972 сведена в младший синоним восточной быстрянки *Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi, 1863).

Ձևաչափական հատկանիշների վերլուծության, ինչպես նաև Անդրկովկասում հայկական և արևելյան արագաշարժերի արեալների ոչ հստակ տարաբաժանվածության հիման վրա, առաջարկվում է հայկական արագաշարժի *Alburnoides bipunctatus armeniensis* Dadikyan, 1972 անվա-նումը դիտարկել որպես արևելյան արագաշարժի *Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi, 1863) կրտսեր հոմանիշ:

On the ground of morphometric signs analysis and ill-defined delimitation areals of *Alburnoides bipunctatus armeniensis* and *A. bipunctatus eichwaldi* on Transcaucaian region, is proposed consider the *Alburnoides bipunctatus armeniensis* Dadikyan, 1972 as younger synonym of *Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi, 1863).

*Армянская быстрянка - восточная быстрянка - таксономическое
положение*

Быстрянка *Alburnoides bipunctatus* одна из широко распространенных рыб, ареал которой простирается от Франции до Урала и на юге вдоль берега Средиземного моря, северного побережья Малой Азии до верховьев Тигра и Евфрата и водоемов Средней Азии [3]. Разными авторами выделяется до 10 подвидов, статус которых до настоящего времени дискуссионен [2]. Считается, что в водоемах Закавказья обитают 3 подвида быстрянки: в Западном Закавказье от р. Чорух до р. Псоу распространена южная быстрянка *A. bipunctatus fasciatus* (Nordmann, 1940) [12], водоемы Восточного Закавказья – бассейн Куры и Аракса, Самур, Виляжчай, притоки Кумбашинки, Ленкоранку населяет восточная быстрянка *A. bipunctatus eichwaldi* (Filippi, 1863) [1, 12], а водоемы бассейна р. Аракс в пределах Армении - армянская быстрянка *A. bipunctatus armeniensis* Dadikyan, 1972 [5, 6, 7].

Армянская быстрянка была выделена в отдельный подвид Дадикияном [5] на основании разницы между средними значениями отдельных морфометрических признаков быстрянок водоемов Армении и Азербайджана. Однако, учитывая морфологическую неоднородность популяций быстрянок, отмеченную многими авторами [1, 4, 6, 12], а также затруднение при отнесении отдельных популяций к одному из описанных подвидов [2, 8], нами предпринята попытка заново оценить правомочность выделения в отдельный таксон быстрянки водоемов Армении, что и является целью данной работы.

Материал и методика. Материал собран из рр. Гетар (10 экз.), Мецамор (13 экз.), Раздан (20 экз.), Дебед (134 экз.), Воротан (37 экз.), каналов окр. с. Овташат (Меймандар) (18 экз.) в течение 1994-2007 гг. Сбор и обработку материала (выбор орудий и способы лова, морфометрические измерения, схема описания и др.) проводили согласно принятым в ихтиологии методам исследования [10]. Последние 2 ветвистых луча спинного и анального плавников принимали как один. Статистическую обработку полученных данных проводили стандартными методами [11]. При сравнительном анализе морфометрических признаков использовали также литературные источники [1, 5, 6, 7, 12]. Морфометрическая обработка выборки р. Раздан выполнена Д. Василяном, а р. Дебет – Л. Хачатрян.

В работе использованы следующие сокращения: А-число лучей в анальном плавнике; аD-антедорсальное расстояние; аО-длина рыла; Cs-длина верхней лопасти хвостового плавника; Si-длина нижней лопасти хвостового плавника; Sm-длина средних лучей хвостового плавника; D-число лучей в спинном плавнике; hc-высота головы у затылка; H-наибольшая высота тела; h-наименьшая высота тела; hA-высота анального плавника; hD-наибольшая высота спинного плавника; io-ширина лба (межглазничного промежутка); l-длина тела от вершины рыла до конца чешуйного покрова (мм); lA-длина основания анального плавника; lс-длина головы; lD-длина основания спинного плавника; lP-длина грудного плавника; lрс-длина хвостового стебля; lV-длина брюшного плавника; ll₁-число чешуй в боковой линии; ll₂-число чешуй над боковой линией; ll₃-число чешуй под боковой линией; ll₄-число чешуй на хвостовом стебле; n-число изученных особей данной выборки; О-горизонтальный диаметр глаза; Оор-заглазничное расстояние головы; Р-число лучей в грудном плавнике; рD-постдорсальное расстояние; PV-расстояние между основаниями грудных и брюшных плавников; Q-масса, sp.br.-число тычинок на первой жаберной дуге; V-число лучей в брюшном плавнике; VA- расстояние между основаниями брюшных и анальных плавников; vert.-число позвонков; vert.a-число туловищных позвонков; vert.c-число хвостовых позвонков.

Результаты и обсуждение. Описание. У быстрянки водоемов бассейна р. Аракс в пределах Армении ll₁ 39-56, M=48.7±0.10 (n=434*); ll₂ 9-13, M=11.0±0.21 (n=21), ll₃ 5-7 (8, 10-12), M=6.7±0.36 (n=20), ll₄ 10-15, M=13.4±0.30 (n=21). D III 7-8(9,10), M=7.8±0.04 (n=454*); A III 10-13(14,15), M=11.6±0.08 (n=444*); P I 12-13, M=12.8±0.22 (n=5); V II 7 (n=5), sp.br. 7-8, M=7.4±0.27 (n=5) (*обозначены данные Дадикияна [7]). Глоточные зубы двурядные, очень редко – однорядные. Обнаружено 13 вариантов формулы глоточных зубов (n=22), частоты которых распределяются следующим образом: 1.4-5.2, 2.4-4.2 (по 0.18), 2.5-4.2 (0.14), 2.4-5.2, 2.5-5.1 (по 0.09), 1.4-5.1, 2.5-3.2, 1.5-4.3, 2.4-3.2, 2.3-5.1, 1.4-5.3, 2.4-4.1, 0.5-4.1 (по 0.05). Vert. 38-44, M=41.1±0.04 (n=434*), из которых

vert.a 19-21, включая 4 позвонка Веберова аппарата, $M=19.9\pm0.12$ ($n=28$), *vert.c* 20-22, $M=21.0\pm0.13$ ($n=28$). Всего обнаружено 8 вариантов соотношения туловищных и хвостовых позвонков, которые распределяются следующим образом ($n=28$): 19+21 (0.29), 19+20 (0.21), 20+22, 21+21 (по 0.14), 20+21 (0.11), 20+20, 21+20, 21+22 (по 0.04).

Тело сжато с боков. Рот конечный. Его вершина на уровне середины глаз. За брюшными плавниками киль, часто голый в своей задней половине. Боковая линия изогнута вниз в первой трети тела до начала спинного плавника, после – вверх до конца основания анального плавника. Спина от грязно-зеленой до темно-оливковой с синеватым отливом, бока – серебристые или чаще золотистые, брюшко – серебристо-белое. У живых рыб вдоль верхней половины тела, выше боковой линии, от жаберной крышки до начала хвостового плавника тянется темная полоса, отделенная от спины сероватым просветом. У фиксированных рыб эта полоса нечетко выражена. На чешуях боковой линии, у выходных отверстий, два продольных ряда темных, ярко выраженных точек. Спинной и хвостовой плавники от светло-серого до почти черного. Окраска грудных, брюшных и анального плавников от бесцветной до серой с оранжевыми основаниями.

Половой диморфизм морфометрических признаков слабо выражен. Наблюдаются незначительные различия между полами по *H*, *ID*, *PV*, *aD* и некоторыми другими признаками (табл. 1).

Размерная изменчивость морфометрических признаков. У быстрянки р. Дебед с увеличением размеров тела увеличивается *aO*, *H*, *ID*, уменьшаются - *hA*, *Cs*, *Cm*, *Ci*.

Сравнительные замечания. Основной причиной выделения армянской быстрянки послужила обнаруженная Дадикианом [5, 7] разница средних значений морфометрических признаков всех изученных быстрянок водоемов Армении со средними значениями соответствующих признаков быстрянок из 4-х различных водоемов Азербайджана – р. Алазань, Каркарчай, Кендаланчай и Нюргядычай [1]. Причем, всех быстрянок рек Азербайджана Дадикиан без морфометрического или другого анализа относил к подвиду восточная быстрянка, хотя Абдурахманов [1] отмечал неоднородность и широкий диапазон колебаний морфометрических признаков этой рыбы в водоемах соседнего с Арменией региона.

Согласно Дадикиану [5, 6], основные отличительные признаки армянской быстрянки от восточной (т.е. быстрянки водоемов Азербайджана) заключаются главным образом в разнице значений ветвистых лучей в анальном и спинном плавниках, *lpc*, *lA*, *hA*, *ID*, *hD*, *io* и *PV*, а также форме и длине лопастей хвостового плавника. Так, считается, что у армянской быстрянки *Cs* короче *Ci* в отличие от восточной быстрянки. Очевидно, что такой вывод Дадикианом сделан в результате сравнения усредненных значений по относительной длине лопастей быстрянки водоемов Армении с соответствующими значениями быстрянок водоемов Азербайджана, обобщенными Абдурахмановым [1]. Несмотря на то что последним автором были изучены 4 выборки ($n=213$) из различных рек Азербайджана, *Cs* измерена только у рыб из рр. Каркарчай и Кендаланчай ($n=50$).

В результате при усреднении значений всех морфометрических признаков относительная Cs быстринок рек Азербайджана в среднем оказалась длиннее, чем Ci , хотя все данные приведенной таблицы свидетельствуют о противоположном: у быстринок р.р. Каркарчай и Кендаланчай относительная длина Ci в среднем больше Cs (23.4 против 22.4 у быстринок р. Каркарчай и 23.8 против 22.0 у быстринок из р. Кендаланчай).

Таблица 1. Морфометрические признаки быстринки р. Дебед.

Признак	Самцы (n=67)			Самки (n=67)		
	M	m	lim	M	m	lim
Q	3.00	0.0	0.58-14.53	3.20	0.37	0.66-17.52
l , мм	52.8	1.30	37.4-87.6	53.0	1.44	35.8-90.1
ll_l	48.7	0.50	39-56	48.7	0.48	39-56
D	7.7	0.06	III 7-8	7.8	0.05	III 7-8
A	12.1	0.10	II-III 11-14	12.1	0.11	II-III (10)11-14
$sp.br.$	7.7	0.05	7-8	7.7	0.05	7-8
В % l						
aO	5.3	0.06	3.9-6.7	5.3	0.07	3.8-7.0
O	6.6	0.07	5.2-8.2	6.5	0.07	5.2-7.7
Oop	10.8	0.14	9.0-13.5	10.9	0.12	8.3-13.7
hc	16.9	0.20	14.0-20.6	17.3	0.20	14.1-23.7
lc	22.0	0.19	18.0-25.4	22.1	0.20	17.8-26.6
io	6.5	0.08	5.0-7.9	6.5	0.09	4.9-8.2
aD	54.2	0.23	48.0-58.3	53.6	0.23	48.6-58.6
pD	35.6	0.20	31.0-38.9	35.8	0.24	31.9-40.5
H	21.3	0.25	15.5-26.7	21.9	0.25	18.1-27.3
h	9.8	0.13	7.0-11.9	9.7	0.18	6.8-15.4
lpc	22.7	0.19	18.5-27.1	22.4	0.20	17.5-25.9
ID	11.9	0.12	9.8-14.6	11.6	0.13	9.3-14.9
hD	19.1	0.19	16.0-24.0	19.1	0.20	15.0-22.5
lA	15.7	0.19	12.1-19.0	15.9	0.17	13.2-20.2
hA	14.2	0.18	10.5-17.7	14.0	0.16	11.2-17.0
IP	19.3	0.12	16.8-21.8	19.2	0.12	16.6-21.7
IV	15.3	0.12	13.3-18.0	15.4	0.12	13.7-18.1
PV	22.5	0.20	18.8-25.9	23.0	0.24	17.8-28.2
VA	16.9	0.18	14.7-21.0	16.9	0.17	14.0-21.3
Cs	22.4	0.21	17.6-27.3	22.5	0.21	18.1-26.6
Cm	11.4	0.18	8.8-14.2	11.5	0.20	8.2-15.2
Ci	22.5	0.21	17.8-27.5	22.6	0.21	18.4-26.8
В % lc						
aO	24.2	0.26	20.9-32.7	24.3	0.27	20.1-30.5
O	30.3	0.33	23.7-38.8	29.8	0.28	26.4-36.3
Oop	49.3	0.41	38.8-58.0	49.4	0.37	43.9-55.3
hc	77.3	0.82	62.1-88.9	78.4	0.81	62.5-88.7
io	29.8	0.48	22.4-38.1	30.0	0.49	21.9-38.6

Возможно, что игнорирование учета данных по отдельным выборкам быстрянки рек Азербайджана со стороны Дадикияна и привело к ошибочному мнению о наличии различий в соотношении длины лопастей хвостового плавника между восточной и армянской быстрянками. В то же время, согласно нашим исследованиям, соотношение длины лучей хвостового плавника быстрянок весьма изменчиво. Так, у быстрянок р. Раздан с длиной тела 52,2-87,1 мм ($n=20$) нижняя лопасть хвостового плавника длиннее верхней в 56% случаев, короче в 25% случаев и равна верхней в 19% случаев, что наблюдается и у восточной быстрянки водоемов Грузии [12]. Отсюда однозначно можно сделать вывод, что соотношение длины лопастей хвостового плавника весьма изменчиво и не может служить надежным диагностическим признаком при выделении армянской быстрянки.

Важными признаками при выделении таксономических единиц у карповых рыб служат меристические признаки, особенно D и A , а также ll и $vert$ [9]. Из этих 4-х признаков Дадикиян [5] при описании армянской быстрянки выделил два - D и A , считая, что они в большей мере характеризуют новый таксон. При сравнительном анализе, проведенном Дадикияном [5, 7], наибольшая разница между армянской и восточной быстрянками пришлась на долю A ($t=16.0$). В то же время, A достоверно различался у армянских быстрянок различных рек, что наблюдается между выборками быстрянки р. Воротан и Мармарик, Воротан и Касах, Воротан и Ерер, Воротан и Арпа, Воротан и Веди, Арпа и Арагли-Джур [6]. При этом Дадикиян [6] отмечает, что наблюдается редукция A снизу вверх по течению реки, хотя вычисление коэффициента Спирмена ($r_s = 0.2114$ ($r_s^2 = 0.0447$)) указывает на практически полное отсутствие такого явления. Кроме этого, на основании данных Дадикияна [6, 7] можно заключить, что нет достоверных различий по A между быстрянками водоемов Армении и р. Каркарчай [1]. По нашим данным, также не обнаруживаются достоверные различия по этому признаку между изученными нами выборками быстрянки из рек Раздан, Гетар и Воротан с выборками из р. Каркарчай, а также р. Гетар и р. Кандаганчай. Учитывая отсутствие достоверных различий между отдельными выборками быстрянок Армении и Азербайджана по A , мы считаем недостаточно обоснованным его принятие в качестве диагностического признака при выделении армянской быстрянки.

Примерно такая же ситуация наблюдается и при использовании в качестве диагностического признака D . Согласно Дадикияну, D также достоверно различается у быстрянок различных рек Армении, что наблюдается между выборками быстрянки рр. Воротан и Мармарик, Воротан и Арагли-Джур, Воротан и Касах, Воротан и Арпа, Мармарик и Касах, Мармарик и Ерер, Мармарик и Веди, Касах и Арпа, Касах и Арагли-Джур, Касах и Ерер, Арпа и Ерер и др. [6]. В то же время при сравнении по тем же данным Дадикияна отсутствуют реальные различия по этому признаку между армянскими и кандаганчайскими быстрянками.

Другими отличительными диагностическими признаками армянской и восточной быстрянок могли бы служить *lpc* и *ID*. Однако эти признаки, согласно данным Дадикияна [6], весьма вариабельны, и при сравнении выборок из различных рек Армении обнаруживаются 48 (по *lpc*) и 39 (по *ID*) случаев достоверных различий из 72 возможных! В то же время по *lpc* армянская быстрянка практически не отличается по этому признаку от быстрянок из рр. Алазань и Каркарчай, а по *ID* близка к быстрянке р. Нюргадычай и занимает промежуточное положение между быстрянками р. Алазань и р. Нюргадычай (по данным Дадикияна [7] и Абдурахманова [1]). Отсутствуют также достоверные различия по *ID* между армянской быстрялкой и высокотелыми особями восточной быстрянки из оз. Паравани [12]. По нашим же данным, отсутствуют достоверные различия по *lpc* между быстрянками р. Раздан и Нюргадычай и Кендаланчай, а по *ID* - между быстрянками р. Раздан и Каркарчай.

Другие признаки, выделяемые Дадикияном как диагностические - *hD*, *hA*, *lA*, *PV*, *io*, согласно нашим исследованиям [9], весьма вариабельны, зависят от размерной изменчивости, полового диморфизма, внешних условий обитания и часто не имеют диагностической значимости при выделении таксонов.

Исходя из вышесказанного, а также из нечеткого разграничения ареалов армянской и восточной быстрянок на территории Закавказья, мы не находим правомочным выделение Дадикияном [5] быстрянки из водоемов Армении в отдельный подвид *Alburnoides bipunctatus armeniensis* Dadikyan, 1972 и считаем ее младшим синонимом *Alburnoides bipunctatus eichwaldi* (Filippi, 1863). В то же время из-за отсутствия реальных различий морфометрических признаков между быстрянками р. Дебед (табл. 1) и других рек Армении [5, 6, 7], Азербайджана [1] и Грузии [12], мы относим быстрянок рек куринского бассейна в Северной Армении к *Alburnoides bipunctatus eichwaldi* до ревизии и уточнения таксономического статуса всех быстрянок Закавказья и сопредельных регионов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдурахманов Ю. А. Рыбы пресных вод Азербайджана. Изд-во АН Аз.ССР. Баку, 407, с. 1962.
2. Аннотированный каталог круглоротых и рыб континентальных вод России, (Под ред. Ю.С. Решетникова), М.: Наука, 218 с. 1998.
3. Атлас пресноводных рыб России. В 2 т. (Под ред. Ю.С. Решетникова), М.: Наука, 1, 379 с. - 2, 253 с. 2003.
4. Барач Г. П. Тр. Севан. гидробиол. ст. 6. С.5-70. 1940.
5. Дадикиян М. Г. Вопр. ихтиологии. 12, вып. 3 (74). С. 566-569. 1972.
6. Дадикиян М. Г. Вопр. ихтиологии. - 13, вып. 1 (78). С. 79-90. 1973.
7. Дадикиян М. Г. Рыбы Армении. Ереван, Изд-во АН АрмССР. 245 с. 1986.
8. Евланов И.А., Козловский С.В., Антонов П.И. Кадастр рыб Самарской области. Тольятти: ИЭВБ РАН, 222 с. 1998.
9. Пипоян С. Х. Биолог. журн. Армении. 58, 1-2. с. 91-103. 2006.
10. Правдин И. Ф. Руководство по изучению рыб. М., Пищ. пром-сть, 376 с. 1966.
11. Урбах В. Ю. Биометрические методы. М., 415 с. 1964.
12. Эланидзе Р. Ф. Ихтиофауна рек и озер Грузии. Тбилиси, Мениереба, 320 с. 1983.

Поступила 16.01.2008



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1-2 (60), 2008

ՀՏԴ 636.5:(619.616.98:579.842.11(

ԹՈՉՈՒՆՆԵՐԻ ԿՈԼԻԲԱԿՏԵՐԻՈՋԻ ՀԱՐՈՒՑԻՉԻ ՇԻՃՈՒԿԱԲԱՆԱԿԱՆ ՏԻՊԱՎՈՐՈՒՄԸ

Մ.Ա. ՍԱՀԱԿՅԱՆ

Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան, Երևան

На птицефабриках Гетамеча и Лусакерта циркулируют 10 высокопатогенных штаммов кишечной палочки, которые являются причиной энзоотических вспышек колибактериоза.

Из выделенных вирулентных штаммов с птицефабрик только 4 были типизированы по “О” моновалентным иммунным сывороткам. К О1 моновалентной сыворотке 100% и 75% положительно реагировали штаммы N 7, 10 и 12, а к О2 с 75% штамм N 11. Эти штаммы могут быть использованы для получения биологического препарата в профилактических целях.

There are 10 virulent strains of *E. coli* which are circulated in poultry farms of Getamech and Lusakert and which are the reason of enzootic blazes of colibacteriosis.

Only 4 of virulent strains, which were separated from poultry farms, have been typezated with “O” monovalent immune serums. N 7, 10 and 12 strains are positively reacted by O1 monovalent serum with 100% and 75%. N 11 strain by O2 monovalent serum with 75%. These strains can be used for making biological preparation to prevent from the disease.

Գետամեջի և Լուսակերտի թռչնաբուծական համալիրներում շրջապտույտ է կատարում աղիքային ցուպիկի առավել վարակունակ 10 շտամ, որոնք պատճառ են հանդիսանում կոլիբակտերիոզի տեղաճարակային բռնկումներին:

Թռչնաֆաբրիկաներից անջատված վարակունակ շտամներից միայն 4-ն են տարբերակվել Օ միավալենտ իմուն շիճուկներով: Օ1-միավալենտ շիճուկի նկատմամբ 100% և 75%ով դրական են հակազդել թիվ 7-րդ, 10-րդ և 12-րդ շտամները, իսկ Օ2-ի հանդեպ՝ 11-րդ շտամը: Այդ շտամները կարող են օգտագործվել հիվանդության կանխարգելման կենսաբանական պատրաստուկի ստացման համար:

Կոլիբակտերիոզ - մանրէ - ազդուտինացիա - միավալենտ - շիճուկ, ինֆեկցիա

Բացահայտելով կոլիբակտերիոզի համաճարակային իրավիճակը Գետամեջի և Լուսակերտի թռչնաբուծական համալիրներում, մեր նախորդ հաղորդումներում ներկայացվել է նաև անջատված աղիքային ցուպիկի 16 շտամների վարակունակությունը սպիտակ մկների մոտ: Խնդիրն այն է, որ, չնայած բնության մեջ գոյություն ունեն *E.coli*-ի մեծաթիվ շիճուկաբանական տիպեր, սակայն դրանցից միայն որոշ մասն է առաջացնում կենդանիների և մարդկանց ստամոքսաաղիքային հիվանդություն:

Մեր առջև նպատակ է դրվել որոշել նշված թռչնաֆաբրիկաներում անջատված աղիքային ցուպիկի 10 վիբրուլենտ շտամների շիճուկաբանական պատկանելիությունը: Այդ նպատակով օգտագործել ենք Մեչնիկովի անվան □ԲԻՈՄԵԴ□ ձեռնարկությունից ստացված Օ1, Օ2, Օ4, Օ5, Օ6, Օ7, Օ8, Օ9, Օ11 Օ22, Օ25, Օ28, Օ32, Օ75, Օ85, Օ86, Օ119, Օ128, Օ143, Օ144, Օ157, Օ164 շիճուկաբանական տիպերից՝ թռչունների մոտ առավել տարածվածները:

Հայտնի է, որ թռչունների համար առավել յուրահատուկ և տարածված շիճուկաբանական տիպեր են համարվում Օ1, Օ2, Օ6, Օ8, Օ9, Օ11, Օ20, Օ78, Օ86, Օ119 [1,4,5]:

Տիպավորման համար օգտագործել ենք առավել տարածված Օ1, Օ2, Օ8, Օ9 և համեմատաբար քիչ հանդիպող Օ6, Օ11, Օ86, Օ119 շիճուկաբանական տիպերը:

Նյութ և մեթոդ: Միավալենտ չոր շիճուկների լուծման համար օգտագործել ենք նույն ծավալի (1մլ) 0,9 % կերակրի աղի լուծույթ, որպես հակաձին՝ 18-20 ժամյա աղիքային ցուպիկի տարբեր շտամների աճեցվածքները: Ըստ օպտիկական ստանդարտի՝ ստացվել է աճեցվածքների 1 միլիարդանոց մանրէական կախուկ կերակրի աղի ֆիզիոլոգիական լուծույթում: Վերջիններս ակտիվազրկել ենք ջրային բաղնիքում 100°-ի պայմաններում 30 ր տևողությամբ, այնուհետև ցենտրիֆուգել 15 ր տևողությամբ 3000 պտ/ր: Վերնստվածքային հեղուկը հեռացնելուց հետո խտանյութը 0,1 մլ քանակությամբ տեղավորել ենք միավալենտ շիճուկի մոտ, աստիճանաբար խառնել հակաձին և հակամարմին պարունակող կաթիլները և ագլյուտինացիայի հակազդումը հաշվել 3 ր ընթացքում:

Ագլյուտինացնող Օ-կոլի-շիճուկի և նույնանուն շտամի հակաձնի առկայության դեպքում դիտվում է հեղուկի լրիվ կամ մասնակի պարզեցում և մանրահատիկային ագլյուտինացիայի գոյացում: Հնարավոր ինքնաագլյուտինացման ստուգիչներ ենք համարել ակտիվազրկված և չակտիվազրկված հակաձինները ֆիզիոլոգիական լուծույթի և համապատասխան ագլյուտինացնող շիճուկների հետ:

Ագլյուտինացիան համարվում է 100 %-անոց, եթե լավ է արտահայտված մանրահատիկային սոսնձումը, իսկ հեղուկը պարզ է [++++]:

Եթե առկա է մանրահատիկային ագլյուտինացիան, սակայն նկատելի է հեղուկի թույլ պոտորություն, ագլյուտինացիան 75 % է [+++]:

Թույլ արտահայտված ագլյուտինացիայի դեպքում հեղուկը պոտոր է և նշանակում է ++ կամ 50 %-անոց արդյունք, իսկ 25% արդյունքի դեպքում նկատելի են հակաձին և հակամարմնի սոսնձման հետքեր՝ հեղուկի պոտորությունը ակնհայտ է: Բացասական արդյունքի վկայությունը ագլյուտինացիայի հստակ բացակայությունը և հեղուկի համասեռ պոտորությունն է:

Արդյունքներ և քննարկում: Թռչունների կոլիբակտերիոզի շիճուկաբանական ախտորոշումը Օ-կոլի-միավալենտ շիճուկների միջոցով կատարվել է վերը նշված աղիքային ցուպիկի 10 վիբրուլենտ շտամների նկատմամբ:

Ագլյուտինացիայի արդյունքները բերված են աղ. 1-ում:

Բերված տվյալներից երևում է, որ 8 միավալենտ Օ-կոլի շիճուկների փորձարկման արդյունքում աղիքային ցուպիկի 10 վիբրուլենտ շտամներից դրական են հակազդել 4-ը (40%), ընդ որում դրանցից 2-ը ցուցաբերել են բարձր յուրահատկություն և հակաձին-հակամարմին համակարգում սոսնձումը կազմել է 100% [++++], իսկ 2-ը 75% [+++]: Ուշագրավ է, որ թռչունների կոլիբակտերիոզի հարուցիչին յուրահատուկ Օ1 շիճուկային խմբի նկատմամբ սոսնձվել են հակաձնի 3 շտամներ [7, 10, 12], իսկ Օ2 շիճուկով N 11 շտամը: Մնացած 6 շիճուկների նկատմամբ մանրէական շտամները համարվել են տարաձին, չնայած թույլ (կասկածելի) ագլյուտինացիա է զգացվել N 2 և 13 շտամների փորձարկման ժամանակ՝ Օ9 և N 8 շտամը Օ119-ը կոլիշիճուկների հետ:

Աղյուսակ 1. Թռչունների կոլիբակտերիոզի շիճուկաբանական ախտորոշումը Օ-միավալենտ շիճուկներով

Շճաբանական տիպ	01	02	06	08	09	011	086	0119
Շտամ								
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	(	-	-	-
7	++++	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	(
9	-	-	-	-	-	-	-	-
10	+++	-	-	-	-	-	-	-
11	-	+++	-	-	-	-	-	-
12	++++	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	(	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	(	-	-	-
7	++++	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	(
9	-	-	-	-	-	-	-	-

E.coli-ի շիճուկաբանական տիպավորմանը վերաբերվող բազմաթիվ հետազոտական աշխատանքների արդյունքները վկայում են, որ ուսումնասիրվող բոլոր շտամները չէ, որ տիպավորվում են օգտագործվող միավալենտ շիճուկներով: Այսպես, թռչունների աղիքային ցուպիկի 24 շտամներից միավալենտ 15 շիճուկների հանդեպ դրական են հակազդել միայն 11-ը կամ 45.8% /6/: Կոլիբակտերիոզի էնզոոտիայի պատճառ համարվող, գրեթե համաձին շտամներով համաճարակային դրսևորումների մասին են նշում նաև Բաբանը և Վինոխոդովը [2]: Նրանց հետազոտություններով ևս բացահայտվել է, որ փորձարկվող շտամների միայն 46.2% է շիճուկատիպավորման ենթարկվել:

Բնորոշն այն է, որ օգտագործվող 10 և ավելի միավալենտ շիճուկների հանդեպ բոլոր դեպքերում հակաձինների իմունաբանական հակազդումը կատարվում է հատկապես Օ1 և Օ2 շճատիպերի նկատմամբ:

Բելիցկու և Պանիկարի [3] փորձարարական հետազոտությունների տվյալներով 15 միավալենտ շիճուկներով 58 շտամներից տիպավորվել է ընդամենը 21 (36%), որից 4-ը պատկանում են Օ78-ին, իսկ 17-ը՝ Օ111-ին:

Ընդհանրացնելով մեր և մի շարք հեղինակների կողմից կատարված շիճուկաբանական հետազոտությունների արդյունքները, հակված ենք նշել, որ թռչունների կոլիբակտերիոզի տեղաճարակի բռնկման հիմքում առավելապես ընկած են աղիքային ցուպիկի Օ1 և Օ2 շիճուկաբանական տիպերը:

Այսպիսով. Գետամեջի և Լուսակերտի թռչնաբուժական համալիրներում շրջապատյոտ է կատարում աղիքային ցուպիկի առավել վարակունակ 10 շտամ, որոնք պատճառ են հանդիսանում կոլիբակտերիոզի տեղաճարակային բռնկումներին:

Թռչնաֆաբրիկաներից անջատված վարակունակ շտամներից միայն 4-ն են տարբերակվել Օ միավալենտ իմուն շիճուկներով: Օ1-միավալենտ շիճուկի նկատմամբ 100% և 75%ով դրական են հակազդել N 7, 10 և 12 շտամները, իսկ Օ2-ի հանդեպ՝ 11 շտամը: Այդ շտամները կարող են օգտագործվել հիվանդության կանխարգելման կենսաբանական պատրաստուկի ստացման համար:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Алтухов Н. М., Афанасьев В. И., Башкиров Б. А. и др., Краткий справочник ветеринарного врача, М., с. 136-137, 1990.*
2. *Бабаева М. В., Виноходов О. В., Ветеринария, 10, с. 68-69, 1984.*
3. *Белицкий Б. И., Паникар И. И., Ветеринария, 12, с. 25-26, 1969.*
4. *Грошева Г. А., Савич Б. М., Малахова Л. С., Ветеринария 4, с. 65-66, 1970.*
5. *Лабораторные исследования в ветеринарии, с. 216, М., 1986г*
6. *Осколков В. С., Ибрагимов А. А., Голод Я. Р., Ветеринария 8, с. 70-72, 1978.*

Ստացվել է 23.01.2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581.132:581.17:581.193

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЛИСТЬЕВ И ПРОДУКТИВНОСТЬ БЫСТРОРАСТУЩИХ ГИБРИДНЫХ ТОПОЛЕЙ В УСЛОВИЯХ АРМЕНИИ: ЕРЕВАН

Г. Г. МОВСЕСЯН, В. А. ДАВТЯН, А. П. ХУРШУДЯН

Институт ботаники НАН РА, Ереван

Исследовали физиологическую активность листьев и продуктивность шестилетних деревьев девяти быстрорастущих гибридов тополя, произрастающих в условиях резко континентального климата, и бурых, малогумусных, карбонатных почв полупустынной зоны Армении. Выявлены существенные различия в листовом, хлорофилловом индексе, интенсивности фотосинтеза и водном режиме листьев гибридов, что рассматривается с точки зрения их адаптации к условиям жизни. Величины листового и хлорофиллового индексов и активность фотосинтеза обусловили интенсивность роста и продуктивность гибридных деревьев.

Ուսումնասիրվել է ինը տեսակի 6-ամյա հիբրիդային արագաճ բարդու տերևների ֆիզիոլոգիական ակտիվությունը և արտադրողականությունը Հայաստանի կիսաանապատային գոտում: Բացահայտված են էական տարբերություններ տերևային, քլորոֆիլային ինդեքսներում, ֆոտոսինթեզի ինտենսիվության և հիբրիդների տերևների ջրային ռեժիմում, որը դիտարկվում է նրանց՝ կյանքի պայմաններին ադապտացման տեսանկյունից: Տերևային և քլորոֆիլային ինդեքսների չափերը և ֆոտոսինթեզի ակտիվությունը ապահովել են աճման ինտենսիվությունը և հիբրիդների արտադրողականությունը:

Physiological activity of leaves and productivity of nine six year-old hybrid poplars have been investigated, which grow in the semi-desert zones of Armenia in the conditions of continental climate and on carbonated soils poor with humus. Significant differences were revealed in leaf and chlorophyll indices, photosynthesis intensiveness and water regime of leaves of hybrid poplars, which is considered from the point of view of their adaptation level to different living conditions. Leaf and chlorophyll indices and photosynthesis activity ensure the intensiveness of growth and productivity of hybrid poplars.

Физиологическая активность листьев - продуктивность деревьев

В последнее десятилетие в Армении проводятся интенсивные работы по расширению насаждений тополя за счет интродуцированных быстрорастущих гибридов. Такие насаждения были созданы также в Ереванском ботаническом саду. Климат здесь резко континентальный, с годичной амплитудой температуры до 60°.

Исходя из этого, мы задались целью изучить некоторые показатели физиологической активности листьев [9] и продуктивность ряда быстрорастущих гибридов тополя в почвенно-климатических условиях полупустынной зоны Армении.

Материал и методика. Объектами исследований служили быстрорастущие гибриды тополя: DN-1 “Allenstein”, DN-2 CV “Badem-491”, DN-5 CV “Gelrica”, DN-55, DN-70 “Raverdeau”, *Populus trichocarpa* Z-1, IH-262 “Russo”, IH-37/61 “Tripolo” (для удобства в дальнейшем по номерам).

Весной 1999г. черенки этих гибридов были посажены на территории Ботанического сада НАН Армении (г. Ереван, 1250м над ур. м.) по схеме 3х3 м. Физиологические исследования проводили в период бурного роста 6-летних деревьев в 2005г.

Поверхность листьев определяли методом контуров [12], интенсивность фотосинтеза [18], транспирацию - быстрым взвешиванием на торзионных весах, содержание различных форм воды по Маринчик [15]. Содержание слабо- и прочносвязанного с белково-липидным комплексом (БЛК) хлорофилла определяли по Осиповой [13] со спектрофотометрированием на СФ-26 по MacKinney [24]. Повторность определений 4-кратная, данные подвергали статистической обработке.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что в условиях полупустынного климата Еревана исследуемые гибриды различались по числу листьев. Максимальное их количество обнаружено у DN-70, минимальное у IH-262. Остальные гибриды занимали промежуточное положение. При этом некоторые из них формировали практически одинаковое количество листьев (DN-1, DN-5, Raverdeau и DN-55, IH-37/61). Средняя же поверхность одного листа была больше у гибридов DN-1 и IH-37/61, меньше у DN-55, затем у Z-1 и IH-262.

Из числа поверхности листьев слагался индекс листовой поверхности (ИЛП) гибридов. В этом отношении DN-70 и IH-37/61 обладали наибольшей величиной, а гибрид IH-262 с самым меньшим количеством и размерами листьев занимал последнее место.

Анализ данных показал, что у DN-1 большой ИЛП обеспечивается, благодаря увеличению размеров листьев, у DN-70 - их числа. Для гибридов DN-2, DN-5, Raverdeau и особенно для Z-1 и IH-262 для повышения этого показателя существенное значение имеет формирование большого числа листьев. Можно полагать, что подопытные гибриды в данных условиях проявляют различную морфогенетическую активность, характеризующую степень их приспособления к условиям произрастания.

Зависимость величины ИЛП от условий произрастания (гидротермический режим, плодородие почвы и т.д.) показана также в других исследованиях [19].

О различной степени приспособления быстрорастущих гибридов тополя к почвенно-климатическим условиям района исследований свидетельствуют данные о физиологической активности их листьев. Выявлено, что наибольшим содержанием хлорофилла в единице поверхности листа характеризуется гибрид IH-37/61, наименьшим – IH-262. Возникшие различия у гибридов в основном являются результатом

более заметного количественного изменения хлорофилла а, нежели b: между крайними данными соответственно 35.3% и 11.7%. При этом нельзя говорить об аналогичном физиологическом состоянии фотосинтетического аппарата исследуемых гибридов, что подтверждается данными о слабо- и прочносвязанной с БЛК формах хлорофилла. Оказалось, что содержание слабосвязанной с БЛК формы хлорофилла в листьях гибридов тополя варьирует в больших пределах с минимумом у Raverdeau и максимумом у Z-1. Однако эти данные не характеризуют физиологического состояния растений. Скорее всего об этом можно судить, исходя из относительного содержания фракции зеленых пигментов в их общей сумме. В этой связи выявлено, что в листьях гибридов DN-70, Raverdeau и ИН-37/61 слабосвязанная с БЛК форма хлорофилла занимает одинаковый и весьма низкий удельный вес. Последний примерно одинаков у DN-1 и DN-2, а у DN-5, ИН-262, DN-55 и Z-1 возрастает, доходя до 19% от общей суммы зеленых пигментов. Уровень же включения молекул хлорофилла в БЛК увеличивается в обратной закономерности. Именно повышение доли прочносвязанного с БЛК хлорофилла считается одним из важных показателей приспособления пигментного аппарата растений к условиям существования [10]. Следовательно, мы вправе заключить, что к полупустынным условиям Ереванского ботанического сада более приспособлен аппарат зеленых пигментов гибридов DN-70, Raverdeau, ИН-37/61, DN-1, DN-2.

В количественных показателях пигментного фона выявлены существенные различия в хлорофилловом индексе гибридов тополя. Он был выше у ИН-37/61, у DN-70, по сравнению с последним, этот показатель снижался всего на 6.1%, а у остальных гибридов от 18.3 (DN-1) до 73.5% (ИН-262).

На наш взгляд, выявленные различия в хлорофилловом индексе гибридных тополей являются результатом развитости их листового аппарата, чем они отличались сильнее, нежели содержанием зеленых пигментов.

Неодинаковая реакция к резко континентальному климату Еревана обусловлена также различной интенсивностью фотосинтеза опытных растений.

Из результатов исследований видно, что самая интенсивная ассимиляция CO_2 наблюдается у гибридов ИН-37/61 и DN-70. Далее по убывающему ряду группируются следующим образом: DN-1 и Raverdeau, DN-2 и DN-5, DN-55 и Z-1. Самая низкая интенсивность фотосинтеза обнаружена у гибрида ИН-262, который меньше ассимилировал CO_2 , чем ИН-37/61 или DN-70 (более 40%).

В литературе высказывается мнение о том, что различия в интенсивности фотосинтеза растений возникают в результате неодинаковой интенсивности транспорта электронов, потенциальной возможности хлоропластов к восстановлению акцепторов электронов, активности фотофосфорилирования, степени сопряженности энергетических процессов, фотохимической активности единичного хлоропласта и т.д. [1,8]. Вероятно, в условиях Еревана эти параметры у различных гибридов меняются в различной степени, обуславливая уровень ассимиляции CO_2 ими.

В известной мере последний был обусловлен и ассимиляционными числами, характеризующими "работоспособность" хлорофилла гибридов тополя. Они выше у гибридов DN-70 и ИН-37/61; DN-1, DN-2, DN-5 и Raverdeau отличались средними, DN-55, Z-1 и ИН-262 - низкими ассимиляционными числами.

Различия в физиологической активности листьев быстрорастущих гибридов тополя проявлялись и в их водном режиме [22]. Несмотря на то что абсолютная разница между крайними значениями общей обводненности листьев (DN-70 и ИН-262) не превышала 3.6%, тем не менее обнаружены существенные расхождения в содержании свободной и связанной воды. Высокое содержание первой (40-42% от сырого веса) и низкое второй (23 – 25% от сырого веса) было присуще листьям гибридов DN-1, DN-2, DN-5, DN-70, Raverdeau и ИН-37/61; DN-55 и Z-1 по этим показателям занимали среднее место, тогда как листья ИН-262 обладали наименьшим содержанием свободной и наибольшим связанной воды. Условия опыта те же, что и при фотосинтезе.

С той же последовательностью убывало соотношение указанных форм воды (1.60-1.81; 1.38-1.42 и 1.14), обуславливающее уровень жизненных процессов растений [14]. В этом отношении нами выявлена прямая связь между интенсивностью фотосинтеза и соотношением свободной и связанной воды. Однако в отношении интенсивности транспирации листьев такая связь не всегда обнаруживалась. Так, деревья гибридов DN-1, DN-2, Raverdeau с высоким содержанием свободной, меньшим связанной и повышенным их соотношением намного меньше транспирировали, чем таковые у ИН-262, у которых отмеченные показатели водного режима представлены обратной закономерностью.

Не сохранилась четкая закономерность также в уровнях интенсивности фотосинтеза и транспирации.

У гибридов DN-1, DN-2 сравнительно высокая интенсивность фотосинтеза совпадала с низкой, у ИН-37/61, и у DN-70 с высокой транспирацией, а у интенсивно транспирирующего гибрида ИН-262, наоборот, ассимиляция CO_2 находилась на самом низком уровне.

Такая картина физиологической активности листьев выражает адаптационные возможности быстрорастущих гибридов тополя, что, вероятно, объясняется изменением как внутренних характеристик листьев (водный дефицит, потенциал, устьичная проводимость и др.), так и параметров в системе почва - растение - атмосфера [4, 23, 25, 27].

Таким образом, в условиях резко континентального климата Еревана подопытные гибриды тополя проявляют различную физиологическую активность листьев, что отражается на росте и продуктивности деревьев.

Исследования показывают, что ростовые процессы интенсивно протекали у деревьев гибрида ИН-37/61. Гибриды DN-1, DN-2, DN-70 и Raverdeau характеризуются близкими биометрическими данными, при этом, однако, уступая ИН-37/61 по высоте на 0.9-1 м, среднегодовым приростом на 20-25 см, по диаметру ствола у основания на 24-29 мм, а на высоте 1.3 м на 12-15 мм. У Z-1 и ИН-262 снижение этих показателей было

намного значительней. Известно, что в новых условиях произрастания адаптивные проявления растений приводят к адекватному изменению гомеостаза, в связи с чем изменяются физиологические параметры их органов [5]. Последние влияют на интенсивность роста, на основании чего считается, что она определяется адаптационной способностью и пластичностью растений [2, 7, 20]. Естественно, что в результате сдвигов в интенсивности физиологических процессов в новых условиях произрастания происходят заметные изменения продуктивности растений. В данном случае речь идет о выходе хозяйственно ценной продукции – деловой древесины гибридов тополя, который был выше у ИН-37/61. Гибриды DN-70 и Raverdeau, с одной стороны, DN-1 и DN-2 – с другой формировали одинаковый объем древесины. При этом первые уступали ИН-37/61 соответственно на 35.3 и 36%, а последние – на 40 %. У остальных гибридов продуктивность падала значительно – от 2 до 5 раз.

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что уровень продуктивности растений во многом обусловлен интенсивностью фотосинтеза [17, 21] и хлорофилловым [3, 16] индексом. Наши данные согласуются с этими положениями и показывают, что упомянутые параметры высоки у гибрида ИН-37/61 и низки – у ИН-262. У остальных гибридов эти внутренние факторы лежат в промежутке максимума и минимума, в соответствии с чем и выражалась их продуктивность.

Результаты проведенных исследований позволили сделать некоторые практические предложения.

Исходя из данных физиологических показателей листьев и продуктивности деревьев, считаем, что в почвенно-климатических условиях полупустынной зоны Еревана в производственных целях необходимо, в первую очередь, выращивать гибрид ИН-37/61. В этих целях, а также для озеленения пригодны DN-70 и Raverdeau. DN-1; DN-2 и DN-5 следует выращивать исключительно в целях декоративного озеленения, а DN-55, Z-1 и ИН-262 исключить из ассортимента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беденко В.П., Сидоренко О.И., Уразалиев Р.А. Мат-лы Респ. конф. “Пробл. теор. и прикл. генет. в Казахстане”, Алма - Ата, с. 12-17, 1990.
2. Вилголаски Ф.Е., Бот. ж., 75, #2, с. 203-206, 1990.
3. Давтян В.А., Казарян В.В., Арутюнян Р.Г. IV съезд об-ва физиол. раст. России “Физиология растений - Наука III тысячелетия” (Межд. конф.) Тез. докл., I, М., с. 41, 1999.
4. Казаков Е.А., Казакова С.М., Гуляев Б.И. Физиол. и биохим. культур. раст., 17, # 6, с. 556-562, 1985.
5. Казарян В.В. Автореф. докт. дисс. с. 43, Ереван, 1992.
6. Крамер П., Козловский Т. Физиология древесных растений. М., Гос. Лесбумиздат, 627 с., 1963.
7. Красичкова Г.В., Асоева Л.М., Тилляр Ю.Е., Сангинов Б.С., Докл. ВАСХНИЛ, 9, с. 21-24, 1990.

8. *Криницкий Г.Т.* Мат-лы 40 научно-техн. конф., Львов. лесотехн. ин-та (лесохоз. секц.) Львов, с. 78-82, ДЕП, во ВНИИУ лес. Ресурс 25.04.91. # 862 - Л. 91, 1991.
9. *Куренкова С.В.* Тр. Коминауч. Центра Ур.О. АН СССР, с. 33-47, 1990.
10. *Марукян С.М.* Леса агрономического значения и хозяйство в них. М., Изд-во сельхоз. литературы журналов и плакатов, 263 с., 1962.
11. *Ничипорович А.А., Строганова Л.Е., Чмора С.Н., Власова М.П.* Фотосинтетическая деятельность растений в посевах. М., Изд-во АН СССР, с.160, 1961.
12. *Осипова О.* Докл. АН СССР, 57, # 8, с. 799-801, 1947.
13. *Сказкин Ф.Д., Ловчиновская Е.И., Миллер М.С., Аникиев В.В.* Практикум по физиологии растений., М., "Советская наука", с.339, 1958.
14. *Турцева Н.В., Шалова И.Г.* Итоги конф. мол. ученых и спец., Казань, с. 9-10, 1989.
15. *Чайка М.Т., Михайлова С.А., Климович А.С., Кабашишникова Л.Ф.* Контроль (НИИ с. х. Юго-Востока НПО "Элита Поволжья", Саратов, с. 187-193, 1990.
16. *Чатский И., Славик Б.,* Полевой прибор для определения интенсивности фотосинтеза. Biol. plantar., 2(2), с. 107-112, 1960.
17. *Швецова В.М.* Тр. Коминауч. Центра Ур. О. АН СССР, # 107, с. 27-32, 1990.
18. *Шевелуха В.С.* В. сб.: "Регуляция адаптивных реакций сельскохозяйственных растений", Кишинев, Изд-во "Штиница", с. 3-11, 1987. Bhatt J.G.Z. Asker und Pflanzenbau, 159, 4, 264-268, 1987.
19. *Kimenov G.P., Markowska Yu.K., Tsonev T.D.* Photosynthetica, 23, # 3, p. 368-371, 1989.
20. *MacKinney G. J.* Biol. Chem., 140, # 2, p. 315-320, 1941.
21. *Noltsakis B., Tsiovaras C.,* Seasonal changes in components of water potential and leaf area growth rate in kermes oak. Acta oecol., 11, # 3, p. 419-427, 1990.
22. *Price D.T., Black T.A.* Agr. and Forest Meteorol., 50, #3, p. 139-158, 1990.

Поступила 10.03. 2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК-581.13

О МЕТАБОЛИЗМЕ КОРНЕЙ ДРЕВЕСНЫХ ОСТАТОЧНЫХ ЛЕСОВ СЕВАНСКОГО БАССЕЙНА

В.В. КАЗАРЯН, В.А. ДАВТЯН, А.Н. АМИРБЕКЯН

Институт ботаники НАН РА, Ереван

Изучали углеводно-азотный обмен древесных остаточных лесов Арегунийского хребта и Артанишского заповедника, отличающихся почвенно-климатическими условиями.

Выявлены различия в метаболизме корневых систем лиственных и хвойных пород, которые отражают как их видовые особенности, так и механизмы приспособления к условиям жизни.

Ուսումնասիրվել է ածխաջրածնային և ազոտային փոխանակությունը Սևանի ավազանի տարբեր միկրոկլիմայական պայմաններով օժտված Արեգունի լեռնաշղթայի և Արտանիշի արգելոցի մնացորդային անտառների ծառատեսակներում:

Տարբերություններ են վեր հանվել սաղարթավոր և ասեղնատերևավոր տեսակների արմատային համակարգի մետաբոլիզմում, որոնք արտացոլում են ինչպես տեսակային առանձնահատկությունները, այնպես էլ կենսա-պայմանների բոլորի հարմարվողականության մեխանիզմները:

It was investigated carbohydrate-nitrogenous exchange of woody roots residual forests of Sevan basin in different soil-climatic conditions of Areguny range and Artanish reserve. Differences are revealed in the root systems metabolism of hardwood and coniferous rocks, it reflects the species belonging as well as mechanism of plant adaptation to the conditions of existence.

Остаточные леса – корневая система – метаболизм

Конкретные места произрастания характеризуются определенным комплексом факторов внешней среды и соответственно им перестраиваются морфофизиологические показатели растений.

В ходе эволюции сочетание форм приспособительных изменений в определенных условиях приводит к состоянию адаптации [3], которая обеспечивает не только выживание индивидуума, но и его успешное существование [12].

В высокогорных напряженных условиях адаптивность выражается в повышении способности растений наиболее полно ассимилировать необходимые для жизни факторы, в результате чего повышается их общая продуктивность [6]. Яркой иллюстрацией этого являются представители остаточных лесов Севанского бассейна.

Следует отметить, что одним из главных условий приспособления растений является жизнедеятельность корней, которая в целостной системе растительного организма обуславливает его стойкость в данных условиях существования.

В остаточных лесах Севанского бассейна нами проведены много-гранные экофизиологические исследования надземной части растений [4, 8], между тем изучение корневой деятельности представителей остаточных лесов Севанского бассейна помогло бы выявить механизм их приспособления в целях использования в лесовосстановительных работах.

Материал и методика. Исследования проводили в остаточных лесах Севанского бассейна на склонах Арегунийского хребта и на территории Артанишского заповедника. Объектами исследования служили в Арегуни дуб крупнопольниковый (*Quercus macranthera* Fisch. et Mey.), ясень обыкновенный (*Fraxinus oxycarpa* Will.), ива козья (*Salix caprea* L.), можжевельник длиннолистный (*Juniperus oblonga* M.B.), м. многоплодный (*J. polycarpus* C. Koch.): в Артанише – рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), р. двойственная (*S. dualis* Zinserl.), р. Айастанская (*S. hajastana* Gabr.), м. длиннолистный, м. многоплодный.

Содержание углеводов определяли микрометодом Хагедорн-Иенсена, форм азота по Кьельдалю [2], свободных аминокислот по [9]. Проанализировано по 6 деревьев каждого вида, повторность определений 4-6 кратная.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований показали, что условия Арегунийского хребта по сравнению с Артанишем благо-приятствовали накоплению большого количества сахаров и крахмала в корнях лиственных пород (табл. 1).

Видимо, у последних интенсивно протекают полимеризация и повторное использование сахаров, что с нашей точки зрения является одним из главных условий приспособления к сезонным изменениям года [7].

Таблица 1. Содержание углеводов в корнях древесных остаточных лесов Севанского бассейна

Виды	Углеводы, %/сух. вес		
	сумма	растворимые	крахмал
	Арегуни		
Дуб крупнопыльниковый	13.12	8.26	4.86
Ясень остроплодный	11.90	7.84	4.06
Ива козья	14.20	8.93	5.27
Можжевельник длиннолистный	10.19	6.71	3.48
М. многоплодный	12.65	8.52	4.13
	Артаниш		
Рябина обыкновенная	10.26	6.64	3.62
Р. двойственная	11.02	6.98	4.04
Р. айастанская	12.71	7.93	4.78
М. длиннолистный	11.56	6.22	5.34
М. многоплодный	13.21	7.65	5.56

Почвенно-климатические условия местности имели определяющее значение для углеводного обмена в корнях хвойных. Ярko выраженные сухие горно-степные условия Арегунийского хребта направляют углеводный обмен в сторону интенсивного синтеза сахаров, тогда как сравнительно умеренные климатические условия Артаниша – их полимеризации до крахмала. Из этого следует, что в корнях арегунийских хвойных представителей имеет место интенсивное использование сахаров, требующее меньших энергетических затрат, что является одним из жизнеобеспечивающих механизмов приспособления. В данном случае блокируется полимеризация сахаров в крахмал, которая, согласно Мелехову [10], рассматривается как реакция защитного торможения метаболизма.

Таблица 2. Содержание азотистых соединений в корнях древесных остаточных лесов Севанского бассейна

Виды	Азот, мг/г сух.веса			Амино-кислоты, мг/г сух.веса	Аминный азот, мг/%	% аминного азота от общего	% аминного азота от небелкового
	общий	белковый	небелковый				
	Арегуни						
Дуб крупно-пыльниковый	11.17	7.81	3.36	1.28	18.3	1.64	5.44
Ясень остро-плодный	10.29	7.57	2.72	0.97	14.0	1.36	5.15
Ива козья	12.73	8.05	4.68	1.06	15.1	1.18	3.23
Можжевельник длиннолистный	14.21	9.14	5.07	1.22	17.4	1.22	3.43
М. много-плодный	15.36	10.26	5.10	1.31	19.0	1.23	3.72
	Артаниш						
Рябина обыкновенная	13.32	9.81	3.51	0.78	11.1	0.83	3.30
Р. двойственная	12.43	7.76	4.67	0.89	12.7	1.02	2.72
Р. айастанская	13.69	10.48	3.21	0.86	12.3	0.90	3.83
М. длинно-листный	12.74	8.83	3.91	1.37	19.6	1.53	5.01
М.много-плодный	14.46	9.94	4.52	1.43	20.4	1.42	4.51

Вероятно, в более умеренных условиях Артаниша крахмал накапливается с целью использования в гетеротрофный период питания в годичном цикле, при котором поддерживается жизнедеятельность растений за счет готовых органических веществ [11].

Рассматривая углеводный обмен в надземных частях исследуемых растений [4] и в корневой системе в целом, приходим к выводу, что сахара, включаясь в круговорот веществ, обеспечивают рост корней, их поглощательную активность и водный режим [1, 13].

Углеводный обмен тесно связан с азотным, который является важнейшим звеном корневой метаболизма (табл. 2).

О МЕТАБОЛИЗМЕ КОРНЕЙ ДРЕВЕСНЫХ ОСТАТОЧНЫХ ЛЕСОВ СЕВАНСКОГО БАССЕЙНА

При сравнении лиственных пород выяснилось, что в условиях Арегуни содержание форм азота ниже, а количество аминокислот выше, чем в Артанише. В отношении хвойных получена обратная картина.

Можно полагать, что в Арегуни при высоком содержании растворимых сахаров в лиственных включение азота в органические соединения было направлено в основном в сторону синтеза аминокислот, которые играют большую роль в регуляции водного обмена растений [13].

В Артанише содержание растворимых сахаров и аминного азота у лиственных пород меньше, однако полученные данные позволяют заключить, что включение аминного азота в белковую фракцию протекает более интенсивно, о чем свидетельствует тенденция повышения количества белкового азота. У хвойных наблюдается уменьшение содержания сахаров с одновременным повышением количества аминокислот и доли белкового азота в общем. В этом процессе, вероятно, велика роль крахмала, который, расщепляясь на сахара, способствует интенсификации синтеза азоторганических соединений [4].

Обобщая наши данные, можно заключить, что при оценке углеводно-азотного метаболизма корневой системы растений остаточных лесов Севанского бассейна необходимо учитывать комплекс климатических и почвенных факторов, что в совокупности может быть использован в лесовосстановительных работах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Байтулин И.О. Корневая система сельскохозяйственных культур. Алма-Ата „Наука”. 244 с., 1976.
2. Белозерский А.Н., Проскуряков Н.И. Практическое руководство по биохимии растений, М., „Советская наука”, 387 с., 1951.
3. Горьшнина Т.К. Экология растений М., „Высшая школа”, 367 с., 1979.
4. Давтян В.А., Казарян В.В., Симонян Р.К. Биолог. ж. Армении, 3-4 (59), с. 169-172, 2007.
5. Даффус К., Даффус Дж. Углеводный обмен растений. М. ВО „Агропромиздат”, 176 с., 1987.
6. Казарян В.О. Физиологические аспекты эволюции от древесных к травам. Л., „Наука”, 350 с., 1990.
7. Казарян В.В. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1992.
8. Казарян В.В., Давтян В.А., Мартиросян В.С. Докл. НАН Армении, 107, 1, с. 98-403, 2007.
9. Маркосян Л.С. Изв. АН Арм.ССР, 11, 12, с. 117-127, 1958.
10. Мелехов Е.И. Тез. докл. Всесоюз. конф. „Проблемы физиологии и биохимии древесных растений”, Красноярск, с. 104, 1982.
11. Новицкая Ю.Е. Тез. докл. Всес. конф. „Проблемы физиологии и биохимии древесных растений”. Красноярск, с. 46-47, 1982.
12. Работнов Т.А. Фитоценология. М., Изд-во Моск. Ун-та., 384 с, 1975.
13. Слейчер Р. Водный режим растений. М., „Мир”, 365 с., 1971.

Поступила 26.03.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 547.538.141:577.151.52

ИЗУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ПЕНОГАСИТЕЛЕЙ НА БИОСИНТЕЗ L - ОРНИТИНА

А.А. ВАРДАНИЯН, Ф.Н. ТХРУНИ, Ц.Р. БАЛАБЕКЯН,
А.Е. АГАДЖАНИЯН, А.С. САГИЯН

НИИ Биотехнологии, Ереван

Исследовано влияние различных пеногасителей на продуктивность биосинтеза L-орнитина. Отобраны наиболее эффективные пеногасители и определены оптимальные режимы их применения. Показано отрицательное действие некоторых из них на технологические показатели биосинтеза L-орнитина.

Հետազոտվել է L-օրնիթինի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա տարբեր տիպի փրփրամարիչների ազդեցությունը: Ընտրվել են բարձր արդյունավետության փրփրամարիչներ և մշակվել են դրանց կիրառման օպտիմալ ռեժիմները: Ցույց է տրվել ցածր արդյունավետության փրփրամարիչների կիրառման բացասական ազդեցությունը L-օրնիթինի կենսասինթեզի տեխնոլոգիական ցուցանիշների վրա:

The effect of different antifoaming agents on the L-ornithine biosynthesis productivity has been studied. The most efficient antifoaming agents have been selected, and the optimum modes of their application have been determined. The negative effect of low efficient antifoamers has been revealed upon the technological parameters of the L-ornithine biosynthesis.

Пеногаситель - пеногашение - культуральная жидкость - ферментер - ферментация - аминокислота

Процесс ферментации L-орнитина сопровождается образованием пены, интенсивность которого зависит от гидродинамических условий, состава компонентов питательной среды, продуктов метаболизма, температуры, вязкости среды, pH и других параметров. Пенообразование вызывает ряд технологических и экономических затруднений, нарушает ритмичность производственного цикла вследствие забивания пеной оборудования и коммуникаций, снижает полезную емкость ферментеров,

нарушает асептические условия. Кроме того, пенообразование существенно влияет на скорость растворения кислорода.

В литературе имеются многочисленные данные о влиянии пеногасителей на биосинтез аминокислот [1-5]. Однако такие данные практически отсутствуют для биосинтеза L-орнитина. В связи с этим актуальным является подбор эффективного пеногасителя и определение оптимального режима пеногашения.

Реализация подавления или ограничения вспенивания требует материальных затрат, однако они быстро окупаются за счет сокращения потерь целевого продукта, увеличения производственной мощности предприятия, повышения надежности технологических систем.

Материал и методика. В качестве продуцента L-орнитина использовали штамм *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66, ауксотрофный по аргинину и цитруллину, который был получен методом химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина. Штамм-продуцент обладает устойчивостью к стрептомицину. Выращивание и поддержание его проводили с использованием мясопептонного агара.

В качестве жидкого посевного материала использовали 16-18 - часовую культуру *C. glutamicum* ЦФ-66, выращенную в посевной среде следующего состава, %: сахарный песок - 2,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 1,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; KH_2PO_4 - 0,1; CaCO_3 - 2; гидролизат дрожжей - 4,0; K_2HPO_4 - 0,05; NaH_2PO_4 - 0,05; биотин - 500 мкг/л. Стерилизацию проводили в автоклаве при 130° , без выдержки. Значение pH после стерилизации 7,5-7,8.

Выращивание посевного материала проводили в колбах ёмкостью 750 мл с объемом среды 70 мл на круговой качалке 240 об/мин в течение 16-20 ч при 30° . В качестве инокулята использовали суспензию клеток *C. glutamicum* ЦФ-66, полученную методом смыва со скошенного мясопептонного агара после выращивания в течение 18-20 ч. Определение количества биомассы (ОП) проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 ($\lambda=540$ нм, кювета №3).

В качестве инокулята при ферментации использовали 18-часовой посевной материал бактерий *C. glutamicum* ЦФ-66 в количестве 10 % от объема ферментационной среды. Определение среднего уровня накопления L-орнитина в колбах проводили ферментацией в пяти независимых опытах на ферментационной среде следующего состава, %: сахарный песок - 12; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; KH_2PO_4 - 0,1; CaCO_3 - 3,0; гидролизат дрожжей - 8,0; K_2HPO_4 - 0,05; NaH_2PO_4 - 0,05; биотин - 500 мкг/л. Режим стерилизации ферментационной среды проводили при 130° , без выдержки. Значение pH после стерилизации до 7,6-7,9 доводили 40 % -ным раствором NaOH.

Биосинтез проводили в 10-литровом ферментере марки «Biostat-S» с рабочим объемом 7,0 л. Для биосинтеза использовали ферментационную среду следующего состава, %: сахарный песок - 12,0; гидролизат дрожжей - 8,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,25; KH_2PO_4 - 0,1; CaCO_3 - 4,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,5; K_2HPO_4 - 0,05; NaH_2PO_4 - 0,05; биотин-500 мкг/л. Режим стерилизации ферментационной среды 125° , выдержка 30 мин, pH после стерилизации 7,4-7,6. Раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ стерилизовали отдельно при таких же условиях. Раствор биотина стерилизовали отдельно на водяной бане. Биосинтез орнитина проводили при температуре $30\text{--}32^\circ$. К объему питательной среды в количестве 7 л добавляли 280 мл посевного материала (биомасса с оптической плотностью ОП = 0,13-0,15).

Культивирование осуществляли при следующих условиях: скорость вращения мешалки 650 об/мин, расход воздуха 6,0 л/мин, температура $30\text{--}32^\circ$, исходный pH среды 7,4-7,6. При пенообразовании в ферментер подавали стерильный пеногаситель пропинол Б-400.

Температуру в лабораторном ферментере регулировали автоматически с точностью до $0,05^\circ$.

Количество L-орнитина в процессе ферментации определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках марки «Silufol» и аминокислотном анализаторе марки ААА-339.

В качестве критериев пенообразующей способности культуральной жидкости и оценки эффективности применения пеногасителей были выбраны следующие показатели:

- концентрация L-орнитина;
- пенообразующая способность культуральной жидкости (q);
- эффективность подавления пены;
- эффективный расход пеногасителя (Сэ), обеспечивающий устранение пенообразующей способности;
- продолжительность ферментации.

Пенообразующую способность культуральной жидкости определяли по следующей формуле [3]:

$$q = H_n \cdot \tau_n / \tau_p,$$

где H_n - высота столба пены, см; τ_n - время вспенивания, ч; τ_p - время произвольного разрушения пены, ч.

Результаты и обсуждение. На начальном этапе исследований изучали пенообразующую способность культуральной жидкости (КЖ) в разных фазах культивирования продуцента. На рис.1 приведены данные о вспенивании КЖ в процессе ферментации.

Как видно из графика, пенообразующая способность культуральной жидкости в процессе ферментации менялась. При отсутствии пеногасителя в составе питательной среды наблюдалось вспенивание КЖ после 10-12 ч ферментации. Максимальное пенообразование наблюдалось в конце экспоненциального роста культуры и в конце стационарной фазы продуцента. Затем пенообразующая способность КЖ снижалась до 75-80% от максимального уровня, а к 45-60 ч культивирования интенсивность пенообразования вновь возрастала и к концу ферментации достигала 90-95% по отношению к максимальному уровню.

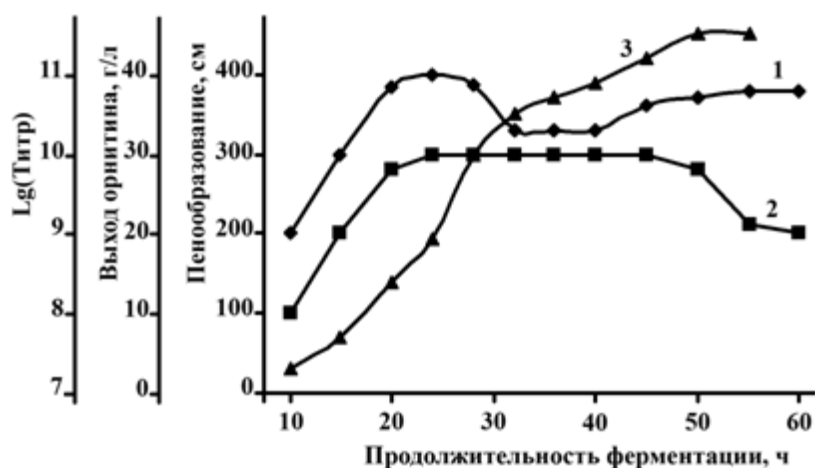


Рис. 1. Зависимость биосинтеза L-орнитина от пенообразования: 1- интенсивность пенообразования, q; 2 - титр культуры, Lg(титр); 3 - выход орнитина, г/л.

Вышеуказанные изменения свойств КЖ можно объяснить изменениями в метаболизме культуры, приводящими к выделению в среду метаболитов, способствующих пенообразованию КЖ. Кроме того, метаболиты могут влиять на физико-химические свойства КЖ и соответственно на характеристику пены. В дальнейшем с целью подбора эффективного пеногашения исследовали влияние различных поверхностно активных веществ (ПАВ), относящихся к различным химическим классам, на синтез L-орнитина. Результаты проведенных экспериментов представлены в табл.1.

Таблица 1. Сравнительные оценки эффективности различных пеногасителей при синтезе L-орнитина

Пеногаситель	q, см	Концент. пеногас., %	Эффективн. пенодавления пены, %	Концентр. L-орнитина, %	Продолж. ферментации, ч	Форма внесения пеногасителя
Пеногаситель* PSL-2	480	0,1	95	90	64-68	в чистом виде
Пеногаситель* PSL-2, 1,0% водн. эмульсия	470	0,15	90	85	64-68	водн. эмульсия
Пеногаситель** SL-04-204	420	0,1	100	100	56-60	в чистом виде
Пеногаситель** SL-04-2040, 5% водн. эмульсия	400	0,25	90	95	56-60	водн. эмульсия
Антипенит FM-111	430	0,2	85	75	60-64	в чистом виде
Пропинол Б-400 10% водн. эмульсия	460	0,1	95	95	56-60	водн. эмульсия
Пропинол Б-400	450	0,2	95	95	56-60	в чистом виде
Полиметилсилоксан ПМС-200	460	0,15	85	75	68-72	в чистом виде
Полиметилсилоксан ПМС-2007	470	0,1	90	85	56-60	в чистом виде
Гидроксиметил-силоксан ПГЖ-891	420	0,2	75	70	64-68	в чистом виде
Масло подсолнечное	430	0,35	95	65	64-68	в чистом виде
Жир каштановый	450	0,3	90	60	64-68	в чистом виде
Масло соевое	400	0,4	85	65	64-68	в чистом виде
Олеиновая кислота	440	0,2	70	72	64-68	в чистом виде

* - препарат производства ЧССР; ** - препарат производства ФРГ;

о - содержание L-орнитина в культуральной жидкости составляло 52 г/л.

Приведенные в табл.1 данные показывают, что наиболее эффективным пеногасителем при ферментации L-орнитина являются препараты производства ФРГ SL-04-204 в чистом виде и 5%-ной водной эмульсии пеногасителя SL-04-204 (0,1% от объема питательной среды), а также пропинол Б 400 (Россия) и 10% - ная водная эмульсия пропинола Б-400, применение которых позволяет получить наибольший выход L-орнитина при продолжительности ферментации 56-60 ч. При применении таких пеногасителей как кашалотовый жир, подсолнечное масло, соевое масло пенообразующая способность КЖ снижалась таким же

образом, как и в случае с пеногасителем SL-04-204 и пропинола Б-400, однако эти пеногасители оказывали отрицательное влияние на биосинтетическую активность штамма-продуцента.

Экспериментально установлено, что пеногаситель необходимо добавлять после появления небольших очагов пены и подавать его непрерывно с такой скоростью, чтобы количество добавляемого за весь процесс пеногасителя не превышало допустимую эффективную концентрацию.

Таким образом, для биосинтеза L-орнитина подобран эффективный пеногаситель – SL-04-204 производства ФРГ или 5%-ная водная эмульсия пеногасителя SL-04-204, позволяющие устранить пенообразование в процессе биосинтеза L-орнитина при непрерывной его подаче, без превышения при этом допустимой эффективной концентрации (0,1%).

ЛИТЕРАТУРА

1. Варданян А.А., Анатолян Р.М. Микробиологическая промышленность. 5, с. 2, 1983.
2. Виестур У.Э., Долгицер Н.С. Обзор ОНТИТЭ микробиопром с.125, 1988.
3. Тихомиров В.К. Пены, теория и практика их получения и разрушения. М.: Химия, с.188-242, 1988.
4. Viesture U.E., Kristapsons M.E. Microbes and Eng. Aspects. 12. p.169-224, 1989.
5. Patent № 5567606/ Antifoaming agent for Fermentation, L-amino acid-producing medium and production process of L-amino acid. Hayashi Masaharu., Hioki Yuichi. Japan assigned to Kao Corporation Biotechnology Advances. Vol. 15. Issue 2, p.469, 1997.

Поступила 04.04.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 547. 538. 141: 577. 151. 52. 063. 8

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ НА СИНТЕЗ L-ОРНИТИНА

А.А. ВАРДАНЯН, Ф.Н. ТХРУНИ, Ц.Р. БАЛАБЕКЯН.,
А.Е. АГАДЖАНИЯ

НИИ Биотехнологии, Ереван

Исследовано влияние технологических параметров на биосинтез L-орнитина с использованием штамма-продуцента *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66, полученного методом химического мутагенеза. Определены оптимальные значения технологических параметров (pH, pO₂, t) в различных фазах ферментации. Показано, что отклонение значений от их оптимумов отрицательно сказывается на результатах процесса биосинтеза L-орнитина.

Ուսումնասիրվել է տեխնոլոգիական ցուցանիշների ազդեցությունը L-օրնիթինի կենսասինթեզի վրա, օգտագործելով քիմիական մուտագենեզով ստացված *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66 շտամ-արտադրիչը: Որոշվել են տեխնոլոգիական ցուցանիշների (pH, pO₂, t) օպտիմալ արժեքները կենսասինթեզի տարբեր փուլերում: Ցույց է տրվել, որ այդ արժեքների շեղումները օպտիմալից բացասաբար են ազդում L-օրնիթինի կենսասինթեզի արդյունավետության վրա:

The effect of technological parameters on the L-ornithine biosynthesis by the *Corynebacterium glutamicum* ЦФ-66 has been studied. Optimum values of these technological parameters (pH, pO₂, t) on different fermentation stages have been determined. Optimum values deviations have a negative effect on the results of the L-ornithine biosynthesis process.

Штамм – продуцент – биосинтез – орнитин – ферментер

Биологические функции и фармакологическое действие отдельных свободных L-аминокислот общеизвестны. В связи с развитием орто-молекулярной медицины стало известно достаточное количество фармакологических препаратов, в состав которых входят аминокислоты и их соли, в частности, L-орнитин и его соли. Поэтому актуальными являются вопросы разработки и совершенствования технологии микробиологического способа получения L-орнитина.

Ранее для синтеза L-орнитина исследовали возможность получения мутантов, устойчивых к аргинину и гидроксалоовой кислоте у ряда микроорганизмов *Bacillus subtilis*, *Arthrobacter paraffeneus*, *Arthrobacter*

citreus, *Sacharomyces cerevisiae* [6]. Однако, как показали последующие исследования, наиболее перспективными продуцентами L-аминокислот производственного назначения являются микроорганизмы родов *Paracolibacterium*, *Corynebacterium* и *Brevibacterium* [5]. Методом химического мутагенеза нами был получен ряд мутантов вида *C. glutamicum*, ауксотрофных по аргинину и цитруллину и обладающих способностью накапливать L-орнитин в синтетической среде [1-4].

Целью данной работы являлось исследование влияния технологических параметров на синтез L-орнитина с использованием штамма-продуцента *C. glutamicum* ЦФ-66.

Материал и методика. В качестве продуцента L-орнитина использовали штамм *C. glutamicum* ЦФ-66, ауксотрофный по аргинину и цитруллину, который был получен методом химического мутагенеза с использованием нитрозогуанидина. Штамм-продуцент обладает также устойчивостью к стрептомицину. Для его выращивания и поддержания использовали мясопептонный агар.

В качестве жидкого посевного материала использовали суспензию, полученную путем смыва со скошенного мясопептонного агара бактерий *C. glutamicum* ЦФ-66 после выращивания в течение 18-20 ч. Определение количества биомассы (ОП) проводили на фотоэлектроколориметре КФК-2 ($\lambda=540$ нм, кювета №3).

Определение среднего уровня накопления L-орнитина в колбах проводили ферментацией в пяти независимых опытах на среде следующего состава, %: сахарный песок-12, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, KH_2PO_4 – 0,1, CaCO_3 – 3,0, гидролизат дрожжей – 8,0, K_2HPO_4 – 0,05, NaH_2PO_4 – 0,05, биотин – 500 мкг/л. При ферментации ауксотрофного штамма в среду добавляли расчетное количество стерильного раствора L-аргинина или дрожжевой экстракт. Стерилизацию ферментационной среды проводили при 130° , без выдержки, pH после стерилизации доводили до 7,6-7,9 40 %-ным раствором NaOH.

Биосинтез проводили в 10-литровом ферментере марки «Biostat-S» с рабочим объемом 7,0 л. Для биосинтеза использовали ферментационную среду следующего состава, %: сахарный песок – 12,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,25, KH_2PO_4 – 0,1, CaCO_3 – 4,5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,5, K_2HPO_4 – 0,05, NaH_2PO_4 – 0,05, гидролизат дрожжей – 8,0, биотин – 500 мкг/л, 0,1% пеногаситель (пропинол Б-400). Режим стерилизации ферментационной среды 125° , выдержка 30 мин, pH после стерилизации 7,4-7,6. Раствор $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ стерилизовали отдельно при таких же условиях. Раствор биотина стерилизовали отдельно на водяной бане. Биосинтез орнитина проводили при температуре $30-32^\circ$. К объему питательной среды в количестве 7 л добавляли 4-5% посевного материала (биомасса с оптической плотностью ОП=0,13-0,15). Культивирование осуществляли при следующих условиях: скорость вращения мешалки 650 об/мин, расход воздуха 6,0 л/мин, температура $30-32^\circ$, исходный pH среды 7,4-7,6. При пенообразовании в ферментер подавали стерильный пеногаситель пропинол Б-400. Количество L-орнитина в культуральной жидкости в процессе ферментации определяли методом тонкослойной хроматографии на пластинках “Silufol” и на аминокислотном анализаторе ААА-339.

Результаты и обсуждение. Известно, что состав питательных сред существенно влияет на синтез аминокислот. Было показано, что

максимальный выход орнитина наблюдается при содержании в ферментационной среде 250-300 мкг/л аргинина. С этой целью в составе ферментационной синтетической среды использовали источники ростовых факторов, содержащих аргинин в количестве, обеспечивающем высокий выход L-орнитина. В табл.1 приведены сравнительные данные, характеризующие синтез L-орнитина штаммом-продуцентом в зависимости от использования различных источников ростовых факторов, с пересчетом на содержание L-аргинина в составе питательных сред, равном 250-300 мкг/мл.

Таблица 1. Влияние различных источников ростовых факторов в составе ферментационной среды на синтез L –орнитина в колбах

№	Ростовые факторы		L-аминокислоты, г/л					
	Наименование	Кол-во*, %	Орнитин НСІ	Сопутствующие				
				Лизин	Валин	Аланин	Глицин	%
1	Кукурузный экстракт	4±1	30±5	4±1	2±0,5	1±0,2	0,5±0,1	20
2	Гидролизат паприна (25%)	8±2	60±3	0,5±0,1	1±0,5	1,5±0,5	0,5±0,1	5,5
3	Гидролизат хлебопекарных дрожжей	10±2	43±2	4±1	1,5±0,5	1,5±0,5	0,8±0,1	15,3
4	Дрожжевой экстракт (Merck)	3±1	63±5	4±2	2,5±1	3±1	0,5±0,1	13,7

**) используемое количество ростового фактора основано на содержании в них 250-300 мкг/мл аргинина*

Как видно из приведенных экспериментальных данных, используемые источники ростовых факторов, содержащие необходимое количество аргинина, пригодны для синтеза L-орнитина, однако наблюдается различный выход сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости (лизин, валин, аланин, глутаминовая кислота, глицин). В дальнейших исследованиях использовали ферментационную питательную среду с дрожжевым экстрактом.

Одним из факторов, оказывающих существенное влияние на процесс культивирования микроорганизмов в ферментере, является pH питательной среды.

В связи с этим необходимо было изучить влияние pH среды на синтез L-орнитина. Эксперименты проводили на разработанном составе

питательной среды с определенным содержанием соотношения сахара, азота и карбоната кальция, который способствует поддержанию pH в процессе ферментации в пределах 6,5-7,8. В качестве источника ростового фактора использовали дрожжевой экстракт. Учитывая то обстоятельство, что использование для биосинтеза L-орнитина питательной среды, содержащей карбонат кальция, нежелательно (так как на стадии сепарации при выделении и химочистке аминокислоты из культуральной жидкости возникают большие затруднения), биосинтез L-орнитина на питательных средах без мела проводили с различными исходными значениями pH на протяжении всего процесса. Поскольку процесс биосинтеза орнитина сопровождается непрерывным подкислением среды, в качестве титранта использовали 25%-ный раствор водного аммиака.

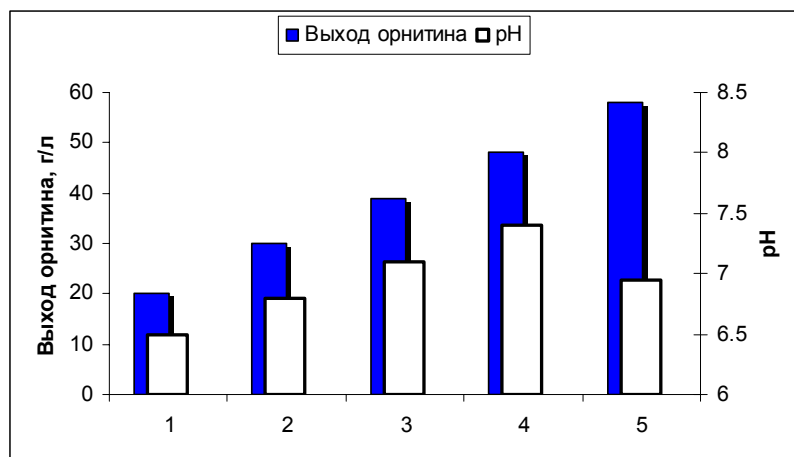


Рис.1. Зависимость синтеза орнитина от начального значения pH при ферментации в лабораторном ферментере “Biostat-S”

Результаты исследований представлены на рис.1. Как видно из рис. 1, сравнительно высокий выход L-орнитина наблюдается в процессе ферментации при начальном значении pH ферментационной среды, равном 6,8. Отклонение pH от этого значения приводит к снижению уровня синтеза орнитина. Одновременно была изучена зависимость синтеза L-орнитина от количества сульфата аммония с различными фиксированными значениями pH питательной среды. Исследования показали, что максимальный выход L-орнитина наблюдается при pH 6,8 и исходной концентрации сульфата аммония в питательной среде - 2,0%. Отклонение значений pH и содержания сульфата аммония от указанных значений приводило к снижению количества L-орнитина и повышению выхода сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости (КЖ). На

основании этого нами была рассчитана объемная продуктивность, коэффициент конверсии сахара, процентное содержание орнитина и сопутствующих аминокислот в питательных средах с мелом и без него (с фиксированным оптимальным значением pH среды). Результаты расчетов приведены в табл.2.

Таблица 2. Сравнительный анализ основных характеристик процесса биосинтеза L-орнитина в ферментере на питательных средах с мелом и без мела при фиксированном значении pH

Характеристика процесса ферментации		Содержание мела, %	
		4,0	0
1	Содержание орнитина в культуральной жидкости, %	87,45	95,31
2	Содержание сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости, %	12,44	4,68
3	Объемная продуктивность, г/л	0,75	1,05
4	Коэффициент конверсии сахара, %	32	42
5	Продолжительность ферментации, ч	72	60

Сравнение данных, представленных в табл.2, показывает, что поддержание pH среды на выбранном уровне при культивировании продуцента в питательных средах без мела позволяет получить максимальный выход орнитина при минимальном количестве сопутствующих аминокислот. Одновременно видно, что использование разработанных значений pH на практике позволяет снизить количество сопутствующих аминокислот в культуральной жидкости на 8,0%, повысить объемную продуктивность L-орнитина на 30%, сократить продолжительность ферментации (биосинтеза) на 10-12ч и повысить коэффициент конверсии сахара на 10%.

С целью выявления оптимальной температуры ферментации L-орнитина были проведены эксперименты, которые показали, что максимальная удельная активность образования L-орнитина составляет 0,030 г/ч на г биомассы и наибольший выход L-орнитина (45-50 г/л) наблюдается при температуре ферментации 30-32°, а максимальная удельная скорость роста культуры (0,156 ч⁻¹) достигается к 14-16 ч культивирования. Понижение температуры культивирования до 26-28° отрицательно влияет на все показатели культивирования, так, происходит снижение удельной скорости роста культуры (0,074-0,099 ч⁻¹), уменьшение концентрации L-орнитина в КЖ до 22-35 г/л и коэффициента конверсии сахара (14-23%). Дальнейшее снижение температуры до 24° приводит к торможению роста культуры и, как следствие, к отсутствию синтеза L-орнитина. По-иному на процесс ферментации влияет повышение температуры: так, увеличение температуры до 34 - 36° увеличивает

удельную скорость роста культуры к 12ч культивирования ($0,206-0,219 \text{ ч}^{-1}$). Однако при этом происходит снижение удельной средней активности образования L-орнитина на единицу биомассы ($0,022-0,015 \text{ г/ч.г.б.м}$), выход L-орнитина составляет 24-32 г/л, коэффициент конверсии сахара 21-16%, что свидетельствует о нецелесообразности повышения температуры на всем протяжении процесса.

На основании полученных данных для проведения ферментации L-орнитина был выбран следующий температурный режим: $34-36^{\circ}$ в течение фазы адаптации и логарифмического роста культуры (до 12-15 ч) и $30-32^{\circ}$ в процессе синтеза. Ведение ферментации L-орнитина с поэтапным изменением температуры позволило сократить продолжительность процесса на 8-10 ч, что привело к повышению производительности процесса на 15%. Исходя из вышеуказанного, очевидно, что стадии роста культуры и синтеза L-орнитина должны проводиться при различных температурных оптимумах.

Для проведения исследований влияния аэрации на биосинтез L-орнитина в ферментере «Biostat» скорости растворения кислорода варьировали в пределах $1,0-4,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$. При этом определяли выход L-орнитина и сопутствующих аминокислот в зависимости от скорости растворения кислорода. Результаты экспериментов приведены в табл.3.

Таблица 3. Влияние скорости растворения кислорода на образование сопутствующих аминокислот при синтезе L-орнитина

Скорость растворения кислорода, $\text{г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$	Выход L-орнитина, г/л	Концентрация сопутствующих аминокислот, г/л			
		валин	аланин	лизин	глут. кислота
1,5	$22,0 \pm 0,3$	4,5	4,0	1,5	1,4
2,0	$33,0 \pm 0,5$	3,5	2,5	2,0	0,91
3,0	$45,0 \pm 0,8$	1,1	1,0	0,5	0,6
4,0	$25,0 \pm 0,4$	5,0	3,2	1,5	1,5
5,0	$14,0 \pm 0,1$	3,0	3,5	2,0	1,1

Как видно из полученных данных, скорость растворения кислорода оказывает существенное влияние на уровень биосинтеза L-орнитина. Было установлено, что максимальный выход L-орнитина наблюдается при скорости растворения кислорода $3,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$. Отклонение изучаемого параметра как в сторону уменьшения, так и в сторону увеличения отрицательно сказывается на биосинтезе L-орнитина. Так, при скорости растворения кислорода $1,5-2,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$ выход L-орнитина снижается на 52-27%. Уровень синтеза сопутствующих синтезу L-орнитина аминокислот также зависит от скорости растворения кислорода. Минимальное количество сопутствующих аминокислот образуется при скорости растворения кислорода $3,0 \text{ г O}_2 (\text{л} \cdot \text{ч})$.

При отклонении от оптимального режима аэрации выход сопутствующих аминокислот увеличивается на 15-20%. Полученные результаты коррелируют с известными литературными данными о необходимости поддержания умеренной скорости растворения кислорода на протяжении всего процесса синтеза L-орнитина. Полученная культуральная жидкость помимо целевого продукта содержит сопутствующие аминокислоты, окрашенные компоненты, минеральные соли и другие примеси органического и неорганического характера.

Полученные результаты по изучению влияния технологических параметров ведения процесса ферментации на продуктивность штамма-продуцента L-орнитина в лабораторном ферментере позволят в перспективе осуществить масштабный переход на большие объемы промышленного оборудования.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Բալաբեկյան Ծ.Ռ., Տիրունի Ֆ.Ն., Աղաջանյան Ա.Ե. և ուրիշներ.* L-օրնիթինի մոնոհիդրոքլորիդի ստացման եղանակ: ՀՀ Արտոնագիր № 415 А 2, 1997:
2. *Տիրունի Ֆ.Ն., Բալաբեկյան Ծ.Ռ., Վարդանյան Ա.Հ., Աղաջանյան Ա.Ե., Ավագյան Յու.Ի., Սադյան Ա.Ս.* L-օրնիթինի միահիդրոքլորիդի ստացման եղանակ, ՀՀ արտոնագիր 1927 А2 15.03.2007:
3. *Агаджанян А.Е., Зурабян А.С., Оганесян Г.Ж и др.* Тезисы докл. междунар. симпозиума «Аминокислоты и их производные», Гродно, с.15, 1996.
4. *Мурадян А.Г, Акопян Э.М., Балабекян. Ц.Р., Варданын А.А., Карабеков Б.П. и др.* Способ получения L-орнитина моногидрохлорида. АС СССР 1138413 А, 1984.
5. *Chiyoda Ku.,* Amino acids and related compounds., specifications general test. Second edition (1978). Kyova Hakko Kogyo Co., CTD 1-6-1, Othemach, Tokyo, Japan; Patent CN1590367, Japan, 2005.

Поступила 04.04.2008



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1-2 (60), 2008

ՀՏԴ 502.7

ՀԱՏԱԿԱՅԻՆ ՖԱՈՒՆԱՅԻ ԲԱԶՄԱԶԱՆՈՒԹՅՈՒՆԸ ԴԵԲԵԴ ԳԵՏԻ ՋՐԱՀԱՎԱՔ ԱՎԱԶԱՆԻ ՏԱՐԱԾՔՈՒՄ

Ա.Ա. ԴԱՆԻԵԼՅԱՆ¹, Մ.Ռ. ԴԱԼԼԱՔՅԱՆ², Կ.Վ. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ,
Է.Խ. ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ²

¹ Երևանի պետական համալսարան, էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոն,

² ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոն, Երևան

Ուսումնասիրվել են Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանի հատակային ֆաունայի բազմազանությունը, ինչպես նաև մի շարք հիդրոքիմիական ցուցանիշներ, որոնք հանդիսանում են կենսամիջավայրի հիմնական բնութագրիչներ:

В водосборном бассейне реки Дебед исследовалось разнообразие бентофауны, а также ряд гидрохимических показателей, которые являются основными параметрами среды обитания.

Have been studied the diversity of zoobenthos community and range of hydrochemical parameters in Debed river watershed basin, which are the main characteristics of the surrounding.

Ձորենթոս - ջրահավաք ավազան - կենսաբազմազանություն

Ժամանակակից էկոլոգիայի կարևոր խնդիրներից է հանդիսանում կենսաբազմազանության ուսումնասիրությունը [5]: Ըստ պաշտոնական տվյալների՝ Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանի գետերում հատակային ֆաունայի կենսաբազմազանության ուսումնասիրություններ չեն կատարվել [15]: Հատակային կենդանիները մեծ դեր ունեն ջրամբարների ինքնամաքման պրոցեսում և հանդիսանում են տեղային աղտոտվածության զգայուն կենսաինդիկատորներ, ինչը թույլ է տալիս ներառել վերջիններիս ջրային օբյեկտների մոնիթորինգի համակարգում [9,16]:

Աշխատանքի նպատակն է Դեբեդ գետի, նրա գլխավոր վտակներ՝ Փամբակի և Չորագետի, հատակային ֆաունայի կենսաբազմազանության ու դրանց կենսամիջավայրը բնութագրող որոշ հիդրոքիմիական ցուցանիշների զուգահեռ ուսումնասիրությունը:

Դեբեդ գետը Փամբակ և Չորագետ իր գլխավոր վտակներով պատկանում է Կուռի ավազանին: ՀՀ տարածքում Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանը կազմում է 3790 կմ²: Տարածքի մակերևույթը լեռնային է՝ տեղանքի բացարձակ նիշերը տատանվում են ծովի մակարդակից 390-ից մինչև 3200 մ: Կլիման համեմատաբար խոնավ է՝ տարեկան տեղումները կազմում են 500-800 մմ:

Կապված հարուստ բնական ռեսուրսների հետ՝ ավազանի տարածքն աչքի է ընկնում զարգացած բազմաձյուղ տնտեսությամբ, հանդիսանալով Հայաստանի գլխավոր արդյունաբերական կենտրոններից մեկը: Դեբեդի ավազանի գետերի ջրերի որակի ձևավորման վրա մեծ ազդեցություն են ունենում կենցաղային, գյուղատնտեսական և արդյունաբերական հոսքաջրերը [1,2,17]:

Նյութ և մեթոդ: Դեբեդ գետի հիդրոէկոլոգիական, մասնավորապես հատակային ֆաունայի և հիդրոքիմիական հետազոտությունները կատարվել են 2006թ. օգոստոսին: Ելնելով աշխատանքի նպատակից փորձանմուշները վերցվել են նախորոք ընտրված հետևյալ դիտակետերից.

1. Փամբակի վերին հոսանք (Հարթագյուղից վերև),
2. Փամբակի ստորին հոսանք (նախքան Ձորագետին միախառնվելը),
3. Ձորագետի ստորին հոսանք (նախքան Փամբակին միախառնվելը),
4. Դեբեդի ստորին հոսանք (Ախթալա քաղաքի տարածքում):

Հիդրոքիմիական ուսումնասիրությունների համար նմուշառումը և ուսումնասիրությունները, ինչպես նաև հատակային ֆաունայի փորձանմուշների հավաքումը, ֆիքսումը և մշակումը իրականացվել են հիդրոքիմիայում և ջրակենսաբանության մեջ ընդունված մեթոդներով [13,16]:

Ուսումնասիրվել են հատակային ֆաունայի լիթոֆիլ կենդանիները, քանի որ հիմնական բիոտոպը եղել է քարը՝ ինչը հիմնականում բնորոշ է արագահոս գետերին [7], մակրոֆիտները բացակայում են: Վերահաշվարկվել են հատակային կենդանիների խմբերի կենսազանգվածի և թվաքանակի ցուցանիշները միավոր մակերեսի համար [12], ինչպես նաև համապատասխան դիտակետերում, զուգահեռաբար չափվել են ջրի ջերմաստիճանը, pH-ը, թափանցելիությունը, լուծված թթվածինը, թթվածնով հագեցվածությունը, ԹԿՊ_5 -ը, պերմանգանատային օքսիդացումը և կախված մասնիկները՝ հաշվի առնելով դրանց կարևորությունը որպես կենսամիջավայրի հիմնական բնութագրիչներ:

Արդյունքներ և քննարկում: Փամբակ, Ձորագետ և Դեբեդ գետերի համապատասխան դիտակետերից վերցված ջրային նմուշներում կատարված հիդրոքիմիական ուսումնասիրությունների արդյունքները բերվում են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1. Փամբակ, Ձորագետ և Դեբեդ գետերում հիդրոքիմիական ցուցանիշները

Դիտակետ Հիդրոքիմ. ցուցանիշներ	Փամբակի վերին հոսանք	Փամբակի ստորին հոսանք	Ձորագետի ստորին հոսանք	Դեբեդի ստորին հոսանք
Ջերմաստիճան (°C)	13.3	16.5	16.7	21.7
pH	8.42	8.39	8.36	8.54
Թափանցելիություն, սմ	11	9	11	7
Լուծված թթվածին (մգ/լ)	7.62	7.84	8.26	8.22
Թթվածնով հագեցվածությունը (%)	96.1	92.8	96.5	103.9
ԹԿՊ_5 (մգ/լ)	2.20	5.72	2.43	3.46
Պերմանգանատային օքսիդացում (մգՕ ₂ /լ)	3.4	3.64	2.68	4.12
Կախված մասնիկներ (մգ/լ)	12.1	17.8	7.6	25.3

Դեբեղ գետի ջրահավաք ավազանում կատարված վերոնշյալ դիտակետերի հատակային ֆաունայի ջրակենսաբանական ուսումնասիրության արդյունքները բերվում են աղյուսակ 2-ում, ըստ որոնց՝ ուսումնասիրված դիտակետերում հանդիպում են անողնաշարավորների հետևյալ խմբերը.

միջատներից՝ թավաթևանքներ (Trichoptera), միոփիկներ (Ephemeroptera), սիմուլիդներ (Simuliidae), խիրոնոմիդներ (Chironomidae), բզեզներ (Coleoptera), ցանցաթաղանթաթևավորներ (Blepharoceridae), (Rhagionidae), խեցգետնակերպերից կողալողեր (Gammaridae), օղակավոր որդերից՝ տգրուկներ (Hirudinea):

Աղյուսակ 2. Փամբակ, Ձորագետ և Դեբեղ գետերում հատակային ֆաունայի բազմազանությունը, թվաքանակը (առ./մ², հայտարարում) և կենսազանգվածը (մգ/մ², համարիչում):

Խումբ Դիտակետ	Trichoptera	Gammaridae	Ephemeroptera	Simuliidae	Hirudinea	Chironomidae	Blepharoceridae	Coleoptera	Rhagionidae	զումարային
Փամբակի վերին հոսանք	<u>10</u> 89	<u>4</u> 11	<u>78</u> 116	<u>1</u> 1	<u>1</u> 2	-	-	-	-	<u>95</u> 221
Փամբակի ստորին հոսանք	<u>112</u> 2098	<u>10</u> 52	<u>25</u> 34	<u>12</u> 8	<u>8</u> 349	-	<u>2</u> 2	-	-	<u>165</u> 2543
Ձորագետի ստորին հոսանք	<u>3</u> 66	<u>16</u> 14	-	<u>119</u> 154	-	<u>6</u> 6	<u>2</u> 4	<u>1</u> 7	-	<u>147</u> 251
Դեբեղի ստորին հոսանք	<u>28</u> 422	-	<u>31</u> 47	<u>1</u> 1	-	<u>4</u> 4	-	-	<u>1</u> 44	<u>65</u> 518

Հետազոտությունները ցույց են տալիս, որ Փամբակ գետի վերին հոսանքում դոմինանտել են օքսիֆիլ խմբեր միոփիկները (78 առ./մ², 116գ/մ²): Սուբդոմինանտ խումբ են հանդիսացել թավաթևանքները (10 առ./մ², 89 գ/մ²), որոնք բավականին զգայուն են ջրում օրգանական նյութի քանակի ավելացման նկատմամբ և հիմնականում հանդիպում են լեռնային մաքուր գետերում և օլիգոտրոֆ լճերում [10]: Պետք է նշել, որ Փամբակ գետի այս դիտակետում դիտվել է ջրերում օրգանական նյութերի պարունակության նվազագույն ցուցանիշը (ԹԿՊ₅-2.2 մգ/լ):

Թեպետ Փամբակի ստորին հոսանքում, ԹԿՊ₅-ի ցուցանիշը (5.72 մգ/լ) գերազանցել է ՍԹԽ-ը [6], սակայն հատակային ֆաունայում դոմինանտող են հանդիսացել թավաթևանքները (112 առ./մ², 2098 գ/մ²): Վերջիններս ընդունակ են ապրել թույլ աղտոտվածության, սակայն բավարար թթվածնային պայմաններում՝ ինչն էլ դիտվում է Փամբակ գետի ստորին հոսանքում: Փամբակ գետի այս հատվածում՝ թեպետ ԹԿՊ₅-ի արժեքը մեծ է, թթվածնով հագեցվածությունը կազմել է 92.8 %, որը պայմանավորված է գետի հոսքի մեծ արագությամբ՝ 8.76 լ/վրկ.կմ² [3,8]: Այս դիտակետում հանդիպել է տգրուկների երկու տեսակ՝ *Herpobdella octoculata* (L.) և *H. lineata* (L.):

Ձորագետի ստորին հոսանքում դոմինանտել են սիմուլիդները (119 առ./մ², 154 գ/մ²) և կողալողերը (16 առ./մ², 14 գ/մ²)՝ մինչդեռ Փամբակի և Դեբեղի ստորին հոսանքներում հանդիպել է սիմուլիդների թրթուրների մեկական առանձնյակ: Սիմուլիդների թրթուրների պոպուլյացիայի առանձնյակների թվաքանակը սահմանափակող գործոններ կարող են հանդիսանալ հոսքի մեծ արագությունը, ջրի թափանցելիությունը, թթվածնային պայմանները [14], որոնց փոփոխման համապատասխան դինամիկան արտահայտվում է ուսումնասիրված հիդրոքիմիական ցուցանիշներում (աղյուսակ 1):

Դեբեդ գետի ստորին հոսանքում՝ հատակային ֆաունայում, նկատվում է պոպուլյացիաների առանձնյակների թվաքանակի և կենսազանգվածի նվազում: Անհրաժեշտ է նշել, որ Դեբեդ գետի ջրահավաք ավազանի հենց այս հատվածում է զարգացած լեռնամետալուրգիական արդյունաբերությունը՝ հանդիսանալով աղտոտման պոտենցիալ աղբյուր [2,17]:

Այսպիսով, հատակային ֆաունան որակակապես և քանակապես համեմատաբար ավելի հարուստ է Ջորագետի և Փամբակի ստորին հոսանքներում՝ ինչը կարող է պայմանավորված լինել ջրում օրգանական նյութերի քանակի աճով և համեմատաբար ավելի բարենպաստ կենսական պայմանների առկայությամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Հակոբյան Ս.* և ուրիշներ, Հիդրոլոգիական մոնիթորինգի ուղեցույց: Երևան, էջ 68, 2006:
2. *Մանասյան Մ.Գ.* և ուրիշ., Լոռու մարզ (Բնությունը, բնակչությունը, տնտեսությունը) Եր.: Երևանի համալս. հրատ., 208 էջ, 2003:
3. *Չիլինգարյան Լ.Ա., Մնացականյան Բ.Պ., Աղաբաբյան Կ.Ա., Թորմաջյան Հ.Վ.* Հայաստանի գետերի ու լճերի ջրագրությունը Ջրային հիմնահարցերի և հիդրոտեխնիկայի ինստիտուտ, Ագրոպրես, ՊՓԲԸ, Երևան, 2002թ.:
4. "Наука" Ленинградское отделение. Ленинград. С. 484, ст.47-74, 1976.
5. *Говоров Е.В., Ямалов С.М., Миркин Б.М.,* Экология, 5, с. 394-396, 2005:
6. *Гусева Т.В., Молчанова Я.П., Заика Е.А., Виниченко В.Н., Аверочкин Е.М.* Гидрохимические показатели состояния окружающей среды. Справочные материалы. Эколайн, 2000.
7. *Леман В.Н., Чебанова В.В.,* Экология, 2, с. 120-125, 2005.
8. *Крылов А.В.,* Экология, 5, с. 358-365, 2004.
9. *Остроумов С.А.,* Экология, 6, с. 452-459, 2005
10. *Лепнева С.Г.* Фауна СССР/Ручейники. Личинки и куколки подотряда кольчатощупиковых (Annalipalpia). 2, вып.1, ,Наука՝ М.- Л., 560, 1964.
11. *Лукин Е.И.* Фауна СССР. Пиявки /Пиявки пресных и солоноватых водоем. 1, Академия Наук СССР Зоологический институт (новая серия N 109). Издательство
12. Методические рекомендации по сбору и обработке материалов при гидрибиологических исследованиях на пресноводных водоемах. Зообентос и его продукция. Ленинград., ст. 3-8, 1983
13. Руководство по химическому анализу поверхностных вод суши. (ред. А.Д. Семенов), Гидрометеиздат, Ленинград с. 541, 1977.
14. *Усова З. В.* Фауна мошек Карелии и Мурманской области (Diptera, Simuliidae). Академия Наук СССР Карельский Изд. Академии Наук СССР М.-Л. , С. 283, ст. 5, 1961.Armenia's water resources in the third Millennium, Republic of Armenia, Ministry of Nature Protection, Yerevan, p. 56, 2005.
15. *Clasceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D.,* Standart methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, Washington, 1998.
16. Integrated River Basin Planning – Khrami/Debed Watershed; Final report, 2002.

Ստացվել է 11.04.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 579.253.43

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТЕСТ-КУЛЬТУР ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СПОСОБОМ

А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕШЯН, Ж.В. КАРАПЕТЯН,
А.Г. ДАВТЯН, А.О. КОЛОЯН, Г.Е. АВЕТИСОВА

ЗАО “НИИ Биотехнологии” МТЭР РА, Ереван

Методом химического мутагенеза получены ауксотрофные по пролину, гистидину, изолейцину, валину и аргинину мутанты штаммов дикого типа *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 и *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. Отобраны тест-культуры для сравнительной оценки штаммов-продуцентов по активности синтеза аминокислот микробиологическим способом.

Отработаны условия совместного культивирования штаммов-продуцентов и тест-культур. Показана целесообразность использования полученных тест-культур для эффективности селекции, направленной на повышение активности штаммов-продуцентов аминокислот.

Brevibacterium flavum ATCC 14067 и *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 վայրի տիպի շտամների մոտ քիմիական մուտագենների ճանապարհով ստացվել են ըստ պրոլինի, հիստիդինի, իզոլեյցինի, վալինի և արգինինի աուքսոտրոֆ մուտանտներ, որոնցից ընտրվել են թեստ-կուլտուրաներ մանրէաբանական եղանակով ամինաթթուների շտամ-արտադրիչների ակտիվ-վուրջան համեմատական գնահատման համար:

Մշակվել են շտամ-արտադրիչների և թեստ-կուլտուրաների համատեղ կուլտիվացման պայմանները: Ցույց է տրվել ամինաթթուների բարձր ակտիվ-վուրջամբ շտամ-արտադրիչների էֆեկտիվ սելեկցիայի համար թեստ-կուլտուրաների օգտագործման նպատակահարմարությունը:

Auxotroph mutants of wild type *Brevibacterium flavum* ATCC 14067 and *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, which require proline, histidine, isoleucine, valine or arginine have been isolated by chemical mutagenesis. The test-cultures for microbiological testing of amino-acid strain-producers activity were selected.

The joint cultivation conditions of strain-producers and test-cultures have been developed. Test-cultures were demonstrated to be expedient for effective selection aimed to increase the activity of amino acid strain-producers.

Штамм-продуцент - аминокислоты - тест-культуры

Производство аминокислот играет очень важную роль в мировой индустрии из-за огромного спроса на них [6, 12]. В ближайшие годы ожидается дальнейший рост уровня их потребления [3, 5-7, 10], поэтому разработка новых производственных процессов, способных удовлетворить

спрос на нужные аминокислоты, является актуальной. Непрерывающиеся в этом направлении усилия разных исследовательских групп направлены прежде всего на решение задачи интенсификации микробиологических технологий производства аминокислот, что в первую очередь означает конструирование высокоактивных штаммов-продуцентов с улучшенными технологическими показателями [2, 4, 8, 9, 11].

Получение и усовершенствование штаммов-продуцентов аминокислот неизбежно требуют проверки большого количества мутантов. Как правило, эффективность селекции тем больше, чем больше объем материала, подвергаемого отбору. Между тем при “ручном отборе”, когда выделяются отдельные колонии и проверяются в колбочной ферментации на качалках, вероятность нахождения высокоактивных штаммов лимитируется количеством изучаемого материала.

С этой точки зрения трудно переоценить значение для селекции микробиологического метода предварительной оценки активности штаммов-продуцентов аминокислот, позволяющего исключить заведомо неперспективные мутанты и, следовательно, сократить количество вариантов, подлежащих окончательной проверке.

Основная идея этого метода связана с явлением синтрофизма, когда при совместном высеве на минимальную среду вокруг колоний продуцентов образуются зоны роста микробов, нуждающихся в соответствующих аминокислотах. Величина зон находится в прямой зависимости от количества выделяемой аминокислоты. Колонии, образующие наибольшие зоны, используются для дальнейшей проверки при помощи более трудоемких и вместе с тем более точных способов оценки – ферментацией в колбах и ферментерах.

Для применения указанного метода в селекции штаммов-продуцентов аминокислот необходимым условием является наличие соответствующих тест-культур, ауксотрофных по интересующим аминокислотам.

В настоящей статье обобщены результаты работ по получению тест-культур, использованных нами для селекции высокоактивных штаммов-продуцентов пролина, гистидина, валина, аргинина и изолейцина.

Материал и методика. В работе использованы бактериальные штаммы: *B. flavum* ATCC 14067 и *C. glutamicum* ATCC 13032.

Для выращивания культур в полноценных условиях использовали мясопептонный бульон (МПБ) и мясопептонный агар (МПА). В качестве минимальной среды использовали среду Гловера с добавками следующего состава, %: глюкоза - 0,8; NH_4Cl - 0,5; NH_4NO_3 - 0,1; Na_2SO_4 - 0,2; K_2HPO_4 - 0,3; KH_2PO_4 - 0,1; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,05; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 0,001; биотин-100 мкг/мл; тиамин-100 мкг/мл; pH - 7,0-7,5.

Мутагенизацию культур 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидином (НГ) и отбор ауксотрофных мутантов снятием реплик проводили по известным методикам [1] с некоторыми модификациями.

Для определения гистидинсинтезирующей активности отобранных с помощью *his*⁻ тест-культуры штаммов-продуцентов в условиях колбочной ферментации использовали полусинтетическую среду следующего состава, %: сахар - 13,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 5,0; дрожжевой экстракт - 1,5; мочевины - 0,2;

MgSO₄ · 7H₂O - 0,1; KH₂PO₄ - 0,15; K₂HPO₄ - 0,05; Na₂HPO₄ - 0,05; MgSO₄ - 0,1; CaCO₃ - 4,0; pH - 7,6-7,8. Ферментационную среду (14 мл) заливали в колбы Эрленмейера емкостью 500 мл и добавляли 1мл посевного материала, выращенного в МПБ с аэрацией в течение 24 ч. Культуры инкубировали на круговой качалке (220 об/мин) при 30⁰ в течение 70-72 ч. Концентрацию гистидина в культуральной жидкости определяли методом тонкослойной хроматографии в системе аммиак-бутанол-этанол-ацетон-вода (2,5:2:2:4:1) или на аминокислотном анализаторе ААА Т339 (Чехия). Полученные результаты обрабатывали статистически, достоверность различий определяли по критерию Стюдента.

Результаты и обсуждение. В качестве исходных культур для получения ауксотрофных мутантов использовали штаммы дикого типа *Br. flavum* 14067 и *C. glutamicum* 13032. Выбор этих штаммов связан с тем, что они не содержат мутаций ауксотрофности по каким-либо аминокислотам. В противном случае при микробиологическом тестировании добавление в минимальную среду дополнительных аминокислот, необходимых для удовлетворения ростовых потребностей тест-культуры, может оказать нежелательное влияние на процесс биосинтеза целевой аминокислоты и исказить картину “кормежки” на чашке. Кроме того, и исходные штаммы, и исследуемые штаммы-продуценты аминокислот относятся к группе коринеформных бактерий и одинаково хорошо растут на одних и тех же минимальных средах и температурах, что особенно важно для их совместного культивирования.

Ауксотрофные по аминокислотам мутанты были получены под действием НГ. Обработку клеток в логарифмической фазе роста проводили в растворе ацетатного буфера (pH 5,6) с концентрацией мутагена 300 мкг/мл в течение 30 мин. После мутагенизации отмытые от мутагена культуры подращивали в МПБ для избавления от мутационных гетерозигот и фенотипического проявления индуцированных мутаций. Затем клетки осаждали центрифугированием и ресуспендировали в минимальной среде. После непродолжительного инкубирования с целью активации прототрофных клеток и “истощения” ауксотрофных мутантов культуры в течение 4 ч обрабатывали пенициллином (1000 мкг/мл), который, убивая делящиеся прототрофные клетки, обогащает популяцию ауксотрофными мутантами. Для отбора ауксотрофных мутантов культуры из соответствующих разведений высевали на чашки с минимальным агаром, содержащим интересующую нас аминокислоту, и инкубировали при 30⁰ для получения отдельных колоний. Через 3-5 сут суспензии выросших колоний с помощью репликатора наносили на минимальную среду без и с добавлением целевой аминокислоты и инкубировали 2-3 сут. Мутанты, отобранные по отсутствию роста на среде без добавки, пересеивали на МПБ истощением штрихов до отдельных колоний, которые повторно проверяли на ауксотрофность.

Результаты опытов по мутагенизации культур и отбору ауксотрофных мутантов приведены в табл.1.

Таблица 1. Получение ауксотрофных по аминокислотам мутантов под действием нитрозогуанидина

Ауксо- троф- ность	Исходный штамм	Титр, кл./мл		Выжи- вае- мость, %	Количество проверенных клеток $\times 10^3$	Коли- чество мутантов
		до НГ $\times 10^8$	после НГ $\times 10^8$			
pro ⁻	<i>Br. flavum</i> 14067	3.6	1.6	44.4	1.0	8
his ⁻	“ – “	4.0	2.2	55.0	0.98	10
val ⁻ ,ile ⁻	“ – “	3.4	2.1	61.8	4.3	2
arg ⁻	<i>C. glutami- cum</i> 13032	2.8	1.8	64.3	0.93	14
ile ⁻	“ – “	3.8	2.1	55.2	5.7	3

Из табл. 1 видно, что в разных экспериментах было выделено всего 37 ауксотрофов, в том числе: pro⁻ - 8, his⁻ - 10, val⁻,ile⁻ - 2, arg⁻ - 14, ile⁻ - 3.

Основным требованием, предъявляемым к тест-культурам, является низкая частота реверсии к исходному генотипу, т.е. к прототрофности. Поэтому для окончательного отбора тест-культур были проведены эксперименты для определения частоты возникновения спонтанных ревертантов у всех полученных ауксотрофных мутантов. С этой целью выращенные в течение ночи культуры ауксотрофов были сконцентрированы центрифугированием до титра 10^9 - 10^{11} кл./мл и высеяны на минимальную среду.

Таблица 2. Индексы спонтанных реверсий ауксотрофных мутантов

Мутант	№	Количество проверенных клеток	Количество ревертантов	Индекс реверсии*
pro ⁻	1	$6.2 \cdot 10^9$	0	$< 10^{-9**}$
his ⁻	1	$5.2 \cdot 10^{10}$	$3.5 \cdot 10^8$	$6.7 \cdot 10^9$
	2	$2.2 \cdot 10^{10}$	0	$< 10^{-10**}$
	3	$4.3 \cdot 10^{10}$	$5.7 \cdot 10^8$	$1.3 \cdot 10^{-6}$
val ⁻ ile ⁻	1	$1.1 \cdot 10^{11}$	0	$< 10^{-11**}$
arg ⁻	1	$9.2 \cdot 10^9$	0	$< 10^{-9**}$
	2	$1.2 \cdot 10^{10}$	$2.8 \cdot 10^1$	$2.3 \cdot 10^{-9}$
ile ⁻	1	$1.1 \cdot 10^{10}$	0	$< 10^{-10**}$
	2	$4.1 \cdot 10^9$	$2.2 \cdot 10^2$	$5.4 \cdot 10^{-8}$

* В табл.1 не приведены значения индексов реверсий мутантов, не отличающихся существенно от представленных.

** Отобранные тест-культуры

После инкубирования в течение 5-7 сут и подсчета количества выросших на чашках ревертантов были определены индексы реверсий по маркерам ауксотрофности. Результаты показали, что ауксотрофные мутанты отличаются по свойству реверсии к исходному генотипу (табл. 2). В качестве тест-культур были выбраны отличающиеся низкой частотой реверсии мутанты.

Эксперименты по определению активности синтеза аминокислот отобранными микробиологическим методом штаммами в условиях колбочной ферментации подтвердили эффективность селекции с использованием полученных нами тест-культур. Варианты, образующие маленькие зоны или совсем не образующие их, и при глубинной ферментации, как правило, выделяют в питательную среду очень мало целевой аминокислоты. Наиболее активные штаммы-продуценты отбирали среди клонов, вокруг которых, независимо от способа посева, образуются сравнительно большие и густые зоны роста тест-культуры.

Таблица 3. Оценка гистидинсинтезирующей способности ауксотрофных мутантов *Br. flavum* LGS2 микробиологическим методом и в условиях колбочной ферментации

Штамм		Гистидин	
		микробиологический метод *	колбочная ферментация, г/л
<i>Br. flavum</i> LGS2 (исходный)	№ мутанта	++	11.3± 0.7
<i>Br. flavum</i> LGS2 ауксотрофы по треонину	1	—	2,2± 0.24
	2	+	5,2± 0.47
	3	+	7,4± 0.6
	4	+++	13,5± 0.8**
	5	+++	14,2± 0.87**
	6	++	10,8± 0.8
<i>Br. flavum</i> LGS2 ауксотрофы по триптофану	1	+	3,1± 0.2
	2	+	8,2± 1.2
	3	+++	15,3± 1.1**
	4	+++	14,2± 0.9**
	5	++	12,2± 0.7
	6	++	11,5± 0.6

* - оценка активности синтеза гистидина по размерам и густоте зоны роста тест-культуры в сравнении с контрольным штаммом *Br. flavum* LGS2 (++)

** - достоверное повышение по сравнению с исходным штаммом

Примером успешной селекции с использованием тест-культуры может служить отбор продуцентов с повышенной активностью из ауксотрофных мутантов, полученных нами у штамма-продуцента гистидина *Br. flavum* LGS2. Усредненные результаты 10-15-колбочных ферментаций ауксотрофными мутантами LGS2 в сравнении с результатами микробиологического определения приведены в табл.3.

На основании сравнительного анализа данных, представленных в табл. 3, для дальнейшей селекции были отобраны ауксотроф по треонину № 5 и ауксотроф по триптофану № 3, гистидинсинтезирующая активность которых достоверно превышает активность исходного штамма.

Описанные тест-культуры успешно используются в рамках проводимых в НИИ биотехнологии работ по получению высокоактивных штаммов-продуцентов соответствующих аминокислот.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миллер Дж.* Эксперименты в молекулярной генетике. Под ред. С.И. Алиханяна, «Мир», М., 1976.
2. *Blombach B., Schreiner M. E., Moch M., Oldiges M., Eikmanns B. J.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* Mar 2:17333167, 2007.
3. *Brown K.* Business Communication Company, Mini-Review, <http://www.bccresearch.com/food/b132r.html>, 2005.
4. *Demain A.L.* *Tibtech*, 18, 26-31, 2000.
5. *Eggeling H., Sahm L.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 146-153, 1999.
6. *Hermann, T. J.* *Biotechnol.* 104, 155-172, 2003.
7. *Ikeda M.* Microbial production of L-amino acids. New York, *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. Springer*, 79, 1-35, 2003.
8. *Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Y. I.* US Patent 20050048631, 2005.
9. *Klyachko E.V., Shakulov R.S., Kozlov Y. I.* US Patent 20050176033, 2005.
10. *Leuchtenberger W., Huthmacher K., Drauz K.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 69:1-8, 2005.
11. *Tateno T., Fukuda H., Kondo A.* *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 6:1213-1220, 2007.
12. *Wendisch V.F., Marx A., Kelle R., Buchholz S.* Biorefineries, biobased industrial processes and products. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 201-216, 2006.

Поступила 21.04.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 547.952.616.127

ОСОБЕННОСТИ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ СДВИГОВ НЕЙТРАЛЬНЫХ И КИСЛЫХ ГЛИКОЛИПИДОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ИНФАРКТЕ МИОКАРДА

Л.М. ОВСЕПЯН, М.В. ЛЬВОВ, Г.В. ЗАХАРЯН,
М.А. АГАНЯНЦ, Е.А. МАРТИРОСЯН, Г.С. КАЗАРЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА, Ереван

Изучено содержание нейтральных (галактозилцерамидов и сульфогалактозилцерамидов) и кислых (ганглиозидов) гликолипидов в сердечной мышце при инфаркте миокарда. Обнаружено изменение качественного и количественного содержания нейтральных гликолипидов при развитии инфаркта. Согласно результатам проведенных исследований, экспериментальный инфаркт миокарда характеризуется уменьшением суммарного и фракционного содержания ганглиозидов.

Полученные результаты интерпретируются в связи со способностью ганглиозидов связывать ионы кальция.

Ուսումնասիրվել է չեզոք (գալակտոզիցերամիդների) և թթու (գանգլիոզիդների) գլիկոլիպիդների պարունակությունը սրտամկանում ինֆարկտի ժամանակ: Գլիկոլիպիդների ուսումնասիրումը թույլ է տվել բացահայտել նրանց քանակական և որակական կազմի նվազում: Ստացված արդյունքները բացատրվում են գանգլիոզիդների կալցիումի իոնները կապելու ընդունակությամբ:

The purpose of the given research was determination of metabolic role of neutral (galactosilceramides) and acidic (gangliosides) glykolipids in heart muscle under the conditions of heart attack. We found qualitative and quantitative changes of neurtral glicolipids in the heart affected by heart attock . Decording to the results obtained, experimental infarction is charactedged by total and fractional decrease in gangleoside content. Those results are interpreted as the ability of gangliosides to bind calcium ions.

Инфаркт миокарда - ганглиозиды – галактозилцерамиды

Одним из структурных элементов мембран являются гликолипиды, функциональная роль которых при различных физиологических состояниях организма остается во многом невыясненной. Согласно литературным данным, они участвуют во всех процессах, обуславливающих и поддерживающих нормальный уровень клеточной активности. К ним относятся процессы клеточного узнавания, регуляции роста и дифференцировки клеток, рецепции гормонов и токсинов, а также иммуномодулирующие свойства [3,10].

Процессы гидролиза, ресинтеза и окисления гликолипидов обеспечивают динамическое равновесие обменных процессов в клеточных мембранах, нарушение которых лежит в основе развития патологических процессов. Гликолипиды в основном локализуются в мембранах и клеточных органеллах, функционально связанных с плазматическими мембранами, таких как аппарат Гольджи, эндосомы и липосомы. При различных патологических состояниях организма изменяются состав и обмен гликолипидов [6,13]. Изменение качественного и количественного содержания гликолипидов является определяющим в регуляции функциональной активности нормальных клеток, а также в развитии их патологических состояний. Целью настоящего исследования явилось изучение содержания нейтральных - галактозилцерамидов (ГалЦер), сульфогалактозилцерамидов (СГалЦер) и кислых ганглиозидов (ГЗ) в сердечной ткани в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда.

Материал и методика. Опыты поставлены на беспородных белых крысах массой 150-200 г. Экспериментальный инфаркт миокарда вызывали лигированием нисходящей левой коронарной артерии.

Экстракцию липидов проводили по методу Фолча [9]. После промывки верхний водно-метаноловый слой экстракта использовали для определения ГЗ, а нижний слой, содержащий хлороформ, шел на определение ГалЦер и СГалЦер. Смесь ГалЦер и СГалЦер выделяли из общего липидного экстракта, освобождали от фосфолипидов и хроматографировали в тонком слое силикагеля (пластины фирмы "Мерк", Германия) в системе растворителей хлороформ-метанол-аммиак (80:20:0,4). Количество ГалЦер и СГалЦер определяли по углеводному компоненту реакцией с резорцином [4].

Раствор ГЗ после диализа, лиофилизации и освобождения от фосфолипидов пропускали через колонку с ДЕАЕ сефадексом А-25, после чего содержимое хроматографировали описанным выше методом в системе растворителей хлороформ-метанол-аммиак (60:35:5). О содержании ГЗ судили по количеству N-ацетилнейраминовой кислоты [7].

Результаты и обсуждение. Как показали результаты исследования, у контрольных животных содержание ГалЦер в сердечной ткани составляет - 4,9 мг/г ткани, а СГалЦер - 6,18 мг/г ткани (табл. 1). Экспериментальный инфаркт миокарда сопровождается уменьшением содержания СГалЦер без существенного изменения ГалЦер. Донором активированного сульфата является фосфоаденозинфосфосульфат. Перенос его на ГалЦер катализируется цереброзидсульфотрансферазой, действующей в микросомах [8]. Не исключено, что экспериментальный инфаркт миокарда сопровождается уменьшением активности указанного фермента. Особое внимание привлекают СГалЦер в связи с их участием в транспорте ионов, уменьшением активности Na, K-АТФ-азы [6]. По всей видимости, изменение активности указанного фермента может быть связано с уменьшением содержания СГалЦер в сердечной ткани.

Таблица 1. Содержание нейтральных гликолипидов в сердечной ткани в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда, мг галактозы/г ткани, (n=6)

Показатели	Контроль		Опыт	
	мг/г ткани	% от суммы	мг/г ткани	% от суммы
ГалЦер	4,9± 0,3	44,22	5,8 ± 0,4 p< 0,05	64,88
СГалЦер	6,18 ± 0,5	55,78	3,14 ±0,6 p< 0,001	35,12
Сумма	11,08		8,94	

При изучении ганглиозидного состава (табл. 2) в сердечной ткани интактных животных нами выделены, фракционированы и количественно охарактеризованы 4 фракции ГЗ (моно-, ди-, три- и тетрациалганглиозиды). Инфаркт миокарда характеризуется уменьшением количества всех фракций ГЗ. Следует отметить, что ГЗ обладают высоким уровнем обменяемости; благодаря карбоксильным группам N-ацетилнейраминовой кислоты обеспечивается отрицательная заряженность мембранной поверхности, что имеет существенное значение в бесперебойном функционировании катионообменных механизмов биологической мембраны [14].

Таблица 2. Содержание ганглиозидов в сердечной ткани в норме и при экспериментальном инфаркте миокарда, мкг сиаловых кислот/г ткани, (n=6)

Показатели	Контроль		Опыт	
	мкг/г ткани	% от суммы	мкг/г ткани	% от суммы
МоносиалГЗ	78,3±5,2	18,97	50,83 ± 4,8 p <0,01	15,58
ДисиалГЗ	195,78±8,2	47,42	155,6 ± 9,1 p<0.01	47,60
ТрисиалГЗ	121,8±4,7	29,51	111,52 ± 6,2	34,1
ТетрациалГЗ	16,96±1,2	4,11	8,9 ± 1,5 p<0,001	2,72
Сумма	412,84		326,85	

Литературные данные свидетельствуют о функциональной связи между ГЗ и транспортом Ca^{2+} , что обусловлено наличием в структуре ГЗ сиаловых кислот, обладающих способностью к избирательному связыванию кальция и тем самым к упорядочению активности кальций-зависимых фосфолипаз, особенно фосфолипазы А2. Наиболее вероятной причиной подавления митохондриями синтеза АТФ является перегрузка этих органелл кальцием, источником которого служит избыток цитозольного кальция, образующегося вследствие нарушенной мембранной регуляции этого иона в сердце при инфаркте миокарда [2].

Способностью ГЗ связывать кальций объясняется его нормализующее действие при ишемических и травматических нарушениях [1,11,14].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о нарушении гликолипидного состава кардиомиоцитов при инфаркте миокарда. Нам представляется, что нарушение биоэнергетики сердца, аритмия, депрессия сократительной функции миокарда могут быть следствием повреждения входящих в состав мембран кардиомиоцитов нейтральных и кислых гликолипидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аврова Н.Ф., Тюрин В.А. Бюллетень эксперимен. биол. и медицины, 2, 196, 1994.
2. Гордеева А.В., Звягильская Р.А., Лобас Ю.А. Биохимия, 68, 10, 1318-1322, 2003.
3. Дятловицкая Э.В. Биохимия, 63, 1, 3125-3128, 1998.
4. Методы биохимических исследований (под редак. Прохоровой), Л, изд-во ЛГУ, 273, 1982.
5. Семенова Н.А., Конрадов А.А., Романова Г.А. Докл. Акад. наук, 335, 5, 650-652, 1994.
6. Текиева Е.А., Дятловицкая Э.В. Биохимия, 58, 10, 1641-1645, 1993.
7. Туманова С. Ю. В кн: Методы биохимических исследований, Л., изд-во ЛГУ, 1982.
8. Футерман А.Х. Биохимия, 63, 1, 89-100, 1998.
9. Folch J., Less M. et al. J.Biol.Chem., 226, 497-580, 1957.
10. Hannun J. – J.Biol.Chem. 269, 3, 125-3128, 1994.
11. Lazzaro A., Seren M.S., Koga T. et al. Exp.Neurol., 125, 2, 278-285, 1994.
12. Mahadik S.P., Makar T.K., Murthy S.N. et al. Mol,Chem. Neuropathol., 18, 2, 1-14, 1993.
13. Trindade Y.M., Daniotti J., Raimondi L. et al. Neurochemical Research, 25, 6, 591-597, 2001.
14. Zeller C.B., Marchase R.B, Am. J. Physiol., 10, 1341-1355, 1992.

Поступила 21.04.2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 567.553.1

НОВЫЙ ИСКОПАЕМЫЙ ВИД ЕЛЬЦА *LEUCISCUS* (*TELESTES*) cf. *SOUFFIA* RISSO, 1826 ИЗ ПЛЕЙСТОЦЕНОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ АРАРАТСКОЙ КОТЛОВИНЫ АРМЕНИИ

Д. З. ВАСИЛЯН

Институт зоологии НАН РА, Ереван
davitvasilyan@gmail.com

Описывается ископаемая рыба семейства карповых из плейстоценовых отложений диатомитов окрестностей села Гелайсор (Араратский марз). Согласно морфологическим и остеологическим признакам, а также строению глоточных зубов ископаемый вид описан как *Leuciscus (Telestes) cf. souffia*.

Գելայսոր գյուղի (Արարատի մարզ) շրջակայքի պլեյստոցենյան դիատոմիտային նստվածքաշերտերից հայտնաբերվել է ծածանազգի բրածո ձկնատեսակ, որն իր ձևաչափական, ոսկրաբանական հատկանիշներով և կլանային ատամների կառուցվածքով նկարագրվել է որպես *Leuciscus (Telestes) cf. souffia*:

The fossil Cyprinid fish is described in this paper. It was revealed in the Pleistocene diatomite sediment near the abandoned village Gelayzor (Ararat marz). The fossil was assumed to belong to the species *Leuciscus (Telestes) cf. souffia* based on the morphological and osteological characteristics and also on the structure of pharyngeal teeth.

Плейстоцен – ископаемые рыбы – елец

На территории Армении до настоящего времени обнаружены и описаны более 10 таксонов ископаемых костистых рыб [2]. Они представлены как морскими видами - роды *Clupea* (Clupeiformes), *Atherina* (Atheriniformes), *Prolebias* (Cyprinodontiformes), так и пресноводными - роды *Salmo* (Salmoniformes), *Alburnus*, *Rutilus*, *Capoeta*, *Palaeoleuciscus* (Cypriniformes), *Silurus* (Siluriformes) [2].

Ихтиофауна плио-плейстоценового периода Армении сравнительно хорошо исследована. Так, из верхнеплиоценово-нижнеплейстоценовых диатомовых отложений р. Воротан были обнаружены и описаны *Alburnus sisianensis* [2], *Barbus* sp. [3], *Salmo derzhavini* Vladimirov, 1946 [1], *Salmo* sp. [4], из плейстоценовых отложений (местонахождение Гелайсор) - *Capoeta* sp., *Barbus* sp. [7].

В 2006 г. совместная экспедиция Института зоологии, Института ботаники НАН РА и Армянского государственного педагогического университета им. Х. Абовяна посетила местонахождение диатомовых отложений горы Чардаш между руслами рр. Азат и Веди в окрестностях заброшенного с. Гелайсор, где ранее в плейстоценовый период существовало пресноводное озеро, на что указывают мощные отложения диатомитов. В данном районе были обнаружены останки карповых рыб, описание и идентификация которых является целью данной работы.

Материал и методика. Обнаружены и изучены останки карповых рыб (всего 18 экз.), которые включают как изолированные кости нейрокраниума, висцерального, осевого скелетов, глоточные зубы, так и полный скелет. Сборы были проведены из горизонтов диатомовых отложений 1, 2 и 4 около заброшенного с. Гелайсор (Аракатский марз, Республика Армения; 40° 01' 37" N, 44° 48' 57" E).

Описание дано по полному скелету (колл. номер GLS-06/15)(рис. 1). Подсчет количества позвонков произведен по их отпечаткам.

Для сравнения морфологических и остеологических признаков были изготовлены остеологические препараты *Leuciscus (Squalius) cephalus orientalis* (Nordman, 1840) (8 экз., р. Мецамор), а также использованы коллекционные фонды Баварского государственного музея палеонтологии и геологии BSsPG (Мюнхен), Института палеоанатомии, исследований доместикации и истории ветеринарии IPDfGT, (Мюнхен) Национального музея естественных наук MNCNM (Мадрид) и литературные данные. Исследуемые нами останки рыб из этих фондов были сравнены с *Leuciscus (Telestes) souffia* (Германия) (BSsPG), *L. leuciscus* (Германия) (IPDfGT, BSsPG), *L. idus* IPDfGT, BSsPG (Германия), *L. etilius* (Верхний миоцен) [9], *Leuciscus (Squalius) cephalus* IPDfGT (Германия), *L. (S.) carolitertii* MNCNM (Испания), *L. (S.) alburnoides* MNCNM (Испания).

При изучении морфометрических признаков использовали систему промеров стандартной методики Правдина [5], а для глоточных зубов - систему промеров по Сычевской [6].

В работе приняты следующие сокращения: SL-стандартная длина, D, A – число лучей соответственно в спинном и анальном плавниках, ао-длина рыла, о-горизонтальный диаметр орбиты, оор-посторбитальная длина орбиты, lc-длина головы, hc-высота головы у затылка, аD-антедорсальное расстояние, аА-антеанальное расстояние, аV-антевентральное расстояние, аР-антепекторальное расстояние, рD-постдорсальное расстояние, Н-наибольшая высота тела, h-наименьшая высота тела, lрс-длина хвостового стебля, ID-длина основания спинного плавника, hD-высота спинного плавника, IP-длина грудных плавников, PV-пекто-вентральное расстояние, VA-вентроанальное расстояние, C_м-длина средних лучей хвостового плавника, C_г-длина лучей нижней лопасти хвостового плавника.

Описание. D III 8, A III 8. Тело удлинненное, низкое. Максимальная высота содержится в SL 4,6 раза. Голова крупная. Длина головы укладывается в SL 3,5 раза и больше максимальной высоты тела в 1,3 раза. Высота головы у затылка ок. 0,8 ее длины. Длина рыла больше горизонтального диаметра орбиты, последняя составляет менее трети длины головы. Рот конечный. Линия спины идет прямо, немного снижается к уровню конца анального плавника, затем почти прямо продолжается до основания хвостового плавника. Хвостовой стебель в задней части слегка пережат, несколько расширяясь к концу хвостового стебля. Он составляет почти 1/5 SL и почти в 1,3 раза превышает наименьшую высоту тела (рис. 1).



Рис. 1. Внешний вид ископаемой рыбы *Leuciscus (Telestes) cf. souffia* GLS-06/15 (масштаб 1 см).

Спинной плавник расположен немного сзади вертикали основания брюшных плавников, по высоте превышает основание почти в 1,3 раза и составляет ок. 1/7 длины тела. Верхний край плавника в передней части кососрезанный. Первый неветвистый луч зачаточный. Интерпофизов 10, первые достигают остистых отростков туловищных позвонков.

Начало анального плавника расположено немного позади за вертикалью конца спинного плавника. Брюшные плавники расположены несколько позади середины тела, ближе к началу основания анального плавника. Грудные плавники расположены низко, ближе к вентральному краю тела, почти на одной линии с брюшными.

Хвостовой плавник выемчатый. Его нижняя лопасть несколько закругленная. Длина лучей нижней лопасти хвостового плавника больше максимальной высоты тела, а длина средних лучей составляет больше половины длины лучей нижней лопасти. В хвостовом плавнике 19 развитых крупных членистых лучей. В поддержании хвостового плавника участвуют 3 последних позвонка, из которых 2 преуральные. Гипуралий – 6, из которых 3-я, 4-я, 5-я и 6-я аутогенны. Первая гипуралия тоньше 5-ти последующих, последняя – меньшая. Эпуралия одна, удлиненная, тонкая, находится около верхней части уростиля. Последний позвонок несет короткую невральную дугу, с ним граничит эпуралия.

В осевом скелете 42 (43) позвонка, из которых первые 4 - позвонки Веберова аппарата. Линия позвоночника начиная от спинного плавника слабо S-образно изгибается вниз.

Чешуя крупная, с округлыми краями. У изученного экземпляра чешуи несут 3 четкие концентрические линии нарастания, соответствующие трехлетнему биологическому возрасту рыбы (рис. 2).



Рис. 2. Чешуя *Leuciscus (Telestes) cf. souffia* (масштаб 1 мм).

Обнаружены также два глоточных зуба: один с внутреннего, другой с внешнего ряда глоточных зубов. Длина зуба левой глоточной кости 2,6 мм. (рис. 3).

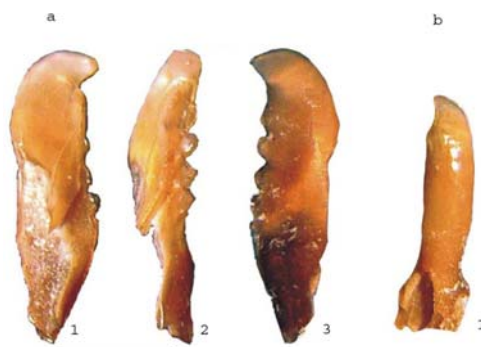


Рис. 3. Глоточные зубы *Leuciscus (Telestes) cf. souffia*: а – глоточный зуб первого ряда; 1 – вид слева, 2 – спереди, 3 – справа; б – глоточный зуб второго ряда; 1 – вид справа (масштаб 1 мм).

Его вершина вытянута перпендикулярно оси зуба и имеет крючкообразную форму. Жевательный край косо срезан. Жевательная поверхность в виде глубокого и сравнительно широкого желобка спускается до брюшка, почти не сужается по всей длине. Ее длина 1,35 мм. Край глоточных зубов с левой стороны зазубрен с 5-ю зубчиками, а с другой – гладкий. Вершины зубчиков слегка заострены. Угол крючка от оси зуба составляет 90° , жевательной поверхности – 20° .

Размеры. SL 115 мм. Измерения в % lc: r-27,39, o-19,51, oop-7,93; в % SL: r-6,94, o-5,56, oop-19,49, lc-28,47, hc-22,40, aD-57,73, aA-74,74, aV-53,65, aP-28,04, pD-33,68, H-21,7, h-14,24, lpc-18,23, lD-11,72, hD-14,76, l-15,63, PV-26,04, VA-21,53, C_m - 17,36, C_i - 29,51.

Сравнительные замечания. На основании морфометрических признаков (количество ветвистых и неветвистых лучей в спинном и анальном плавниках, расположение брюшных, спинного и анального плавников, количество позвонков, строение и форма глоточных зубов, форма тела и чешуи) обнаруженная ископаемая рыба отнесена нами к роду ельцов *Leuciscus* Cuvier, 1816, виды которого в настоящее время широко распространены в водоемах Европы, Азии и Северной Америки.

Сравнение глоточных зубов и костей ископаемого вида рыбы с вышеперечисленными видами этого рода выявило сходство (формой, размерами, расположением зубчиков только на одной стороне жевательной поверхности, количеством зубчиков на жевательной поверхности, углом крючка и жевательной поверхности) ископаемого вида только с *L. (S.) cephalus* и *L. (T.) souffia*.

Были сравнены также кости нейрокраниума (frontale, parietale) и висцерального скелета (dentale, maxillare, hyomandibulare, cleitrum, lacrimale) ископаемого вида с ныне живущими представителями этого рода рыб. Сравнение выявило, что по строению и форме parietale он схож с *L. idus*, по hyomandibulare - с *L. (S.) cephalus*, по строению dentale, maxillare, cleitrum, frontale ископаемый вид идентичен с *L. (T.) souffia*, однако сильно отличается по строению lacrimale и hyomandibulare.

Таким образом, изученный нами ископаемый вид рыбы обнаруживает наибольшее сходство с *L.(T.) souffia*, который в настоящее время населяет водоемы центральной Германии, Австрии, Италии, севера Балканского полуострова и является сравнительно теплолюбивым видом [8]. Однако, учитывая обнаруженные различия по костям висцерального скелета сравниваемых рыб, мы считаем правильным описать новый ископаемый вид рыбы из Армении как *Leuciscus (Telestes)* cf. *souffia*.

Обнаружение нового для палеоихтиофауны Армении вида рыб представляет особый интерес, так как такие находки позволяют пролить свет на пути формирования современной ихтиофауны Армении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров В.И. Докл. АН Арм. ССР. IV. 4. С. 123-128, 1946.
2. Пипоян С.Х.. Вопросы ихтиологии. 43, 4. С. 562-564, 2003.
3. Пипоян С. Х., Габриелян И. Г. Тез. докл. науч. конф. инст-а зоол. НАН РА. С. 92-93, 2001.
4. Пипоян С., Карапетян С., Габриелян И. Мат. регион. конф., посвященной 60-летию института зоологии НАН РА. Ереван, С. 124-126, 2003.
5. Правдин И.Ф. Руководство по изучению рыб. М., Пищепромиздат. 375 с., 1966.
6. Сычевская Е.К. Тр. Совмест. Сов.-Монг. палеонтол. экспедиции. Вып. 29. М., 144 с. 1989.
7. Рухкян Р.Г. Кариология и происхождение форелей Закавказья. Ереван, 165 с. 1989.
8. Bănărescu P., Herzig-Straschil B. Ann. Naturhist. Mus. Wien. 100B, S. 405-424, 1998.
9. Rückert-Ülkümen N. N. Jb. Geol. Paläont. Mh. N. 10, S. 636-645, 1995.

Поступила 22.04.2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581.132:581.17:581.193

ИНТЕНСИВНОСТЬ МИГРАЦИИ БИОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ТРАВЯНЫХ ЦЕНОЗАХ ПО ВЫСОТНЫМ ПОЯСАМ ГОРНЫХ ЭКОСИСТЕМ

Р.Г. РЕВАЗЯН, А.Г. САКОЯН, Э.А. САФРАЗБЕКЯН

Центр эколого-ноосферных исследований НАН РА Ереван,

E-mail: eco-centr@mail.ru

Дана комплексная оценка форм миграции и баланса биогенных элементов в горных экосистемах по высотному диапазону абсолютных высот (1900-3285 м). Показано, что наибольшая трансформация потока веществ в горных экосистемах происходит в почвенно-биотическом блоке лугостепного пояса.

Установлен ряд закономерностей, характеризующий специфику биогеохимической цикличности, обладающей различной емкостью и интенсивностью в зависимости от высотных поясов и позволяющей решать не только экологическую, но и задачу повышения первичной биологической продуктивности травяных ценозов.

Տրված է լեռնային էկոհամակարգերում ըստ բացարձակ բարձրության սահմանների (1900-3285 մ) կենսածին տարրերի միգրացիայի և հաշվեկշռի ձևերի կոմպլեքս գնահատում: Պարզված է, որ լեռնային էկոհամակարգերում տարրերի հոսքի ամենամեծ տրանսֆորմացիան կատարվում է մարգագետնատափաստանային գոտու հողաբիոտիկ բլոկում:

Բացահայտված են մի շարք օրինաչափություններ, որոնք բնութագրում են տարբեր տարողունակությամբ և ինտենսիվությամբ օժտված կենսաերկրաքիմիական ցիկլայնության յուրահատկությունը, կապված բարձր գոտիականության հետ: Այդ օրինաչափությունները թույլ են տալիս լուծել ոչ միայն էկոլոգիական, այլ նաև առաջնային կենսաբանական արդյունավետության բարձրացման խնդիրներ խոտային ցենոզներում:

We provided a complex assessment of migration and balance of biogen elements in mountain ecosystems by altitudinal range of absolute height (1900-3285 m). As indicated, maximal transformation of element flow in mountain ecosystems is common to a soil-biotic block of meadow-steppe belt.

We established a series of regularities characterizing the specificity of biogeochemical cyclisity which capacity and intensity depends on altitudinal belts. The established regularities allow solving ecological problems and achieving the improvement of primary biological productivity of grasslands.

*Биогеохимическая цикличность - биогенные элементы -
лизиметрические растворы - баланс элементов*

Вопросы миграции химических элементов в пределах экосистем на современном этапе приобретают особое значение в связи с факторами, определяющими биогеохимические циклы, которые отражают не только их экологическую сущность, но и продукционно-деструкционные процессы. Последние причастны как к решению проблем охраны окружающей среды, так и к повышению первичной биологической продуктивности.

В целях решения комплексной задачи биогеохимическая цикличность и баланс биогенных элементов изучались нами во всей совокупности потоков веществ с учетом их поступления с атмосферными осадками, распределения химических элементов по структурным компонентам фитоценозов и выщелачивания в инфильтрационные воды.

Миграция химических веществ сопровождается их перераспределением по профилю почвы в результате процессов растворения, обменных реакций, выноса их из корнеобитаемого слоя [4]. Особую ценность представляют лизиметрические исследования, которые позволяют оценить потери питательных веществ вследствие выщелачивания в условиях, близких к природным [9].

Программа исследований предусматривала изучение миграционных процессов и определение интенсивности разных форм миграции биогенных элементов в различных географических поясах Арагацкого массива.

Материал и методика. Объектами исследования были выбраны южные склоны Арагацкого массива. Комплексные исследования, характеризующие современное состояние экосистем, проводили по высотной поясности (диапазон абсолютных высот 1900-3285 м) и выполнены на ландшафтно-геохимическом уровне.

Методическую основу исследований составляет изучение биогеохимии основных компонентов экосистемы и миграционных потоков веществ.

Для выражения интенсивности миграции мы воспользовались подходами Титляновой [8].

Интенсивность абиотической миграции I_a (кг/га·год) определяется общим объемом входа - поступления атмосферных осадков в экосистему и выхода-стока, проходящего через полуметровую почвенную толщу (в лизиметрические растворы):

$$I_a = I_t + I_w,$$

где I_t – поступление, I_w – выщелачивание, кг/га·год.

Интенсивность биотической миграции I_b (кг/га·год) определяется чистой первичной продукцией и элементным составом фитомассы, а также поступлением элемента с возвращаемой массой (стерня, опад и корни) и выносом элемента с отчуждаемой фитомассой (сено):

$$I_b = P \cdot K,$$

где P – продуктивность, K – концентрация элемента.

Для характеристики общей миграции нами предложена интенсивность биогеохимической цикличности, которая определяется суммой интенсивности абиотической и биотической миграций:

$$I_{\text{БГХЦ}} = I_a + I_b$$

Полевые работы в пределах лугостепного и альпийского поясов проводили на серии ключевых участков (в типичных условиях экосистем высотного ряда) и включали отбор проб: почв, растений и вод (атмосферные осадки, лизиметрические растворы). Число проб по обоим поясам за 2005-2007гг. составляет 300, число анализов 660.

Изучение вертикального почвенного стока проводили лизиметрическим методом. Плосковрезанные лизиметры были установлены под горизонтами почв, при этом не нарушая растительного покрова и подстилки и в наименьшей степени деформируя строение и сложение почвы. Отбор лизиметрических вод выполнялся посезонно. Отбор и анализ проб почв и растительности выполняли по общепринятым методам ландшафтно-геохимических и агрохимических исследований [2, 3, 10].

Первым этапом аналитической обработки проб вод было разделение твердой и жидкой составляющих фаз раствора. Определение макрокомпонентов всех проб воды выполняли по стандартным гидрохимическим методикам [1, 7].

Результаты и обсуждение. Миграция химических веществ сопровождается их перераспределением и дифференциацией по профилю почвы в результате процессов растворения, осаждения, выноса и закрепления взвешенных частиц.

Для общей характеристики миграционных процессов почвенно-биотического блока значимым считаем не только изучение форм миграции, но и баланса элементов в экосистеме, позволяющего выявить его регуляторную роль в миграции элементов.

В табл. 1 представлены данные баланса макрокомпонентов в экосистемах лугостепного и альпийского поясов Арагацского массива.

Сопоставление модулей поступления и выноса элементов показывает, что наиболее высокое содержание характерно для гидрокарбонат- и сульфат-ионов. Гидрокарбонат-ион является звеном миграционного потока углерода, включающего как абиотическую, так и биотическую составляющие и отражающего специфику трансформации органического вещества в экосистеме. Достаточно стабилен баланс сульфат- и натрий-ионов.

Поведение кальция с геохимических позиций несколько противоречиво: с одной стороны он выносится со стоком и в то же время в значительном количестве аккумулируется в экосистеме (почве, биомассе, подстилке).

Калий и магний, несмотря на высокую миграционную подвижность и значительные запасы в почве, в основном закрепляются в почве и не выносятся из нее. Баланс калия для обоих поясов положительный, а магния для альпийского пояса положительный, для лугостепного – отрицательный. Хлор, являясь активным водным мигрантом [5], тем не менее в обоих поясах проявляет положительный баланс, т.е. хлор задерживается в экосистеме.

Таблица 1. Баланс макрокомпонентов в экосистемах Арагацкого массива по высотным поясам, кг/га·год (среднее за 2005-2007гг)

Пояса над ур.м., м	Глубина лизиметра, см	NH_4^+	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	SO_4^{2-}	HCO_3^-	Cl^-	NO_3^-	HPO_4^{2-}	Сумма
Поступление химических веществ в экосистему с атмосферными осадками												
Лугостепной 2085		4,3	10,3	8,3	35,4	14,5	68,0	44,0	22,0	8,9	0,2	215,9
Альпийский 3270		3,2	7,5	5,6	28,0	8,4	55,2	29,7	13,3	3,7	0,3	154,9
Потери химических веществ из почвы												
Лугостепной 2085	0-50	2,0	3,0	5,0	38,0	15,0	75,9	52,0	10,0	15,0	0,25	215,25
Альпийский 3270	0-50	0,2	4,5	3,9	20,0	5,5	41,5	29,15	6,5	2,2	0,75	114,2
Баланс элементов												
Лугостепной 2085		2,3	7,3	3,3	-2,6	-0,5	-7,0	-8,0	12,0	-6,1	-0,05	
Альпийский 3270		3,0	3,0	1,7	8,0	2,9	13,7	0,55	6,8	1,5	-0,45	

Наиболее значимые различия установлены для ионов NO_3^- и HPO_4^{2-} . Баланс для обоих ионов и поясов отрицательный. При этом высокие потери для иона NO_3^- отмечаются в лугостепном поясе, а иона HPO_4^{2-} - в альпийском. В первом случае это связано с высокой нитрификационной способностью почв, а во втором – с их кислой реакцией.

Сравнение состава основных миграционных потоков веществ от входа в экосистему (атмосферные осадки) до выхода из нее (вертикальный сток) показало, что наибольшая трансформация миграционного потока веществ в горных экосистемах Арагацкого массива происходит в почвенно-биотическом блоке лугостепного пояса.

Анализ данных баланса элементов показал, что экосистемы альпийского пояса в основном являются аккумулятивными, а экосистемы лугостепного пояса – элювиальными.

Интенсивность потоков химических веществ представлена в табл. 2, где показаны позиции абиотической, биотической и общей миграции.

В качестве обобщенных экологических воздействий на экосистему рассмотрим интенсивность абиотических и обменных биотических процессов, долю абиотических в общей системе обменных процессов, запасы азота, фосфора и калия в живой фитомассе, в почве, чистую первичную продукцию и общую миграцию (табл. 2).

Таблица 2. Интенсивность миграционных потоков по высотным поясам, кг/га · год (среднее за 2005-2007гг)

Интенсивность миграции			N	P	K
Абиотической		Лугостепной пояс			
		Вход	12,3	0,16	10,4
		Выход	17,0	0,25	3,0
		I _a	29,3	0,41	13,4
		Альпийский пояс			
		Вход	10,4	0,30	12,8
		Выход	2,4	0,20	1,2
		I _a	12,8	0,50	14,0
Лугостепной пояс					
Биотической	Вход	Возвращаемая фитомасса	420,0	94,5	455,0
		Коэффициент вариации	23	24	27
	Выход	Отчуждаемая фитомасса	2562,0	768,6	2196,0
		Коэффициент вариации	28	29	31
	I _b		2982,0	863,1	2651,0
	Альпийский пояс				
	Вход	Возвращаемая фитомасса	83,6	30,4	106,4
		Коэффициент вариации	11	13	15
	Выход	Отчуждаемая фитомасса	1120,0	380,0	1368,0
		Коэффициент вариации	22	22	25
	I _b		1203,6	410,4	1474,4
	Биогеохимической (общая)		Лугостепной пояс	3011,3	863,5
Альпийский пояс			1216,4	410,9	1488,4
Доля абиотической миграции в общей		Лугостепной пояс	0,96	0,05	0,50
		Альпийский пояс	1,04	0,12	0,93

Интенсивность абиотической миграции азота в лугостепном поясе в 2,3 раза выше интенсивности в альпийском поясе; что касается фосфора и калия, то здесь показатели миграции примерно равные.

Величины интенсивности абиотической миграции для лугостепного пояса показывают, что разница по сумме элементов между входом и выходом составляет 2,6 кг/га·год, при этом входные абиотические потоки имеют невысокую интенсивность, в альпийском же поясе она равна 19,7 кг/га·год, и напротив, выходные абиотические потоки имеют низкую интенсивность.

Величины интенсивности биотических обменных процессов показывают, что разница по сумме элементов между входом и выходом очень большая по азоту и калию, здесь баланс элементов отрицательный как для лугостепного, так и альпийского поясов. Интенсивность биотической миграции заметно уменьшается в альпийском поясе. Это, очевидно, объясняется тем, что контролирующим фактором являются не запасы их в почве, а интенсивность абиотической миграции элементов, имеющая большое значение в общей системе обменных процессов.

Интенсивность общей миграции мы характеризуем как биогеохимическую, включающую сумму интенсивности абиотических и биотических процессов. Интенсивность биогеохимической миграции является циклической, поскольку происходит мобилизация всех химических элементов в циклическое движение в различных природных средах, а также обмен между растительным ценозом и другими компонентами биосферы.

Полученные результаты показали, что интенсивность биогеохимической миграции в лугостепном поясе по азоту в 2,5, по фосфору в 2,0, по калию в 1,8 раза выше, чем в альпийском поясе. При этом доля абиотической миграции в общей составляет для лугостепного пояса: по азоту 0,96%, по фосфору 0,05%, а по калию 0,5%; для альпийского пояса она несколько выше.

Следовательно, во всех изученных травяных экосистемах наибольшей интенсивностью характеризуются обменные процессы, связанные с растительными организмами, формирующими биогеохимическую цикличность. При этом интенсивность биогеохимической миграции дает прямую информацию о специфике не только почвенного блока, растительности, но и экосистемы в целом и является одним из её важнейших индикационных показателей [6].

В целом для луговых ценозов характерна значительно большая интенсивность обменных процессов, обусловленных жизнедеятельностью растений при подчиненном значении абиотической миграции, где наиболее существенна роль поступления элементов с атмосферными осадками и выноса с лизиметрическими водами. При этом убыль элементов отражает протекающие в экосистемах современные почвенные процессы, связанные с денудацией поверхности почв. Разница в азоте, полученная в балансе, отражает, вероятно, неучтенные потоки, связанные со смыванием органических остатков поверхностным стоком, и потоки, обусловленные азотфиксирующей и денитрифицирующей деятельностью микроорганизмов.

Таким образом, биогеохимическая цикличность в обоих географических поясах разворачивается на фоне абиотических и биотических обменных процессов и обладает различной емкостью и интенсивностью; связь между ними как геохимически, так и экологически осуществляется потоками веществ на входах и выходах экосистем. Механизм повышения активности, очевидно, очень сложен, и причины этого кроются не только во влиянии внешних факторов природной среды, но и во внутренней организации биоты.

Выявление закономерностей интенсивности потоков биогенных элементов выдвигает проблему биогеохимической цикличности в число ведущих экологических проблем в связи с необходимостью оптимизации экосистем.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Алекин О.А.* Химический анализ вод суши – Гидромет., 223с. 1954.
2. *Аринушкина Е.В.* Руководство по химическому анализу почв. М.: Изд-во МГУ, 487с., 1970.
3. *Глазовская М.А.* Геохимические основы типологии и методики исследований природных ландшафтов. – М.: Наука, 230с., 1964.
4. *Ковда В.А.* Биогеохимия почвенного покрова. – М.: Наука, 263с., 1985.
5. *Перельман А.И.* Геохимия ландшафта. – М.: Высш. шк., 342с., 1975.
6. *Ревазян Р.Г.* Материалы докл. V международной биогеохимической школы “Актуальные проблемы геохимической экологии” Семипалатинск, Казахстан: Семипалатинский гос. пед.ин-т, с.492-494, 2005.
7. *Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю.* Методы анализа природных вод. – М.: Госгеолит, 334с., 1963.
8. *Титлянова А.А.* - Биологический круговорот углерода в травяных биогеоценозах. Новосибирск, 219с., 1977.
9. *Шилова Е.И.* Применение лизиметрических методов в почвоведении, агрохимии и ландшафтоведении. Л.: Наука, с.1 –21, 1972.
10. *Юдин Ф.А.* Методика агрохимических исследований. – М.: Колос, 272с., 1971.

Поступила 07.05.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 631.589.2.

**ВЛИЯНИЕ БАЗИЛИКА ЛИМОННОГО
OCIMUM BASILICUM L. V. CITROL НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ
СОСТОЯНИЕ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ У
КРЫС В НОРМЕ И ПРИ СТРЕССЕ**

**Х.О. НАГАПЕТЯН¹, М.А. БАБАХАНИЯН², Л.А. МАТИНЯН¹,
Ш.В. ГРИГОРЯН¹, Т.Г. НИКОГОСЯН¹, А.З. АРУТЮНЯН¹,
Л.В. НУРБЕКЯН¹**

¹Институт физиологии им. акад. Л.А.Орбели НАН РА, Ереван;

²Институт проблем гидропоники им. акад. Г.С.Давтяна НАН РА, Ереван

Показано, что базилик лимонный *Ocimum basilicum* L. v.citrol, выращенный гидропонным методом, благодаря большому содержанию йода (от 2,6 до 6,4 мг/100 г сухого вещества) оказывает успокаивающее действие на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (частоту сердечных сокращений и систолическое артериальное давление) у крыс как в норме, так и при воздействии стресс-факторов.

Ցույց է տրվել, որ հիդրոպոնային մեթոդով աճեցված կիտրոնային բազիլիկը *Ocimum basilicum* L. v. citrol, շնորհիվ յոդի մեծ քանակի պարունակության /2,6-6,4 մգ/100գ չոր նյութում/, ցուցաբերում է հանգստացնող ազդեցություն առնետների սրտանոթային համակարգի գործունեության /սրտի կծկումների հաճախականության, արյան սիստոլիկ ճնշման/ վրա, ինչպես բնականում, այնպես էլ ստրեսային գոծոնների ազդեցության պայմաններում:

It is shown that the *lemon basil Ocimum basilicum* L. v. citrol, which has been grown by hydroponic method, is rich with Iodine (2,6 – 4,6 mg/100 g dry matter) and exerts soothing influence on the rats functional condition of cardiovascular system (cardiac beat frequency and systolic arterial pressure) in the normal and interacted stress – factors states.

Базилик лимонный - частота сердечных сокращений -систолическое артериальное давление - эмоционально-звуковой стресс

Базилик обыкновенный *Ocimum basilicum* L. однолетнее растение семейства губоцветных (Labiata) [5]. Наземная часть растения содержит эфирные масла, глюкозиды, сапонины и др. биологически активные вещества. В Армении базилик обыкновенный выращивается издавна, входит в состав основных пряно-ароматических растений, широко употребляемых в пищу в сыром и сушеном виде.

Листья базилика содержат витамин Р, провитамин А. В медицинской практике применяется как возбуждающее средство при угнетении ЦНС, при ослаблении функции дыхания и нарушении кровообращения, а также как общеукрепляющее средство, что объясняется содержанием в них камфоры и др. эфирных масел [5].

В медицинской практике используются и другие виды базилика, такие как базилик мятелистный (*O. menthaeformum Hochst*) и эвгенольный (*O. gratissimum*) [1].

В условиях Армении и Арцаха выращивается новая разновидность базилика – базилик лимонный (*Ocimum basilicum* L. v. *citrol*), семена которого одним из авторов настоящей работы (Бабаханян М.А.) были получены в 1999 г. из США и выращены в сравнительных условиях на почве и открытой гидропонике в Армении и Арцахе [2].

Базилик лимонный-БЛ (*O. basilicum* L. v. *citrol*) - однолетнее травянистое растение, высотой 30-45 см, с тонкими разветвленными корнями, четырехгранными ветвистыми стеблями и супротивными, черешковыми, цельнокрайними, удлинённо-овальными, вверху удлинённо-заостренными листьями длиной 5-6 см и шириной 1,2-2 см.

В надземной части, особенно в листьях, содержится эфирное масло (особенно компонент эвгенол, метилхавинол, цинеол и др.), дубильные вещества, сахар, белки, минеральные вещества. Может использоваться в пищу как приправа, для приготовления оздоровительных чаев – возбуждает аппетит, улучшает пищеварение, оказывает противовоспалительное и смягчающее действие. Пригодно для лечебных целей в стоматологической практике, косметологии и при лечении желудочно-кишечных заболеваний.

В настоящей работе представлены результаты изучения влияния выращенного гидропонным методом базилика лимонного на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (ССС), т.е. на частоту сердечных сокращений (ЧСС) и величину систолического артериального давления (САД) у интактных бодрствующих крыс и крыс, перенесших действие иммобилизационного и эмоционально-звукового стрессорных факторов.

Материал и методика. Опыты проводили на белых крысах самках в двух сериях, по 10 животных в каждой. Крысы первой серии служили контролем, у которых периодически после частичной иммобилизации и успокоения определяли ЧСС (уд/мин) и САД до, а затем на фоне действия эмоционально-звукового стресса (ЭЗС) и в разные сроки после прекращения стрессорного действия. У крыс второй серии определяли те же параметры, однако после включения в пищевой рацион каждой крысы по 100 мг/сут фитопрепарата базилика лимонного (ФП БЛ) в течение 20 дней. Регистрацию исследуемых параметров проводили сразу, спустя 10 и 20 сут после прекращения дачи животным ФП БЛ. Измерение САД проводили с помощью фотоэлектрического датчика, состоящего из источника света – лампочки, фоточувствительного элемента-фототриода с предусилителем и конечным усилителем, подключенным к входу осциллографа. В корпус датчика вмонтирована кольцевая манжетка, соединенная со стрелочным манометром.

Для измерения САД датчик надевается на хвост иммобилизированной в спец.клетке крысы. После успокоения животного в манжетку нагнетается воздух, закрывая приток крови в хвостовую артерию. По ходу постепенного выпуска воздуха из манжетки фиксировали момент восстановления кровотока в хвостовой артерии, что приводило к изменению светового потока, попадающего на фототриод чувствительного элемента, превращающего их в электрический сигнал. После усиления этих сигналов окончательным усилителем они поступают на вход осциллографа (С1-19). Начиная с момента восстановления кровотока в хвостовой артерии, на экране осциллографа появлялись пульсовые колебания. В этот момент регистрируются показания стрелочного манометра, что составляет САД. После возникновения пульсовых колебаний на экране осциллографа по ним и подсчитывали ЧСС.

В качестве ЭЗС-фактора использовали 30-минутное действие крысиного писка, записанного на магнитофонной ленте [3,4].

Результаты и обсуждение. В проведенных исследованиях как воздействующий на ССС фактор использовали БЛ, выращенный гидропонным методом и содержащий большое количество йода. Сравнительные данные по изучению количественного содержания йода в различных видах базилика, выращенных в сравнительных условиях на почве и на открытой гидропонике, представленные в табл. 1, показывают, что при гидропонном методе выращивания БЛ, содержание йода в нем почти в три раза превышает содержание в образцах, выращенных в почвенных условиях. Так, если содержание йода в базилике обыкновенном, выращенном в почвенных условиях, доходило до 1 мг/100 г сух. в-ва, а при гидропонном способе до 1,6 мг/100 г сух. в-ва, то при выращивании БЛ количественное содержание йода в обычных условиях выращивания составляло 1,6 мг/100 г сух. в-ва, а при гидропонном методе оно доходило до 6,4 мг/100 г сух. в-ва, т.е. в последнем варианте наблюдается четырехкратное увеличение содержания йода.

Таблица 1. Количественное содержание йода в различных видах базилика, выращенных в сравнительных условиях на почве и открытой гидропонике

Базилик	Условия выращивания	Содержание йода, мг/100г сух. в-ва
Обыкновенный	Почвенный	0,9-1,0
	Гидропонный	1,1-1,6
Лимонный	Почвенный	1,3-1,5
	Гидропонный	2,6-6,4

Количественный анализ содержания йода в различных видах базилика проводился в гидрохимической лаборатории (зав. Г.Шагинян) Института проблем гидропоники НАН РА.

Следует отметить, что крысы контрольной группы очень охотно съедали лепешку из творога, а опытной – такую же лепешку со смесью ФП БЛ - не очень.

У контрольных крыс, не получавших ФП БЛ, воздействие ЭЗС приводило к некоторому увеличению ЧСС - в пределах 40 уд/мин, которое продолжалось и после выключения стрессорного воздействия доходя до 90 уд/мин от исходного уровня. У животных, получавших ФП БЛ, ЧСС почти не менялась как на фоне воздействия ЭЗС, так и после прекращения его действия. Однако спустя 10 сут после прекращения дачи крысам ФП БЛ наблюдалось небольшое учащение ЧСС – до 20-25 уд/мин, которое не менялось от действия ЭЗС (табл.2). Эти данные указывают, вероятно, на то, что гидропонным способом выращенный ФП, благодаря содержанию в нем большого количества йода (2,6-6.4 мг/100 г сух. в-ва), оказывает определенное смягчающее влияние на ЧСС. Об этом свидетельствуют и результаты измерения САД. Так, у интактных частично обездвиженных крыс САД при воздействии ЭЗС проявило тенденцию к повышению – оно стало выше исходного уровня на 15 мм рт.ст. После прекращения воздействия ЭЗС наблюдалось некоторое снижение САД (на 5 мм рт.ст.), однако не доходящее до исходного уровня к 10-й мин. У подопытных крыс (получавших ФП БЛ) как на фоне воздействия ЭЗС, также после его прекращения со стороны САД заметных отклонений от исходного уровня не наблюдается. Регистрация, проведенная через 10 и 20 сут после прекращения дачи животным ФП БЛ, как на фоне действия стрессорного фактора, так и после его выключения, также не выявили заметных отклонений САД от исходного уровня.

Таблица 2. Функциональное состояние ССС у крыс до и в разные сроки после включения в пищевой рацион ФП БЛ

Серия	Воздействующий фактор	ЧСС			САД		
		До ЭЗС	На фоне ЭЗС	Через 10мин после ЭЗС	До ЭЗС	На фоне ЭЗС	Через 10мин после ЭЗС
Интактные	Обычное кормление	460 ± 15	500 ± 21	550 ± 24	130 ± 4	145 ± 7	140 ± 10
Базилимонный	Через 10 сут после дачи ФП БЛ	410 ± 9	440 ± 17	444 ± 21	100 ± 3	105 ± 6	100 ± 4
	Через 20 сут после дачи ФП БЛ	420 ± 12	400 ± 18	400 ± 17	115 ± 5	112 ± 8	105 ± 3

На основании этих данных можно полагать, что применение ФП БЛ может оказать существенное успокаивающее влияние на функциональное состояние ССС, в частности на ЧСС и САД.

Можно констатировать, что БЛ, особенно выращенный в гидропонных условиях, благодаря большому содержанию йода, способствует ограничению стрессорного воздействия на организм крыс, что может послужить основанием для продолжения исследований в дан-

ном направлении, преследуя цель возможности включения этого ценного растения в пищевой рацион как приправы, а также как снижающее воздействие на организм человека различных стрессоров.

Применение ФП БЛ может оказаться весьма эффективным в сохранении йодного баланса организма.

Представленные данные являются предварительными, нуждаются в дальнейших глубоких исследованиях с целью выяснения механизмов, лежащих в основе антистрессорного воздействия ФП БЛ на организм, а также для решения вопросов практических рекомендаций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Հարությունյան Լ.Վ., Հարությունյան Ա.Ա. Ֆիտոթերապիա: Երևան, Հայաստան, հ.4, էջ.161-163, 2001.
2. Бабаханян М.А., Аствацатрян Н.З., Матинян Л.А., Нагапетян Х.О. и др. Вестник МАНЭБ, С.-П. , 10, 5, с.31-36, 2005.
3. Матинян Л.А., Нагапетян Х.О., Петросян А.В. и др. Сб. “Медико-биологические проблемы стресса”, Ереван, с. 30-31, 1997.
4. Нагапетян Х.О., Матинян Л.А., Арутюнян Р.А., Арутюнян В.М. Вестник МАНЭБ, С.-П., 1 (13), с. 57-58, 1996.
5. Соколов С.Я., Замотаев И.П. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия), М., “Медицина”, 463, с., 1984.

Поступила 15.05.2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 581. 143

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ КАЛЛУСНОЙ КУЛЬТУРЫ *NERIUM OLEANDER*

Н.А. ОВАНЕСЯН, М.К. МКРТУМЯН, А. Г. ЕСАЯН

*Ереванский государственный университет,
кафедра экологии и охраны природы*

Установлено, что митотический индекс полученной на модифицированной среде Мурасиге и Скуга (МС 24) каллусной культуры олеандра *Nerium oleander* в экспоненциальной фазе роста составляет 0,78 ‰. Цитогенетическим анализом установлено, что в стационарной фазе роста в каллусных тканях преобладают паренхимные клетки, что дает основание предполагать, что в этой фазе происходит формирование и накопление вторичных метаболитов.

Ստացվել է *Nerium oleander*-ի աճման կայուն ցուցանիշներով օժտված, կայուսային հյուսվածք: Ցույց է տրվել, որ փոփոխված MS 24 միջավայրի վրա կայուսային հյուսվածքի միտոտիկ ինդեքսը աճի էքսպոնենցիալ փուլում կազմում է 0,78 ‰: Բջջագենետիկական հետազոտությունները ցույց են տվել, որ աճման ստացիոնար փուլում հյուսվածքում գերակշռում են պարենխիմատիկ բջջերը, որը հնարավորություն է տալիս ենթադրել, որ աճման այս փուլում տեղի է ունենում երկրորդային մետաբոլիտների ձևավորում և կուտակում:

Stably growing callus culture of *Nerium oleander* possessing high growth characteristics was obtained. It was shown that mitotic index of callus culture of *N. oleander* on modified Murashige and Skoog (MS 24) medium in exponential growth phase is 0.78 ‰. Cytogenetic analysis was shown that in stationary growth phase the parenchyma cells were predominate, which is suggest that in this phase the secondary metabolites are formed and accumulated.

Олеандр – каллусная ткань – митотический индекс

Возрастающее антропогенное воздействие на окружающую среду приводит к сокращению численности многих видов лекарственных растений, а также загрязнению растительного сырья различными ксенобиотиками. В качестве дополнительного источника сырья при получении продуктов вторичного метаболизма, имеющих широкое применение в медицинской, пищевой и парфюмерной промышленности, могут служить клеточные культуры растений.

Олеандр *Nerium oleander* L. является природным источником нового противоопухолевого препарата “Anvirzel”, созданного на основе водных экстрактов, содержащих сердечный гликозид олеандрин, обладающего цитотоксической активностью [14]. Нами была изучена цитотоксическая и проапоптотная активность водных экстрактов ранее полученной нами каллусной культуры *N. oleander* [7].

Культура растительных клеток, имея ряд преимуществ над традиционным сырьем (отсутствие организменного контроля, независимость от климатических условий, возможность оптимизации и стандартизации процессов, гомогенность системы), служит удобной модельной системой для изучения структуры, биосинтеза и биологической активности целевых метаболитов.

Известно, что растительные культуры *in vitro* гетерогенны и состоят из неодинаковых во многих отношениях клеток. Однако все клетки растительного организма обладают потенциальной способностью к биосинтезу вторичных метаболитов, образующихся из продуктов первичного метаболизма [5]. Вследствие тотипотентности растительных клеток, изменение внешних условий может вызвать вторичную дифференциацию, в частности, превращение меристематических клеток в паренхиматические [1]. Характер содержимого паренхиматических клеток тесно связан с выполняемыми ими функциями – синтезом и накоплением различных запасных веществ. Преобладание в каллусной ткани клеток паренхимного типа способствует синтезу и формированию вторичных веществ [4]. Следовательно, весьма важно изучить цитоморфологические и цитогенетические характеристики изучаемых каллусных тканей.

Целью нашей работы было описание ростовой активности, а также цитогенетический анализ популяций клеток каллусной ткани олеандра для дальнейшей оценки ростового и биосинтетического потенциала.

Материал и методика. Для определения размеров, видов клеток и митотического индекса отбирали каллусную ткань олеандра в экспоненциальной и стационарной фазах роста. Каллусные ткани фиксировали согласно методике Карнуа в смеси этанол – ледяная уксусная кислота (3:1). Исследования клеток проводили методом фиксации с последующим окрашиванием клеток и тканей. Для приготовления давленных препаратов ткань предварительно мацерировали 1N раствором HCl в течение 2 ч и окрашивали ацетокармином. Каллусную культуру оставляли в растворе красителя на 12-16 ч. Окрашенные клетки каллуса переносили на чистое предметное стекло в каплю 45%-ной уксусной кислоты, помещали под покровное стекло, после чего проводили микроскопирование при увеличении $\times 400$ [2, 8, 12]. Исследование клеток проводили методом светлого поля, который наиболее часто используется в цитологии для изучения окрашенных препаратов. Измерение размера клеток проводили при помощи окуляр-микрометра, цену деления которого определяли с помощью объектив-микрометра [1, 13].

Результаты и обсуждение. Подсчет числа митотических клеток в каллусной культуре *N. oleander* показал, что в экспоненциальной фазе роста митотический индекс составляет 0,78 ‰.

При микроскопическом наблюдении было обнаружено, что на агаризованной среде при оптимальных условиях культивирования в

стационарной фазе роста культуры каллусная ткань состоит из клеток, имеющих неправильную сферически-полигональную форму (рис. 1). В большинстве клеток наблюдалась хорошо развитая система вакуолей, в которых, как известно, происходит синтез вторичных метаболитов [6,11]. У молодых клеток система вакуолей развита слабо, так что можно сказать, что появление и развитие вакуолей является показателем замедления роста клеток и старения каллусной ткани. Ядра, как правило, расположены близко к клеточным мембранам, часто трудно различимы. Эти клетки, размер которых составляет 15-30 мкм, по морфологическим признакам относятся к паренхимным.

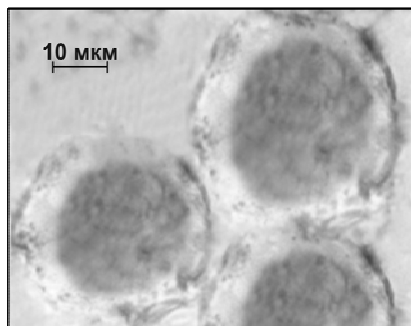


Рис 1. Паренхимные клетки в каллусной ткани *N. oleander*

При изучении давленных временных препаратов каллусной ткани олеандра были обнаружены также меристематические и трахеиподобные клетки (рис. 2, 3). Отмеченные морфологические типы клеток характерны для изолированных культур многих видов растений [9, 12]. Клетки меристематического типа преобладали в каллусной ткани *N. oleander*, находящейся в экспоненциальной фазе роста, и имели интенсивно окрашенные ядра, занимающие в клетке центральное положение. Согласно литературным данным, меристематические клетки являются активно делящимися [9].

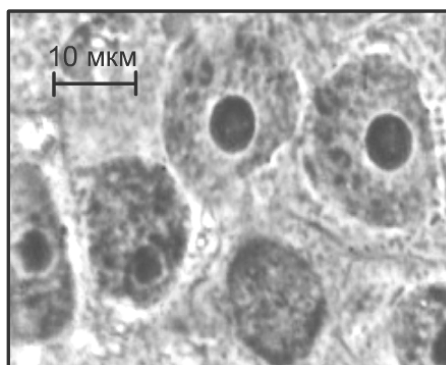


Рис 2. Клетки меристематического типа в каллусной ткани *N. oleander*

Трахеиподобные клеточные структуры, называемые также гидроцитами, являются водоносными элементами каллусных тканей. Стенки гидроцитов *N. oleander* имеют одревесневшие утолщения с окаймленными сетчатыми порами. Гидроциты имеют либо нормальные, либо дегенерирующие ядра (рис. 3).



Рис 3. Гидроциты каллусной ткани (увеличение $\times 400$) *N. oleander*

Появление гидроцитов зафиксировано уже через 48 ч после посадки эксплантов, что вполне согласуется с литературными данными [6].

Итак, в результате проведенных исследований была получена стабильно растущая каллусная культура *N. oleander*, обладающая довольно высокими ростовыми показателями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Атабекова А.И., Устинов Е.И. Цитология растений. – М.: Колос., 1967.
2. Березнеговская Л.Н., Гусев И.Ф., Дмитрук С.Е., Смородин А.В., Смородин В.В., Трофимова Н.А., Пмыкова Н.А. Культура тканей алкалоидных растений. – Томск: Изд-во Томского университета, 1975.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. – М.: Наука, 1964.
4. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе. – М.: ФБК-ПРЕСС, 1999.

Н.А. ОВАНЕСЯН и др.

5. Запрометов М.Н. Новые направления в физиологии растений. М.: Наука., – С. 143–162, 1985
6. Калинин Ф.Л. Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений /Ф.Л. Калинин, В.В. Сарнацкая, В.Е. Полищук. – Киев: Наукова думка, 1980.

-
7. Ованесян Н.А., Мкртумян М.К., Гаспарян Г.Г. Биотехнология.5.07 – С. 66-71. 2007.
 8. Паушева З.П. Практикум по цитологии растений. – М.: Колос, 1980.
 9. Фролова Л.В. Особенности популяций культивируемых клеток// Культура клеток растений.: Наука – С. 5-16, 1981.
 10. Холодова В.П. Рост и метаболизм углеводов в культуре тканей растений//Культура клеток растений – М.: Наука, 1982.
 11. Шевелуха В. С., Калашикова Е.А., Дегтярев С.В., Кочиева Е.З., Прокофьев М.И., Новиков М.И., Ковалев В.М., Калашиников Д.В., Сельскохозяйственная биотехнология. – М.: Высшая школа. 1998.
 12. Dixon, R., Gonzales. R. Plant cell culture. A practical approach. – USA: Oxford University Press, 1996.
 13. Doyle A. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology. Chichester. USA. JohnWiley&Sons, 1998.
 14. Duke, J.A. Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton.- FL: CRC Press,1985.
 15. Manna S. K., Sah N. K. Newman, R. A., Cisneros A. and Aggarwal B. B. J. of Cancer Research. 60, P. 3838-3847, 2000.

Поступила 04.06.2008



Biolog. Journal of Armenia, 1-2 (60), 2008

UDC 575.224.6

ANTIMUTAGENIC ACTIVITY OF POLYSACCHARIDE FRACTION OF *NERIUM OLEANDER* (L.) CALLUS CULTURE

N.A. HOVHANNISYAN, M.K. MKRTUMYAN, A.G. YESAYAN

Yerevan State University, Department of Ecology and Nature Protection

The antimutagenic effect of *Nerium oleander* intact plant and callus culture hot water extracts and polysaccharide fractions on the mutagenicity of sodium azide and bleomycin was investigated *in vitro* using *Salmonella typhimurium* TA 1535 as an indicator bacterium. It was shown that *N. oleander* callus tissue retains the antimutagenic effect investigated and specific for intact plant. So, *N. oleander* callus culture may be used as an alternative source of biological active substances for the mutagenesis and carcinogenesis prevention.

Ուսումնասիրված է դափնավարդի՝ *Nerium oleander*-ի ինտակտ բույսի և կալուսային հյուսվածքի ջրային լուծամզվածքների և պոլիսախարիդային ֆրակցիայի հակամուտագենային ակտիվությունը նատրիումի ազիդով և բլեոմիցինով ինդուկցված մուտացիաների դեմ պայմաններում *Salmonella typhimurium*-ի TA 1535 շտամի բջիջների վրա:

Nerium oleander-ի կալուսային հյուսվածքը պահպանում է ինտակտ բույսին բնորոշ հակամուտագենային ակտիվությունը: Հետևաբար *Nerium oleander*-ի կալուսային հյուսվածքը կարող է օգտագործվել որպես հակամուտագենային և հակառոտացիային ակտիվությամբ օժտված կենսաբանորեն ակտիվ միացությունների այլընտրանքային աղբյուր:

Изучена антимутагенная активность водных экстрактов и полисахаридной фракции интактного растения и каллусной культуры *Nerium oleander* на мутагенный эффект азиды натрия и блеомицина *in vitro* на клетках *Salmonella typhimurium* шт. TA 1535.

Показано, что каллусная культура *N. oleander* сохраняет антимутагенную активность, свойственную интактному растению. Следовательно, каллусная культура *N. oleander* может использоваться как альтернативный источник биологически активных веществ с антимутагенной и антираковой активностью.

*Antimutagen – Salmonella - Nerium oleander – bleomycin –
sodium azide - polysaccharides*

There has been increasing interest in anticarcinogens of plant origin in recent years. It is now becoming clear that higher plants contain a variety of preformed secondary metabolites that represent a structurally diverse array of mutagenic, antimutagenic, and desmutagenic substances.

Study of such substances can lead to much interesting details about the processes of mutagenicity and antimutagenicity. In addition, detection and identification of agents known as antimutagens, which inhibit mutagenesis, are very important because DNA damage is crucial in variety of diseases and degenerative processes. Especially, antimutagen agents present in human dietary products and in preparations for cancer therapy are of great importance because they can act as preventive substances.

The plant *Nerium oleander* (L) is known in the folk medicine. Hot water extracts of *N. oleander* patented as Anvirzel were shown to be cytotoxic for human cancer cells [10]. The extract has been found to comprise several polysaccharides with very potent immune stimulating properties [10]. The cytotoxic and apoptosis – inducing properties of *N. oleander* plant and callus tissue culture hot water extracts for human transformed cell lines *in vitro* have been specified by us early [5-7]. In the present study the antimutagenic efficacy of *N. oleander* intact plant and callus tissue hot water extracts and polysaccharide fraction were tested. The Ames mutagenicity test has been used as a simple primary screen for antimutagenesis [4]. Two known mutagens, bleomycin and sodium azide were used to chemically induce reversion mutation as a positive control.

Materials and Methods. *Nerium oleander* callus culture hot water extracts and polysaccharide fractions: Leafs of intact plant and callus tissue obtained by us early was air-dried at 70° and extracted (0.5: 10, w/v) by boiling in 0.9 % NaCl solution or Hanks' balanced solution for 3 hours [7, 10]. The extracts were filtered and used in different concentrations.

For the isolation of polysaccharide fractions dried intact plant leafs and callus tissues of *N. oleander* were crushed and extracted with ethanol 96% in Soxhlet apparatus for removal of low-molecular compounds. Than air-dried reminder was cooked (0.5: 10, w/v) in distilled water for 3 hours. The solution was mixed with ethanol (96%) in a 1:1 ratio and allowed to set for 12 hours at room temperature. The formed gel suspension was centrifuged (5000 rpm) for 10 min. The reminder was taken up in distilled and again mixed with ethanol (96%) in a 1:1 ratio. After allowing the solution to set for at least 12 hours, the gel suspension was centrifuged (5000 rpm) for 10 min. The reminder was taken up in distilled water and dried by evaporation. The dried polysaccharide extract was obtained. Previously the experiments were resolved in 0.9% NaCl solution in different concentrations [1, 10].

Bacterial strains for Salmonella antimutagenicity assays: *Salmonella typhimurium* strain TA1535 original stock cultures were tested for genetic markers, including sensitivity or resistance to UV radiation (uvrB) and sensitivity to crystal violet (deep rough character, rfa). Strains were routinely characterized for spontaneous reversion characteristics and reversion rates in response to sodium azide or bleomycin TA1535.

Bacterial antimutagenicity assay: For testing of bacteritoxicity of hot water extracts and polysaccharide fraction of intact plant and callus tissue of *N. oleander* the test extracts and fractions at concentrations from 0.1 µl/per plate to 1000 µl/per plate and 100 µl (2x10⁹ cell/ml) of the bacterial overnight culture were added into the 2 ml of molten bacterial complete medium, and the mixture was plated on a bacterial complete medium; after incubation at 37°C for 24h, the number of bacterial colonies was scored. Average numbers of colonies and standard errors were calculated.

For testing of mutagenicity of hot water extracts and polysaccharide fraction of intact plant and callus tissue of *N. oleander*, 100 µl bacterial overnight culture, 500 µl of phosphate buffer, and the test extracts and fractions (0.1 µl/per plate to 1000 µl/per plate) were all added directly to 2ml of the histidine/biotin supplemented soft agar for plating. For testing of antimutagenic activity of extracts and fractions of *N.oleander*, 100 µl bacterial overnight culture, a known mutagen (optimal concentration), 500 µl of phosphate buffer, and the test extracts and fractions (0.1 µl/per plate to 1000 µl/per plate) were all added directly to 2ml of the histidine/biotin supplemented soft agar for plating. As a negative control 100 µl of distilled water were used, as a positive control the known mutagens bleomycin (0.5 µg/per plate) and sodium azide (1.5 µg/per plate) were used, which dissolved in 0.9% aqueous NaCl before testing. Initially, the concentrations of these mutagens were tested and optimal concentrations were calculated. When the agar solidified, the plates were inverted and incubated at 37 °C in the dark for 72 h. Numbers of revertant colonies were scored manually. Average numbers of revertant colonies and standard errors were calculated. All experiments were done in duplicate or triplicate. We have accepted an antimutagenicity result as positive if there is a dose–response effect seen, and if the data at a given dose of an antimutagen is significantly lower than seen in experiments without an antimutagen [8].

Results and Discussion. Table 1 illustrates, that hot water extracts and polysaccharide fraction of intact plant and callus tissue of *N. oleander*, aren't toxic for bacterial strains which allows using this test - system for studying of antimutagenic activity of metabolites from intact plant and callus culture of *N.oleander*.

Table 1. Number of colonies *S. typhimurium* TA1535 per plate treated with *N. oleander* intact plant and callus culture hot water extracts and polysaccharide fractions

Tested paterial	Amount µl/per plate					Control
	1000	100	10	1	0.1	
Plant water extract	738.0 ± 16.8	600.0 ± 14.9	802.0 ± 11.1	804.0 ± 18.8	980.0 ± 14.9	800.0± 12.6
Callus water extract	741.0± 16.8	593.0 ± 14.5	905.0 ± 22.3	907.0 ± 15.6	882.0 ± 24.6	
Plant polysaccharide fraction	845.0± 15.5	912.0 ± 24.1	981.2 ± 17.6	798.0 ± 15.7	811.0 ± 16.7	
Callus polysaccharide fraction	831.0± 12.1	935.0 ± 21.3	887.4 ± 16.5	915.0 ± 25.3	873.0 ± 17.1	

Possible mutagenic activity of *N. oleander* callus culture and intact plant was investigated. Results obtained was shown (Tab.2.) that extracts and fractions of intact plant and callus culture of *N. oleander* in dose range from 0.1 µl/per plate to 1000 µl/ per plate in experiments without metabolic activation were not induce increasing in number revertants of *S.typhimurium* TA1535 in comparison to spontaneous (negative controls) and inducible (positive controls) levels of reversions. Results obtained suggest that studied plants extracts and fractions are not characterized with mutagenic properties.

Table 2. Number of revertant colonies *S. typhimurium* TA1535 per plate treated with *N. oleander* intact plant and callus culture hot water extracts and polysaccharide fraction

Amounts of extracts μl /per plate	Number of revertant colonies per plate for each variant of experiments			
	Negative control (Spontaneous levels)		Negative control (Spontaneous levels)	
	14.8 $\pm$ 4.0		66.2 $\pm$ 3.3	
	Positive control (Sodium azide)		Positive control (Bleomycin)	
	985.4 $\pm$ 18.4		1162.4 $\pm$ 22.2	
	Plant water extract	Callus water extract	Plant water extract	Callus water extract
1000	16.3 $\pm$ 6.8	10.3 $\pm$ 2.5	66.3 $\pm$ 15.6	93.3 $\pm$ 8.6
100	15.3 $\pm$ 5.9	11.7 $\pm$ 5.1	64.0 $\pm$ 16.7	86.3 $\pm$ 11.9
10	15.7 $\pm$ 5.1	16.7 $\pm$ 6.7	62.0 $\pm$ 1.7	55.3 $\pm$ 3.1
1	19.7 $\pm$ 3.8	11.7 $\pm$ 2.5	71.7 $\pm$ 17.8	61.0 $\pm$ 4.4
0.1	16.7 $\pm$ 11.2	18.3 $\pm$ 7.4	62.7 $\pm$ 9.3	72.3 $\pm$ 4.0
	Plant poly- saccharide fraction	Callus poly- saccharide fraction	Plant polysac- charide fraction	Callus poly- saccharide fraction
1000	17.1 $\pm$ 5.9	14.1 $\pm$ 3.5	59.3 $\pm$ 13.4	73.3 $\pm$ 5.6
100	14.2 $\pm$ 4.9	13.7 $\pm$ 5.1	47.0 $\pm$ 13.2	79.2 $\pm$ 10.6
10	15.5 $\pm$ 5.2	16.4 $\pm$ 7.7	61.2 $\pm$ 2.5	58.2 $\pm$ 3.1
1	16.2 $\pm$ 3.9	17.1 $\pm$ 3.5	63.7 $\pm$ 13.5	59.0 $\pm$ 3.3
0.1	13.1 $\pm$ 8.2	19.1 $\pm$ 6.4	55.2 $\pm$ 6.3	65.3 $\pm$ 3.0

Table 3 illustrates, that hot water extracts and polysaccharide fraction of *N. oleander* intact plant and callus culture are possesses antimutagenic activity in comparison with positive controls.

Hot water extracts are less active then polysaccharide fractions which suggests that antimutagenic activity caused by components of polysaccharide fraction. Dose-response curves were also shown.

It is known that, bleomycin binds to guanosine–cytosine-rich portions of DNA. In the presence of iron (Fe(II)) and molecular oxygen, this complex can lead to highly reactive free radicals and Fe(III) [3, 11]. The free radical product of bleomycin is able to induce double strand breaks in DNA through oxidation of the deoxyribose sugar backbone, thereby generating chromosomal aberrations [3,11]. Sodium azide is able to generate hydroxyl radicals both extracellularly and intracellularly. The radicals are capable of inducing chromosomal aberrations through oxidative base damage as well as through direct strand breakage in the DNA [2]. As *N. oleander* intact plant and callus tissue polysaccharide fraction components (pectines, D- galacturonic acid etc) are known antioxidants, the possible explanation of their inhibitory effect on the mutagenicity of bleomycin and sodium azide is that they reduce the concentration of mutagenic oxidation products by free radical scavenging [12].

Table 3. Number of revertant colonies of TA1535 per plate in case of studying of antimutagenic activity of *N.oleander* intact plant and callus culture hot water extracts and polysaccharide fractions

Controls and amounts of extracts µ/per plate	Number of revertant colonies per plate for each variant of experiments			
	Negative control (Spontaneous levels)		Negative control (Spontaneous levels)	
	14.8±4.0		16.2±3.3	
	Positive control (Sodium azide)		Positive control (Bleomycin)	
	1150±82.4		1135.4±92.2	
	Sodium azide + plant water extract	Sodium azide+ callus water extract	Bleomycin + plant water extract	Bleomycin + callus water extract
1000	876.1±15.3	966.7±26.7	869.0±21.7	566.0±29.4
100	546.3±23.3	876.3±22.5	482.7±26.4	795.3±24.6
10	671.1±24.1	851.7±25.1	567.4±25.6	782.6 ±23.9
1	945.6±23.5	735.3±27.4	652.0±26.7	647.3±28.5
0.1	993.6±26.2	854.7±22.5	733.9±27.5	756.4±31.2
	Sodium azide+ plant polysaccharide fraction	Sodium azide+ plant polysaccharide fraction	Bleomycin + plant polysaccharide fraction	Bleomycin + callus polysaccharide fraction
1000	233.1±16.9	244.4±13.6	247.0 ± 14.6	253.4±14.8
100	345.5±15.2	356.3±15.5	351.3±12.8	358.6±13.9
10	443.5±24.3	486.1±17.6	389.4±27.3	427.4±23.3
1	496.6±15.9	527.5±22.6	468.6±23.5	489.0±25.0
0.1	576.6± 23.2	586.6±26.6	583.9 ±19.4	595.3±23.0

By using the Ames test in *Salmonella typhimurium* TA 1535 cells the ability of *N. oleander* callus culture to prevent mutagenicity caused by sodium azide and bleomycin was revealed. *N. oleander* callus tissue retains the antimutagenic effect investigated and specific for *N. oleander* intact plant. These results allow to assume that the protection against sodium azide and bleomycin mediated mutagenicity may be one of the mechanisms by which *N. oleander*

intact plant and callus tissue extracts exert their anticarcinogenic activities. So, *N. oleander* callus culture may be used as an alternative source of biological active substances for the mutagenesis and carcinogenesis prevention. Polysaccharides can be mixed with various pharmaceutically acceptable carriers to form injectables, capsules, tablets and various other administrative forms [10].

REFERENCES

1. *Carbik, I., Baser, K.C., Ozel, H.Z., Engum, B., Wagner, H. J. Planta Medica*, 56, p. 668 – 673, 1990.
2. *Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M. Mut. Res.*, 375, p.183–193, 1997.
3. *Dorr, R.T. Bleomycin pharmacology: mechanism of action and resistance, and clinical pharmacokinetics, Sem. Oncol.*, 19, p. 3–8, 1992.
4. *Ferguson, L.R. Mut. Res.*, 307, p. 395–410, 1994>
5. *Hovhannisyan N. Proceedings of 2006 Society for In Vitro Biology meeting*, p. 35-A., 2006.
6. *Hovhannisyan N. In vitro Chemoprotective Effect of Isolated Culture of Nerium Oleander. Proceedings of 2007 In Vitro Biology Meeting*, p. 2011, 2007.
7. *Hovhannisyan N.A., Mkrtumyan M.K., Gasparyan G.G. J. of Biotechnology*, 5, 07, p. 66-71, 2007.
8. *Hosoda, M., Hashiotomo, H., Morita, H., Chiba, M. J. Dairy Sci.*, 75, p. 976-981, 1992.
9. *Maron D., Ames, B. Mutation Res.* 113, p. 173-215, 1983.
10. *Ozel, H.Z. US Patent*, N 5135745, 2000.
11. *Povirk, L.F., Austin, M.F. Mut.Res.*, 257, p.127–143, 1991.
12. *Weisburger, J. H.; Reddy, B. S.; Rose, D. P.; Cohen, L. A.;Kendall, M. E.; Wynder, E. L. Basic Life Sci.* 61, p. 45-63, 1993.

Received 04.06.2008



Biolog. Journal of Armenia, 1-2 (60), 2008

UDC 576.851.13

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF FLUORESCENT PSEUDOMONADES' SPECIES OF PADDY FIELDS IN THE NORTH OF IRAN

M.R. RAMEZANPOUR¹, Y. POPOV¹, K. KHAVAZI²

¹Yerevan State University, ²Soil and Water Research Institute of Iran, Tehran

A collection of fluorescent pseudomonades isolated from rice rhizosphere was created. Bacteria were selected from farmer's fields in three provinces at north of Iran during the 2006 summer. By their morphological properties and the ability to fluorescent under UV light 111 cultures were identified as fluorescent species of pseudomonades. The isolates were characterized by biochemical and physiological traits too. Presence of oxidase, catalase, citrate and arginine hydrolyses and ability to ferment glucose were peculiar to all tested species; besides *Pseudomonas fluorescent* used trehalose and mesoinositol, *Pseudomonas putida* did not liquefy gelatine, and only *Pseudomonas aeruginosa* could grow at 41°. Frequency of occurrence of *P. fluorescent*, *P. putida* and *P. aeruginosa* among tested fluorescent species was equal to 44.2%, 33.3% and 22.5% correspondingly.

Ստեղծվել է բրնձի ռիզոսֆերայից անջատված ֆլուորեսցենտ պսևդոմոնադների հավաքածո: Բակտերիաները անջատվել են հյուսիսային Իրանի երեք մարզերի ֆերմերային դաշտերից 2006 թ-ի ընթացքում: Այս բակտերիաների 111 կուլտուրաները մորֆոլոգիական առանձնահատկությունների և ուլտրամանիշակազույն ճառագայթների տակ ֆլուորեսցենցիայի ունակության հիման վրա նույնականացվել են որպես պսևդոմոնադների ֆլուորեսցենտ տեսակներ: Մեկուսացված բակտերիաները բնութագրվել են նաև իրենց կենսաքիմիական և ֆիզիոլոգիական հատկություններով: Օքսիդազների, կատալազների, ցիտրատի և արգինինի հիդրոլազների առկայությունը, ինչպես նաև գլյուկոզ խմորելու ունակությունը բնորոշ է բոլոր տեսակներին, այն դեպքում, երբ տրեզալոզ և մեզոինոզիտ յուրացնելու ունակությունը՝ *Pseudomonas fluorescent* տեսակին: Ժելատինը քայքայելու հատկությամբ օժտված է *Pseudomonas putida* տեսակը, իսկ 41° ջերմաստիճանային պայմաններում աճելու ունակությամբ օժտված է *Pseudomonas aeruginosa* տեսակը: Ուսումնասիրված ֆլուորեսցենտ բակտերիաներից *P. fluorescent*, *P. putida* և *P. aeruginosa* տեսակների հանդիպման հաճախականությունը համապատասխանաբար կազմել է 44.2%, 33.3%, 22.5%:

Создана коллекция флуоресцирующих псевдомонад, изолированных из ризосферы риса. Бактерии отобраны с фермерских полей трех провинций северного Ирана в течение 2006 года. 111 культур этих бактерий по морфологическим признакам и способности флуоресцировать в ультрафиолетовых лучах предварительно идентифицированы как флуоресцирующие виды псевдомонад.

Изоляты характеризовались и по своим биохимическим и физиологическим признакам. Наличие оксидазы, каталазы, гидролаз цитрата и аргинина и сбраживание глюкозы было свойственно всем видам, тогда как способность усваивать трегалозу и мезоинозитол характерна для *Pseudomonas fluorescens*, отсутствие способности разжижать желатину - для *Pseudomonas putida*, а рост при 41⁰ - для *Pseudomonas aeruginosa*. Частота встречаемости *P. fluorescens*, *P. putida* и *P. aeruginosa* составляла соответственно 44.2%, 33.3%, 22.5% от изученных флуоресцирующих видов.

Identification of bacteria – rice rhizosphere – fluorescent pseudomonades

Saprophytic fluorescent pseudomonades include various species such as *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* [4, 10, and 22]. All bacteria belonging to this group share the ability to produce soluble yellow-green pigments – pyoverdines, which act as siderophores for these bacteria [3, 14]. These microorganisms are considered to be rhizobacteria, since their density, propagation and activity are stimulated in the rhizosphere [1]. They are known also by the ability to synthesize a variety of other secondary metabolites [5, 6], which intensify the plant growth. Plant growth promotion can also be ascribed to other metabolites affecting the plant physiology such as formation of growth substances [18]. Consequently, some fluorescent pseudomonads can improve plant health and/or growth [2, 24]. Indeed, fluorescent pseudomonads are considered as potential biocontrol agents of soilborne diseases. Several studies have demonstrated their efficacy as microbial inoculants [1, 8, 20]. Most pseudomonads are free-living organisms in soil and water; they play an important role in decomposition, biodegradation, and the C and N circulations. The phrase “naturally-occurring organic compound cannot be degraded by some microorganisms” must have been coined to apply to members of the genus *Pseudomonas*, known for their ability to degrade hundreds of xenobiotic. However, they are usually unable to degrade some biopolymers in their environment, such as cellulose and lignin, and their role in anaerobic decomposition is minimal.

Considering the high diversity of fluorescent pseudomonades the different characteristics, which were recorded for various strains, are not surprising [15].

The identification of the members of the genus *Pseudomonas* is based on morphological, physiological, biological and genetic characteristics [13, 22, 25]. Determination of predominate fluorescent pseudomonads strains is important owing to their positive effects on plants [1, 5]. So we carry out these experiments to identify local strains in different rice fields in north Iran for the subsequent treatment of plantlets by the selected bacterial species before planting.

Material and methods: Fifty rice fields of different locations in north Iran including three provinces (Mazandaran, Gilan and Golestan) were selected for collection of rice rhizosphere samples. From the field of each site three hills of rice were randomly selected during summer seasons of 2006. Each sample including 1 kg rhizosphere soil (root + adhering soil) was transferred to the laboratory in an ice-box and stored at 4⁰C.

The isolation of cultures was done by method of Koch on the Cetramid agar [17]. The plates were incubated at 28°C for 48 hours. Colonies, which fluoresced under UV light (260nm), were selected and purified later on the King's B-agar medium [25].

The following general methods of morphological, physiological and biochemical tests were used for identifying *Pseudomonas species* [4, 10, 19, 22]: staining by Gram, determination of catalase and oxidase activities, gelatin liquefaction, growth at 41° [7, 23], arginine hydrolysis, utilizing citrate as a sole carbon and energy source, acid formation in carbohydrate (trehalose, mesoinositol and glucose) broths [7, 19, 21].

Results and Discussion: A microscopic study of bacteria showed that all isolates were gram negative. The bacteria isolates, tested under UV light, displayed fluorescence and had yellow, green, yellow-green, blue, brown, orange and white colors (Table 1).

Table 1. Percentages of isolates with different colors.

Provinces	Different colors displayed by isolates under UV light						
	Orange	White	Brown	Yellow & green	Green	Yellow	Blue
Mazandaran	3.9	13.8	17.6	3.9	19.6	19.6	21.6
Gillan	0	2.7	5.4	5.4	13.5	35.2	37.8
Golestan	0	8.7	17.4	0	26.1	21.7	26.1
Total	1.8	9.1	13.5	3.6	18.9	25.2	27.9

The majority of isolates had blue color. Then the color of colonies distributed in the following way: yellow > green > brown > white > yellow-green and, at the last position, orange color. Earlier for the characterization of the genus *Pseudomonas* the pigmentation was used as a generic trait, but this is not of great validity now. In fact the colonies and other cell masses always display some color due to the presence of normal cellular component. Thus, *P. stutzeri* is grouped with the non-pigmented species though the colonies of its many strains are dark brown due to the high concentration of cytochrome *c* in the cell (13). As for the chemical nature of pigments, blue color produced by some isolates, is due to the phenazine - blue pigment pyocyanine identified for *P. aeruginosa* [11]. Other phenazine pigments synthesized by fluorescent pseudomonades are green. Important pigments from the physiological and taxonomic standpoints are pyoverdines. They are typical yellow-green pigments of some fluorescent pseudomonades [13].

The isolates were characterized by biochemical and physiological traits too. Presence of oxidase, catalase, citrate and arginine hydrolyses and ability to ferment glucose was peculiar to all tested species (Table 2).

Table 2. Results of biochemical and physiological tests (%).

Tests	Reaction	
	Positive	Negative
Catalase formation	100	0
Oxidise formation	100	0
Arginine hydrolysis	100	0
Citrate utilization	100	0
Gelatin liquefaction	33.3	66.7
Growth at 41 ⁰ C	22.5	27.5
Glucose utilization	100	0
Trehalose utilization	44.2	55.8
Mesoinositol utilization	44.2	55.8

As for the ability to liquefy gelatin, some of the tested isolates were negative: according to the different classification systems such isolates belong to the species *P. putida* [4, 10]. Some isolates could grow at 41⁰C. According to the different classification systems the ability to grow at this temperature is peculiar to *P. aeruginosa* [13]. Though all isolates were able to use glucose as single source of carbon and energy, some of them could use trehalose and mesoinositol too. Such species were identified as *P. fluorescens* (9, 12, 17, 19).

So based on the obtained results we can conclude that there were three predominant fluorescent pseudomonade species: some isolates were identified as *P. fluorescens* (they could utilize trehalose and mesoinositol) - 44.2 %; some species as *P. putida* (they could not liquefy gelatin) - 33.3 %; and other species as *P. aeruginosa* (able to grow at 41⁰C) - 22.5 %.

Fluorescent pseudomonades were distributed in various provinces irregular. So in Mazandaran province fluorescent pseudomonades species were distributed respectively *P. putida* > *P. aeruginosa* > *P. fluorescens*; in Gillan province - *P. fluorescens* > *P. putida* > *P. aeruginosa*; the same order was established for Golestan province. But as it can be seen from Table 3, the percentage of species was specific for each province. In this table and at the Figure 1 the total number of tested species for three provinces was shown too.

Table 3. Total quantity (%) of tested species in three provinces

Provinces (number of samples)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>
Mazandaran (51)	33.3	37.3	29.4
Golestan (23)	17.3	26.1	56.5
Gillan (37)	10.8	32.4	56.8
Total (111)	22.5	33.3	44.2

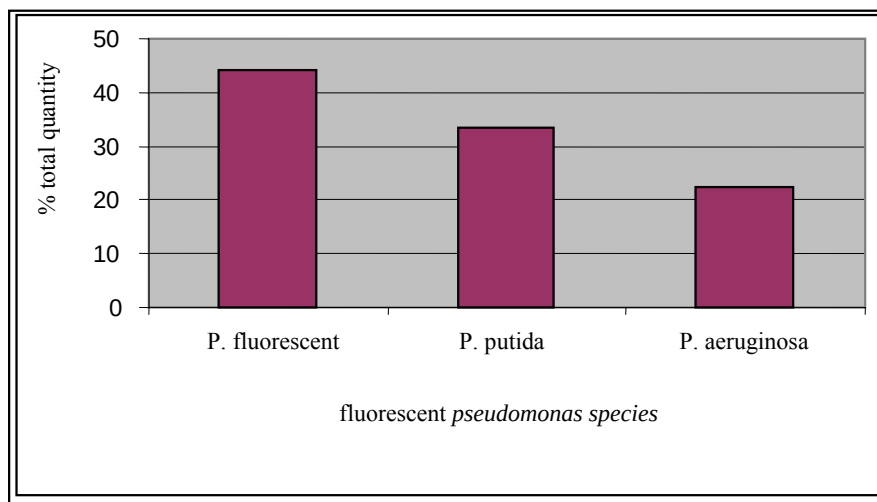


Fig. 1. Percentage of isolated bacterial samples from rice rhizosphere

The predominance in rice rhizosphere *P. fluorescens*, in comparison with others species, can be explained by its high competition ability and effective colonization. Some researchers reported the similar results. For example, Vlassak et al. (23) reported that dominating pseudomonad species of rice and banana rhizosphere in Sri-Lanka was *P. fluorescens*. On the other hand, Gardner et al. (7) - for citrus, Rasouli (17), Mozafar et al (16) - for many plants, particularly for wheat, reported that dominating fluorescent species was *P. putida*. Based on this research one can conclude:

1. For rapid identification of some fluorescent pseudomonades (*P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa*) it is sufficient to restrict oneself by the above mentioned tests. Final identification of these strains is possible only by using molecular analysis.

2. Number and distribution of fluorescent pseudomonad species varied at different places and identification of dominating species is important by other researchers and in the other geographical regions, where endemic bacteria with specific genotypes can be detected.

REFERENCES

1. Bashan Y., and Holgin G. Soil Biol. Biochem., 30,1225-1228, 1998.
2. Benizri E., Baudoin E., and Guckert A. Biocontrol Science and Technology, 11, 557-574, 2001.
3. Boopathi, E., and K. S. Rao. Biochimica and Biophysica Acta., 1435, 30-40, 1999.
4. Bossis E., Lemanceau P., Latour X., Gardan L. Agronomie, 20, 51-63, 2000.
5. Budzikiewicz H. FEMS Microbiol. Rev. 104, 209-228, 1993.
6. Dowling D.N., O'Gara F. Trends Biotechnol. 12, 133-140, 1994.

7. Gardner J. M., Chandler J. L., Feldman A. W. *Plant and Soil*, 77, 103-113, 1984.
8. Haas D., Keel C., Laville L., Maurhofer M., Oberhänsli T., Schnider U., Voisard C., Wuthrich B., Défago G. In *advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*/ 450 – 456, 1991.
9. Hassan Zadeh. N. *Principles and methods of plant bacteriology*. Tehran, 1997.
10. Hendricks D.P., Sneath H.A., and Holf J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 2nd Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 2001.
11. Hofte M., Seong K.Y., Jurkevitch E., and Verstrate W. *Plant and soil*. 130, 249-257, 1991.
12. Holding, A.J. and Colee, J.G. Routine biochemical tests, in *methods in microbiology*, 6A , 1-32, 1971.
13. Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. *Bergey's manual of Determinative Bacteriology*, 9thed, Williams & Wilkins, Baltimore, 787, 1994.
14. Meyer J.M., Abdallah M.A. J. *Gen. Microbiol.* 107, 319–328, 1978.
15. Meyer J.M., Geoffroy V.A., Baida N., Gardan L., Izard D., Lemanceau P., Achouak W., Palleroni N.J. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 ,2745–2753, 2002.
16. Mozafar, A., F. Duss, and J. J. Oertli. *Plant and Soil.* 144,167- 176, 1992.
17. Rasouli Sadagiani, M.H. Ph. D. Thesis. Tarbiat modarres University. 152, 2005.
18. Rumesk Kumar.N., V.Thirumalai. A. and P. Gunasekaren. *Current Science*, 82 , 12, 1463 – 1466, 2002.
19. Schaad N.W. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd Ed. APS Press. 2001.
20. Schippers B., Scheffer R.J., Lugtenberg B.J.J., Weisbeek P.J. *Outlook Agric.* 24 ,179–185, 1995.
21. Thornley, M. J. *Applied Bacteriology.* 13, 37-52, 1960.
22. Todar, K. *Todar's online Texbook of Bacteriology.* www.textbook.net 2004.
23. Vlassak K., Holm L.V., Duchateau L., Vanderleyden J., and De Mot R. *Plant and Soil* , 145, 51-63, 1992.
24. Weller D.M. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26, 379–407, 1988.
25. Xavier L., Delorme S, P. Mirleau and Lemanceau. *Agronomie*, 23, 397–405, 2003

Received 10.06.2008



Biolog. Journal of Armenia, 1-2 (60), 2008

UDC 576.8.66.4

THE PROGRESS OF MICROEVOLUTION IN HYBRIDS OF ROCK LIZARDS OF GENUS *DAREVSKIA*

F. DANIELYAN¹, M. ARAKELYAN¹, I. STEPANYAN²

¹Department of Biology, Yerevan State University, E-mail: lacerta@ysu.am,
arakelyanmarine@yahoo.com

²Institute of Zoology of National Academy of Science of Armenia, E-mail: ilona_e_68@mail.ru

Along with sterile triploid females, the male hybrids, intersexual individuals, female hybrids with developing follicles and eggs as well as tetraploid male hybrid are found in the mixed population of three species of rock lizards' genus *Darevskia* in mountain steppe zone of central Armenia.

Intensive microevolution takes place in this sympatric population. The evolutionary potential for hybridogenic speciation by Caucasian rock lizards is discussed.

Հայաստանի կենտրոնական մասի լեռնատափաստանային գոտում, *Darevskia* ցեղին պատկանող երկսեռ և կուսածին ժայռային մողեսների երեք տեսակների խառը պոպուլյացիաներում, ստերիլ տրիպլոիդ էգերի հետ հայտնաբերվել են տրիպլոիդ հիբրիդային էգեր՝ զարգացող օոցիտներով և ձվերով, հիբրիդային արու և ինտերսեքսուալ առանձնյակներ, ինչպես նաև տետրապլոիդ արու առանձնյակ:

Այդ պոպուլյացիայում ընթանում է միկրոէվոլյուցիոն գործընթաց: Քննարկվում է Կովկասյան ժայռային մողեսների հիբրիդոգեն տեսակառաջացման էվոլյուցիոն պոտենցիալը:

В горно-степной зоне центральной Армении, в смешанной популяции трех видов двуполой и партеногенетических скальных ящериц рода *Darevskia*, наряду со стерильными триплоидными гибридными самками, обнаружены триплоидные гибридные самки с развивающимися фолликулами и яйцами, гибридные самцы, интерсексуальные особи, а также тетраплоидный гибридный самец.

В данной смешанной популяции протекает интенсивный микроэволюционный процесс. Обсуждается эволюционный потенциал гибридного видообразования у Кавказских скальных ящериц.

A universal theory of reticulate speciation explains the hybrid origin of diploid and triploid parthenogenetic forms (Darevsky, Borkin, 1985). The appearance of diploid parthenogenetic forms as a result of natural interspecies hybridization between closely related bisexual species is the first stage of

reticulate speciation. Morphological, ecological, cytological, and genetic studies have shown that parthenogenetic species of genus *Darevskia* Arribas, 1997, are of hybrid origin (Darevsky and Danielyan, 1979; Uzell and Darevsky, 1975; Moritz et al., 1992; Grechko et al., 1993; Fu et al., 2000; Murphy et al., 2000; etc). The second stage of the scheme is the emergence of allotriploid forms as a result of hybridization of maternal diploid parthenogenetical and paternal bisexual species. On the third stage of speciation, fertile triploid females mate with males of bisexual species and give origin to a new tetraploid species (Schultz, 1969; Borkin and Darevsky, 1980).

The distributions of four parthenogeneic and four bisexual species of Caucasian rock lizard from genus *Darevskia* in Armenia often overlap and the process of natural hybridization between parthenogenetic lizards and males of the bisexual species annually occurs in the sympatric zones (Darevsky, 1967; Darevsky and Danielyan, 1968; Darevsky et al., 1985; Darevsky, 1995; Darevsky and Danielyan 2001; Danielyan, 2003 etc). Such zones of hybridization exist in mountainous regions of the central Armenia at elevations from 1800m to 2000m above sea level. Opportunities for hybridization appear in river canyons along which bisexual species penetrate the mountains and enter the ranges of parthenogenetic forms (Darevsky et al., 1985). Generally, in contact zones, the hybrids comprise 5-12% of the mixed populations (Darevsky et al., 1973; unpublished data of Danielyan).

The mixed populations of rock lizards have been a subject of multidisciplinary studies since the time of its discovery. The evolutionary potentials of the speciation by hybridization in the group of Caucasian rock lizards are summarized in this paper based on morphological, ecological, cytological, and histological studies for the last 10 years of the hybrid lizards of genus *Darevskia* in a unique hybridization zone in vicinity of Kuchak village (central Armenia) where diploid (2n), triploid (3n) and even tetraploid (4n) individuals are found.

Materials and Methods. The mixed population of rock lizards of the genus *Darevskia* is located in central region of Armenia on the northeastern slope of Aragats Mountain near Kuchak village. The material used in this study, which has been conducted between 1994 and 2006, is described in Table 1. All specimens were captured within an area a few hectares and appear to belong to a single sampling site. Lizards which belong to parthenogenetic *D. unisexualis*, *D. armeniaca* and bisexual *D. valentini* species and their hybrids of *D. valentini* x *D. unisexualis* and *D. valentini* x *D. armeniaca* were captured with a noose and were palpated to assess their reproductive conditions. Hybrids were identified according to special features of their color pattern and certain characteristics of scutellation. The specimens that used for comparative studies were sampled simultaneously. Chloroform gas was used for euthanasia of a few lizards for cytological, histological and skeleton-chronological studies. The animals which were used for morphological and cytometrical studies, were measured, the blood was taken from clipped tail for smears and then released.

Chromosome smears were prepared from the bone marrow, spleen, intestine and testis tissues of lizards (n=11) according to the method described by Macgregor and Varley (1986). The colchicines solution (0,1%) was used intraperitoneally. The cells were treated by hypotonic KCl solution (0.56%), fixed in an ice-cold acetic acid – methanol solution (1:3). The chromosomes were stained in 5% Giemsa in the phosphate buffer at pH 6.8. The chromosome complements were detected by observation of 50 metaphase plates for each individual.

The histology of gonads of adult hybrids (n=6) and parental species (n=6) were studied on the paraffin slides following to classical microtechnical method (Romeis, 1958).

Statistical analysis of data was performed by Statistica 6.0 Software package.

Results and Discussion. Highly interesting zone of hybridization has been discovered in 1994 in the vicinity of Kuchak village (Aragatsotn Marz) on the eastern slopes of Aragats Mountain in central Armenia, where parthenogenetic species *D. armeniaca*, *D. unisexualis* and bisexual species *D. valentini* occur together (Danielyan et al., 1999). Currently, the Kuchak population is a unique hybridization zone of rock lizard species that includes diploid ($2n$), triploid ($3n$) and tetraploid ($4n$) individuals.

The studied hybridization zone is located approximately 5 km south of the Aparan town (Aragatsotn Marz) and 0.5 km north of Kuchak village ($40^{\circ} 31' N$, $44^{\circ} 23' E$; 1920m a.s.l.), directly next to the main republic road. The habitat of hybridization site is mountains steppe with gentle slopes of volcanic origins, covered by grass and bushes. Rock lizards typically inhabit stony heaps of volcanic origin, conglomerations of rocks, and large fragments of lava which are quite common in the mountain steppe zone.

Approximately 60% of mixed population is represented by *D. unisexualis* about 10% is comprised of *D. armeniaca* and 30% - *D. valentini* (Chi-square = 3.0, 2 df, $P=0.22$). The habitats of the sympatric species are slightly different from each other. Newly arisen hybrid lineages may have ecological requirements intermediate between those of their bisexual parents, restricting them to “hybrid” habitats (Moritz et al, 1992). Parthenogenetic lizards *D. unisexualis* prefer to live on bedrocks and large fragments of lava, whereas the bisexual *D. valentini* occupies stony heaps with shrubs and grassy vegetation. *D. armeniaca* in this zone is mainly confined to artificial constructions and wastelands along the road. The habitats of parthenogenetic *Darevskia* differ slightly from those of closely related bisexual forms. However, they tend to inhabit sites with colder, dryer, or more variable climates than their bisexual relatives (Darevsky et al, 1985).

The studied sympatric zone between parthenogenetic and bisexual species is very narrow and does not exceed 500 m². *D. valentini* is adapted to high mountains and can be met on the southern slopes of Mt. Aragats, in mountain steppes and alpine zone at altitudes ranging from 1900 to 2700m. *D. armeniaca* and *D. unisexualis* occur on northern slopes of Mt. Aragats at elevation 1700 – 2000m a.s.l.

The intensive process of hybridization takes place in sympatric zone of Kuchak population (Fig. 1).

<i>D. unisexualis</i> ($2n$)		×	<i>D. valentini</i> ($2n$)		×	<i>D. armeniaca</i> ($2n$)	
parthenogenetic species ↓			bisexual species ↓			parthenogenetic species	
female			male			female	
?	($2n$)	×	<i>D. valentini</i> × <i>D. unisexualis</i>		($3n$)	<i>D. valentini</i> × <i>D. armeniaca</i> ($3n$)	
↓			hybrid			hybrid	
			female, male			female, male	

Fig. 1. Scheme of hybridization of bisexual *D. valentini* and parthenogenetic *D. unisexualis*, *D. armeniaca* species of rock lizards.

The number of hybrids that appear annually in this sympatric zone is extremely high and exceeds 35% of the mixed population. However, the percent of hybrid individuals in other mixed populations is about 7-12% (Darevsky and Danielyan, 2001). Furthermore, there is an evidence that the percent of hybrids in “Kuchak” population is increasing over time. The ratio of hybrids to lizards of parental species was 33% in 1994, 35% in 1997, 41% in 1999, 47% in 2003, and 52% in 2004 (Fig. 2).

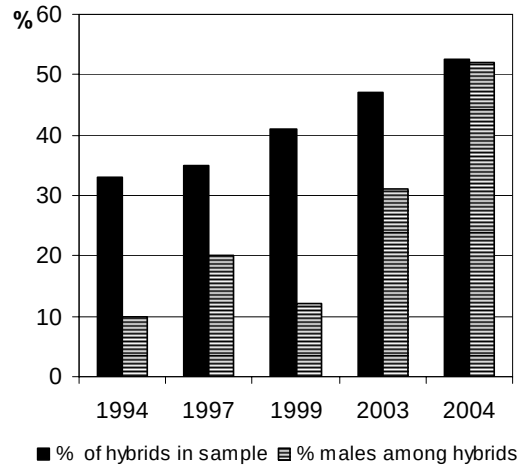


Fig. 2. The proportion of hybrids in samples and occurrence of males among hybrids during 1994 – 2004 years.

Nineteen fertilized parthenogenetic females with male’s jaw marks on their abdomens were collected in 1997 and their eggs were incubated in the laboratory (unpublished data of Danielyan). Out of 22 new hatchlings 8 were triploid hybrids that constitute 36.3% of total progeny. The success of hybridization in this population should be attributed to the optimal time of maturation of gonads in both parental species.

The ratio of hybrid individuals *D. valentini* x *D. unisexualis* to *D. valentini* x *D. armeniaca* in the studied mixed population is approximately 4:1 (Chi-square=2.0, 1 df, P=0.16). In an experiment conducted by Darevsky and Danielyan (1968) many hybrids were obtained from an artificial hybrid zone created by introducing males of *D. valentini* into isolated population of *D. unisexualis* and *D. armeniaca*. Judging from the size of the marks left by jaws of males on the bellies of females during copulation, the larger males *D. valentini* mated more frequently with females of *D. unisexualis*, which are relatively larger and have brightly colored bell similar to that of *D. valentini* females.

Usually *D. valentini* shares common range more often with *D. armeniaca* (6 known sites) than with *D. unisexualis* (two sites, including Kuchak population). The higher success of hybrids forming in “Kuchak” population may also explain the high percentage of *D. unisexualis* which is more frequently mating with *D. valentini*, than *D. armeniaca*.

Hybrids resulting from mating of parthenogenetic females *D. armeniaca*, *D. unisexualis* with males *D. valentini* of bisexual species of rock lizards are often sterile triploid females. Their sterility is caused by gross anomalies in structure and development of gonad (Fig. 4-1). The ovary of hybrids differs from cluster ovary of parental species. They are usually smaller in size and lack oocytes. On our histological samples of triploid hybrid females the main part of stroma of the ovary is weakly delineated and the cortex is poorly developed. Some of them have one or two empty false follicles up to 1 mm in diameter (Fig 5-8). The size of hybrid follicles is not increasing during breeding season, because vitellogenesis is not activated. The oviducts have rudimentary structure and are represented by two straight tubs with germinal funnel.

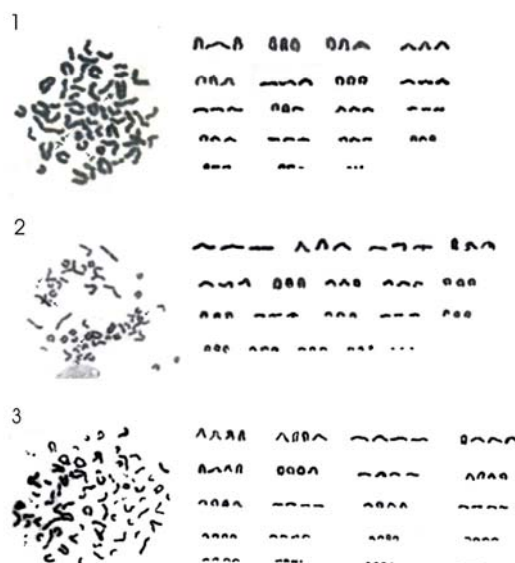


Fig. 3. Somatic metaphase and karyotypes (bar equals 10mkm) of hybrids *D.valentini* x *D.unisexualis*: 1 - triploid female; 2 - triploid male; 3 - tetraploid male

The study of karyology of hybrids has shown that the majority of mitotic metaphase plates of triploid female hybrids consist of 57 chromosomes (Fig 3-1) when diploid set of chromosomes of parental species is made of 38 chromosomes ($NF=38$). The karyotype of hybrid sterile females include 53 acrocentric macrochromosomes and 4 microchromosomes ($3n=57$, $NF=57$). According to data in literature, they have sex chromosomes of wZZ type (Kupriyanova, 1999).

In spite of the hypothesis that in the group of rock lizards hybrid females are usually sterile (Darevsky et al, 1985; Kupriyanova, 1999), we have collected the evidence of rare occurrence of presumable fertile females among *D. valentini* x *D. armeniaca* and *D. valentini* x *D. unisexualis* hybrids in the mixed population near the village Kuchak. The first hybrid female with two eggs in oviducts was discovered in 1999. Then, rare hybrid females with developing oocytes (Fig. 4-2), eggs and corpora lutea were collected in 2000, 2001 and 2006.

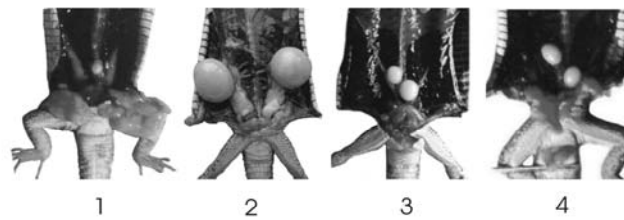


Fig. 4. Reproductive system of hybrids *D.valentini* x *D.unisexualis*:
 1 - triploid sterile female; 2 - triploid probably fertile female;
 3 - triploid probably fertile male; 4 - tetraploid probably fertile male

The comparative histological analysis of developing oocytes of “fertile” hybrids and their parents have shown their resemblance. The nuclei of hybrids and parental females are similar in size and structure (Fig. 5-3 and 5-4). The ovarian follicle cell layer of hybrid female was complete and well structured (Fig. 5-2). However, the surface area of tunica granulosa of hybrid was comparatively thinner than that of parthenogenetic females on the similar stage of ovary development (young oocytes were 1.5 mm in diameter). As a result, the number of pyriform cells in tunica granulosa of presumably fertile hybrids was less than of parthenogenetic rock lizards. The larger oocytes (4–6 mm) of presumable fertile hybrids were vitellogenetic where the yolk deposition was in progress like in normal oocytes (Arakelyan, 2001, Arakelyan, Danielyan, 2003). The oviducts were well-developed and structured.

So, the hypothesis of complete sterility of hybrid females becomes questionable. However, only progeny obtained from female hybrids of Caucasian rock lizards will provide solid evidence for the statement that hybrid females can produce viable and fertile eggs.

The natural hybridization between parthenogenetic and bisexual species can also produce triploid male hybrids (Darevsky et al., 1973, 1978, 1986). In Kuchak population the occurrence of male hybrids is quite high. Moreover, the proportion of males was increasing during period of study (Fig. 2).

Our examination has shown that the majority of hybrid individuals appeared to be typical bisexual males in all details. Most of them had two fully-developed testes (Fig 4-3). Their hemipenes were more or less of the same shape and size as those of bisexual males. Some lizards had two testes: one is well-developed, whereas the other is abnormal.

Different degrees of fertility were observed on histological preparations of male hybrids. All stages of spermatogenesis and mature spermatozoa of hybrid males with well-developed testes were detected. Thus, some of triploid males were probably reproductive and capable of producing sperm that looked normal.

In the studied samples four hybrid individuals of *D. valentini* x *D. unisexualis* with intersexual characteristics were detected. They had “female” oviducts, “male” hemipenes and “ovotestis” gonads. Our histological study of gonads shows that intersexual type of hybrids has ovotestis, because they include both “female” and “male” parts of gonads.

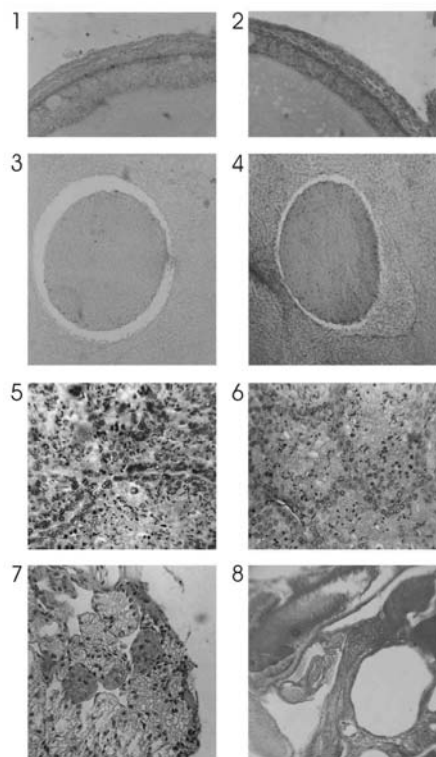


Fig. 5. Histological picture of gonads; 1 - ovarian layers of follicle cell of *D. unisexualis*, 2 – same for presumably fertile hybrid *D.valentini* x *D. unisexualis*, 3 – nucleus of oocyte of *D. unisexualis*. 4 – same for presumably fertile hybrid *D.valentini* x *D. unisexualis*, 5 - testis of *D. valentini*, 6 – same for hybrid *D.valentini* x *D.unisexualis*, 7 – ovotestis of intersexual hybrid *D.valentini* x *D.unisexualis*, 8 – ovary of sterile hybrid *D.valentini* x *D.unisexualis*.

The main part of the cortical tissue is thinner tunica albuginea, similar to that of male of bisexual lizards, but 1/5 of the cortical layer looked like a thick tunica vasculosa which is similar to females (Fig. 5-7). The medullar tissue is more developed in male gonads, but again 1/5 fraction of ovotestis includes segments of ovary, which is wedged into the testis tissue. In the tissue of testis poorly developed seminiferous tubules were visible. Only few spermatogonia were present in seminiferous tubules.

Table 1. Material: number of hybrids and specimens of parental species of rock lizards of genus *Darevskia* in samples.

Collecting date	<i>D.valentini</i> x <i>D.unisexualis</i>	<i>D.valentini</i> x <i>D.armeniaca</i>	<i>D.valentini</i> ♂♀	<i>D.unisexualis</i> ♀♀	<i>D.armeniaca</i> ♀♀
06.07.1994	8	2	9	11	0
21.05.1997	14	5	6	25	4
21.04.1999	12	6	8	15	2
18.07.1999	12	4	2	12	10
08.06.2003	14	2	4	8	6
28.04.2004	17	4	8	6	5
28.05.2006	7	2	3	5	2
TOTAL	84	25	40	82	29

Mitotic metaphases and meiotic metaphases I and II of one male (Fig. 4-2) and two “intersex” hybrids were studied (Table 1). This hybrid had karyotypes ($3n=57$, $NF=57$) with 53 acrocentric chromosomes and 4 microchromosomes. The intersex individuals included sex chromosomes like hybrid females (18th triplet has sex chromosomes of wZZ type). The number of cells in diakinet stages and metaphase I meiosis of studied triploids was low. Numbers of diakinet bivalents vary from 19 to 33. In the testis preparations of triploid male and intersexes single spermatides (1-2%) were observed. The formation of mature spermatozooids was not detected.

A unique finding was made in spring of 2004 in Kuchak population when a tetraploid hybrid male was caught and examined for the first time in the group of rock lizards. This lizard was similar to triploid males in coloration, pattern of dorsal picture and pholidosis. However, karyological analysis has shown tetraploid set of chromosomes of this lizard. The karyotype of this hybrid was represented by 71 acrocentric chromosomes and 5 microchromosomes ($4n=76$, $NF=76$). So, this was a tetraploid male with $wZZZ$ type sex chromosomes (Fig. 3-3).

This hybrid has two fully developed testes (2.4×3.2 mm), well organized hemipeneses and marked femoral pores (Fig. 4-4). The Giemsa-stained smears of testes have shown diakinet stages of meiosis and middle, late spermatides (60%). Compared with triploid hybrids, tetraploid male had numerous spermatids and spermatozoa.

The origin of this tetraploid male is unclear. The most possible pattern is a crossing between hybrid triploid female with a male of *D. valentini*. In this case the tetraploid hybrid with $wZZZ$ sex chromosomes can arise from mating of triploid females with wZZ sex chromosomes with a male of *D. valentini* with Z sex chromosome. Other possible scenario is mating of a hybrid triploid male with a female of *D. valentini*. The female of *D. valentini* has WZ sex chromosomes. In this case, the egg with Z chromosomes fuses with spermatozoa of triploid hybrid male with wZZ sex chromosomes. In any case, appearance of a tetraploid individual is a conclusive evidence of the fertility of either females or males of triploid hybrids.

Sex chromosomes may play a key role in the formation of unisexual species. *Darevskia* have chromosomal mechanism of sex determination and female is the heterogametic sex (Murphy et al, 2000). The karyological study of teiid lizards of genus *Cnemidophorus* has shown that unlike rock lizards of genus *Darevskia*, their females, are homogametic, whereas the diploid males of *C. tigris* are heterogametic (XY). Probably, the appearance of triploid and tetraploid males of hybrid *C. sonora* $\times$ *C. tigris* (with $XXXY$ sex chromosomes) and females (with $XXXX$ sex chromosomes) takes place easier because the actively induced process of the development of heterogametic sex is more complicated than that of homogametic one (Darevsky and Kupriyanova, 1982). According to histological study of Taylor et al (2001) there is no evidence that female hybrids of *Cnemidophorus tessellatus* $\times$ *C. tigris marmoratus* can produce viable and fertile eggs and hybrid males of teiid lizards are capable of producing sperm that looked normal. Although, for genus *Cnemidophorus*, Lowe et al. (1970) discovered a tetraploid male in a mixed population of triploid parthenogenetic *C. sonora* and diploid *C. tigris*.

Fertility of triploid hybrids is a significant prerequisite in reticulate evolution. The universal theory of reticulate speciation (Borkin and Darevsky, 1985) is based upon the following premises: hybridization, unisexuality and polyploidy. When fertile triploid females can mate with males of bisexual species and give origin to new tetraploid species, the hybrids of rock lizards can move away from evolutionally dead end and give them a chance to reproduce parthenogenetically. As a result of changes in environmental conditions, some generations of hybrid females can give rise to triploid species as was shown for lizards of genus *Cnemidophorus* (Cole, 1975).

As a rule, polyploid individuals with unpaired set of chromosomes often become sterile. According to Kupriyanova (1999) the bisexual reproduction of triploids males *D. valentini* x *D. unisexualis* from Kuchak has been considered to be impossible because of the problem of equal distribution of three chromosome sets in meiosis. On the other hand, appearance of triploid individuals with successful combination of genes is theoretically possible, which can increase their number due to parthenogenetic reproduction. The formation of haploid, diploid and triploid gametes allows speculating future evolutionary pathway of such hybrids. Especially interesting is the case, when triploid nucleus of hybrid fuses with haploid nucleus of female of paternal species, and gives rise to tetraploid form. The result can be second generations of ploid hybrids of both sexes and return to bisexuality on a polyploidy level. Probably this scenario led to the origin of tetraploid lizards of genus *Cnemidophorus* (Moritz et al, 1989).

Based on the above noted evidences of increasing of proportion of hybrids as well as abundance of hybrid males and females with fully developed reproductive system among them, it can be inferred that there is an intensive process of hybridization in Kuchak population. So, in this population suitable conditions can be established for the next stage of the progressive process of speciation by hybridization. Thus, the occurrence of tetraploid male hybrid with fully developed reproductive system is significant precondition for the opportunity of advancing to the following stages of reticulate evolution in *Darevskia* rock lizards.

REFERENCE

1. Arakelyan, M. In: The problem of herpetology. Proceedings of the 1st meeting of the Nikolsky Herpetological Society. pp 21-22. Ananjeva, N.B. Ed., Moscow. [in Russian], 2001.
2. Arakelyan, M., Danielyan, F. In: Study and protection of animals of South Caucasus. pp. 27-28. Gasparyan G. Ed., Yerevan. [in Russian], 2003.
3. Borkin, L.Y., Darevsky, I.S. J. Obsh. Biol. 41: 485-506. [in Russian], 1980.
4. Cole, C.J. In: Intersexuality in the Animal Kingdom. pp. 340-355. Reinboth, R. Ed., Berlin, Springer-Verlag, 1975.
5. Danielyan, F.D. In: Study and protection of animals of South Caucasus. pp. 60-61. Gasparyan, G. Ed., Yerevan. [in Russian], 2003.
6. Danielyan, F., Grigoryan, A., Aslanyan, A., Arakelyan, M., Arzumanyan, G. In: Proceedings of the Scientific Conference, Dedicated to 75th Anniversary of the Department of Zoology of YSU. pp. 39-40. Dzhivanyan K.A. Ed., Yerevan. [in Russian], 1999.

7. *Darevsky, I.S.* Rock lizards of the Caucasus: systematics, ecology and phylogenesis of the polymorphic groups of Caucasian rock lizards of the subgenus *Archeolacerta*. Leningrad. Nauka Press. [in Russian], 1967.
8. *Darevsky, I.S.* J. Obsh. Biol. 56: 310-316. [in Russian], 1995.
9. *Darevsky, I.S., Danielyan, F.D.* J. Herp. 2: 65-69, 1968.
10. *Darevsky, I.S., Danielyan, F.D.* Tr. Zool. Inst. Akad. Nauk SSSR 89: 65-70. [in Russian], 1979.
11. *Darevsky, I.S., Danielyan, F.D.* In: Evolution, Ecology and Biodiversity. Proceedings of the Scientific Conference, dedicated to memory of Vorontsov. pp. 131-134. Krasilov, V.A. Ed. . [in Russian], 2001.
12. *Darevsky, I.S., Danielyan, F.D., Sokolova, T.M., Rozanov, Yu. M.* In: Evolution and Ecology of Unisexual Vertebrates. pp. 228-235. Dawley, R.M., Bogart, J.P. Ed., New York Museum Press, 1989.
13. *Darevsky, I.S., Kulikova, V.N.* Dok. Akad. Nauk SSSR. 158: 202-205 [in Russian], 1964.
14. *Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A.* Vertebr. Hung. 21: 69-75, 1982.
15. *Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A., Bakradze, M.A.* Copeia 2: 201-207, 1978.
16. *Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A., Uzell, T.* In: Biology of the Reptilia 15. pp. 411-526. Gans, C., Billet, F., Ed., New York Wiley, 1985.
17. *Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A., Danielyan, F.D.* In: Studies in herpetology. pp. 207-212. Rocek, Z. Ed., Prague, Charles Univ., 1986.
18. *Darevsky, I.S., Uzell, T.M., Kupriyanova, L.A., Danielyan, F.D.* Bull. Mosc. Soc. Nat. 78: 48-58. [in Russian], 1973.
19. *Fu, J., MacCulloch, R.D., Murphy, R.W., Darevsky, I.S. Tuniyev, B.S.* Genetica 108: 107-112, 2000.
20. *Grechko, V.V., Ryabinin, D.M., Fedorova, L.V., Fedorov, A.N., Darevskii, I.S.* Mol. Biol. 27: 1404-1414, 1993.
21. *Kupriyanova, L.A.* Cytologia 21:1038-1046. [in Russian], 1999.
22. *Lowe, C.H., Wright, J.M., Cole, C.J., Bezy, R.L.* Syst. Zool 19: 128-141, 1970.
23. *Macgregor, H.C., Varley, J.M.* Working with animal chromosomes. Moscow, Mir Press [in Russian], 1986.
24. *Moritz C., Donnellan S., Adams M., Baverstock P.R.* Evolution 43: 994-1003, 1989.
25. *Moritz, C., Uzzell, T., Spolsky, S., Hotz, H., Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A., Danielyan, F.D.* Genetica 87: 53-62, 1992.
26. *Murphy, R.W., Fu J.* Zool. J. Linn. Soc. London 130: 527-549, 2000.
27. *Schultz, R.J.* Amer. Natur. 103: 609-619, 1969.
28. *Taylor, H.L., Cole, C.J., Hardy, L.M., Dessauer, H.C., Townsend, C.R., Walker, J.M., Cordes, J.E.* Assessment of Evolutionary Alternatives. Am. Mus. Nat. Hist. 3345: 1-65, 2001.
29. *Uzell, T., Darevsky, I.S.* Copeia 19: 204-222, 1975.

Received 10.06.2008



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1-2 (60), 2008

ՀՏԴ 612.656+612.766.1

**ՏԱՐԲԵՐԱԿՎԱԾ ՈՒՍՈՒՑՄԱՍԲ ԱՇԱԿԵՐՏՆԵՐԻ
ՀԵՄՈԴԻՆԱՄԻԿԱՅԻ ՑՈՒՑԱՆԻՇՆԵՐԻ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ
ՔՆՆԱԿԱՆ ՍԹՐԵՍԻ և ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՐԵՆ ԱԿՏԻՎ ՀԱՎԵԼՈՒՄԻ
ՍՏԱՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ**

Լ.Է. ՂՈՒԿԱՍՅԱՆ

*Երևանի պետական համալսարան, Տ.Մուշեղյանի անվան մարդու և կենդանիների
ֆիզիոլոգիայի ամբիոն, gh.lilit@mail.ru*

Քննական սթրեսի պայմաններում (քննությունից առաջ և հետո) ուսումնասիրվել են վարժարանի ութերորդ դասարանի աշակերտների որոշ կարդիո-հեմոդինամիկայի ցուցանիշների փոփոխությունները: Բացահայտվել է, որ քննաշրջանը աշակերտների օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական համակարգերի բարձր լարվածության շրջան է հանդիսանում: Քննական լարվածության առա-վելաչափ արտահայտվածությունը դիտվել է կենսաակտիվ հավելում չստացած երեխաների մոտ:

В условиях экзаменационного стресса (до и после экзамена) изучены изменения ряда кардиогемодинамических показателей учеников 8 класса гимназии. Установлено, что в экзаменационный период напряжение физиологических систем организма учащихся повышается. Наибольшая выраженность экзаменационного напряжения выявлена у учеников, не получавших биологически активные добавки.

Changes in some cardiohemo-dynamic parameters of 8th grade pupils of a gymnasium in conditions of examination stress are studied. It was established, that during the examination period strain of physiological systems of pupils' organism rises. The greatest expressiveness of an examination strain was revealed at pupils have not used biologically active additives.

Քննական սթրես – կենսաակտիվ հավելում

Ուսումնական բարեփոխումների արդյունքում վերջին տարիների ընթացքում Հայաստանում բացվել են բազմաթիվ վարժարաններ, քոլեջներ, որտեղ սովորողների ուսումնական ծանրաբեռնվածությունը զգալիորեն մեծ է: Դպրոցական կրթության բնագավառում կատարվող բարեփոխումների հիմքում հաճախ խախտվում են ուսումնական ռեժիմի հիգիենիկ նորմերը, որոնք էլ անդրադառնում են սովորողների առողջական վիճակի վրա: Ուսումնական գործընթացում քննաշրջանն ընթանում է հոգեհուզական լարվածությամբ և կրում վատ արտահայտված սթրեսային բնույթ, որն էլ առաջացնում է օրգանիզմի հոգեֆիզիոլոգիական ցուցանիշների ժամանակավոր փոփոխություններ: Հայտնի է, որ քննական սթրեսի նկատմամբ հարմարում չի մշակվում և օրգանիզմում պատասխան ռեակցիան արտահայտվում է յուրաքանչյուր քննության նկատմամբ [4, 9]:

Քննական շրջանը, ակտիվացնելով օրգանիզմի հարմարողական բոլոր ուժերը, նպաստում է կենտրոնական նյարդային համակարգի, վեգետատիվ և ներգատական համակարգերի լարվածության և միջանկյալ օղակ հանդիսացող հոգեմարմնական հիվանդությունների ծագման համար: Քննաշրջանում լարված մտավոր գործունեությունը և հոգեհուզական լարվածությունն անդրադառնում են նաև աշակերտների աշխատունակության վրա ու նրանցից պահանջում ուշադրության, հիշողության, մտածողության կենտրոնացում՝ բացասական ազդեցություն թողնելով օրգանիզմի գործառական համակարգերի, մտավոր աշխատունակության, առողջական վիճակի վրա [1, 7]: Դեռահասների տարիքային հնարավորություններին չհամապատասխանող ծանրաբեռնվածությունը դառնում է աճող օրգանիզմի կենսաբանական պահանջների իրականացման արգելք [2, 11]: Նմանատիպ դպրոցների VIII-X դասարաններում անցկացված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ աշակերտների օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական համակարգը ուսումնական տարվա ընթացքում ենթարկվում է զգալի լարվածության: Նրանց առողջության վրա առավել բացասական է ազդում տեղեկատվության չափազանց մեծ ծավալի ընկալման և յուրացման համար անհրաժեշտ ժամանակի հարաճուն պակասորդը: Այս գործոնների ամբողջությունը բերում է օրգանիզմի ֆիզիոլոգիական գործառույթների շեղումների, հարմարվողականության խախտման և հիվանդությունների: Ուստի կարևորվում է տարբերակված ուսուցմամբ դպրոցների սովորողների մոտ քննական շրջանում դիտվող գործառական փոփոխությունների բնույթի ուսումնասիրումը, քանի որ դրանք կապված են զգալի հոգեհուզական լարվածության և մտավոր ծանրաբեռնվածության հետ: Գրականության տվյալների համաձայն սթրեսային իրավիճակներում առավել արտահայտված փոփոխություններ դիտվում են նաև հեմոդինամիկայի ցուցանիշների մակարդակում [3, 5]:

Ժամանակակից գիտական գրականության մեջ կան շատ տվյալներ ոչ միայն հիվանդությունների բուժման, այլև առողջության պահպանման և վերականգնման համար կենսաբանորեն ակտիվ նյութերի /այդ թվում դեղամիջոցների/ օգտագործման մասին: Կենսաբանորեն ակտիվ հավելումների (ԿԱՀ) անհրաժեշտությունը աճում է օրեցօր: Ուստի խթանող ու հակասթրեսային ազդեցություն ունեցող նոր բնական միջոցների հայտնաբերումը արդիական է նաև մեր ժամանակներում:

Ներկայացված աշխատանքի խնդիրն է եղել ուսումնասիրել վարժարանային ուսուցման պայմաններում դեռահասների հեմոդինամիկայի ցուցանիշների փոփոխությունները նախա- և հետքննական շրջաններում կենսաակտիվ հավելում ստանալուց առաջ և հետո: Որպես կենսաբանական ակտիվ հավելում (ԿԱՀ) օգտագործվել է Արցախի խոտաբույսերից հավաքված թեյը, որն ունի հակասթրեսային, հանգստացնող ազդեցություն: Թեյի բաղադրության մեջ մտնում է արևքուրիկ, կատվախոտ, պատրինձ, պղպեղադադձ, թրնջախոտ, եղեսպակ, մասրենի: Ֆիզիկական և մտավոր հոգնածության ժամանակ ԿԱՀ-ը ունի լարվածությունը և հարմարվողականությունը բարձրացնող հատկություններ [6]:

Նյութ և մեթոդ: Հետազոտվել են Երևանի օժվանտ վարժարանի ութերորդ դասարանում սովորող երեսուն աշակերտներ: Իրականացվել է աշակերտների առողջական վիճակի ստուգում՝ ընտրվել են հոգեֆիզիոլոգիական շեղումներ չունեցող երեխաներ: Որպես ստուգիչ խումբ հետազոտվել են նույն դպրոցի աշակերտներ, որոնք չեն ստացել կենսաակտիվ հավելում: Փորձնական խմբի երեխաները վեց շաբաթ տևողությամբ ստացել են ԿԱՀ (ամեն օր կեսօրին յուրաքանչյուր երեխային տրվել է մեկ բաժակ 2 գ խոտաբույսերից պատրաստված թեյ): Հետազոտության ցուցանիշների փոփոխությունների դինամիկան ուսումնասիրվել է երեք փուլով՝

1. ուսումնական կիսամյակի համեմատաբար հանգիստ շրջան, որն ընդունվել է որպես էլակետ,
2. քննությունից առաջ,
3. քննություն հանձնելուց անմիջապես հետո:

Ուսումնասիրվել են հետևյալ ցուցանիշները՝ սրտի կծկումների հաճախությունը (ՄԿՀ), արյան սիստոլային զարկերակային ճնշումը (ՍԶՃ), դիաստոլային զարկերակային ճնշումը (ԴԶՃ), անոթազարկային ճնշումը (ԱՃ), միջին դինամիկական ճնշումը (ՄԴՃ), սիստոլային ծավալը (ՍԾ) և արյան թոպեական ծավալ (ԱԴԾ): Արյան ճնշումը չափվել է Կորոտկովի մեթոդով: ՄԿՀ-ն որոշվել է ըստ էլեկտրասրտագրության ցուցանիշների: Սթաբի բանաձևով հաշվարկվել է արյան թոպեական ծավալը: Փորձնական տվյալների վիճակագրական մշակումը կատարվել է ըստ Ստյուդենտի t չափանիշի:

Արդյունքներ և քննարկում: Վարժարանային սաների ընդհանուր վիճակը քննությունից առաջ, ինչպես ցանկացած սթեսային իրավիճակ, ուղեկցվում է հուզական արտահայտված ռեակցիաներով: Նախաքննական շրջանում գրանցվել են սրտանոթային համակարգի գործառական վիճակի զգալի փոփոխություններ, հեմոդինամիկայի բոլոր ցուցանիշների աճ: Ստուգիչ խմբի մոտ գրանցվել է ՄԿՀ-ի հավանական բարձրացում 32,13%-ով ($p<0,001$) (աղ. 1): ՄԿՀ-ի նման աճը վկայում է հուզական լարված վիճակի մասին: Հետազոտվողներից մեծամասնության մոտ նախաքննական շրջանում դիտվել է նաև ԶՃ-ի բաղադրիչների աճ: ՍԶՃ-ն աճել է 22,02%-ով ($p<0,001$), իսկ ԴԶՃ-ն համապատասխանաբար 15,54 %-ով ($p<0,001$): Այս շրջանում ԱՃ-ի մեծությունն ավելացել է 35,71 %-ով ($p<0,001$), իսկ ՄԴՃ-ն 18,96 %-ով ($p<0,001$):

Աղյուսակ 1. Վարժարանում սովորող 8-րդ դասարանի աշակերտների հեմոդինամիկայի ցուցանիշների փոփոխությունները քննաշրջանի ընթացքում

	Ստուգիչ խումբ n=18			Փորձնական խումբ n=18		
	սովորական ու.ս. օր	քննությունից առաջ	քննությունից հետո	սովորական ու.ս. օր	քննությունից առաջ	քննությունից հետո
ՄԿՀ զարկ/րոպե	74,7°1,70	98,7°1,68 $p<0,001$	85,9°2,38 $p<0,001$	74,70°1,87	88,40°2,27 $p<0,001$	80,7°2,82 $p<0,05$
ՍԶՃ մմ ս.ս.	109,0°2,87	133,0°2,0 $p<0,001$	124,0°2,21 $p<0,001$	106,50°2,79	120,50°1,89 $p<0,001$	114,0°2,87 $p<0,05$
ԴԶՃ մմ ս.ս.	74,0°1,45	85,5°2,03 $p<0,001$	80,0°2,71	72,50°1,86	80,0°1,06 $p<0,001$	75,50°1,89
ՊՃ մմ ս.ս.	35,0°2,36	47,5°2,71 $p<0,001$	46,50°3,34 $p<0,01$	34,0°2,45	40,50°2,29 $p<0,05$	38,50°3,66
ՄԴՃ մմ ս.ս.	89,05°1,84	105,93°1,51 $p<0,001$	97,49°1,89 $p<0,001$	87,12°1,97	97,42°0,94 $p<0,001$	92,06°1,52 $p<0,05$
ՍԾ մլ	61,37°1,44	61,91°2,35 $p<0,001$	65,69°3,06	61,64°1,8	61,10°1,63	62,45°2,74
ԱԴԾ լ	4,59°0,18	6,11°0,24 $p<0,001$	5,66°0,34 $p<0,01$	4,61°0,19	5,39°0,16 $p<0,001$	5,02°0,26

ԶՃ-ի բարձրացումը գլխավորապես կախված է միոկարդի աշխատանքի ուժեղացման և հոգեհուզական լարվածությամբ պայմանավորված կարգավորող մեխանիզմների սիմպաթիկ ակտիվացմամբ, որը վկայում է սթեսային իրավիճակում օրգանիզմի փոխհատուցողական մեխանիզմների ակտիվ մոբիլիզացիայի մասին: Սթեսային իրավիճակում ԶՃ-ի բարձրացման պատճառներից մեկն էլ կարելի է համարել արյան դուրս մղման և ծայրամասային անոթային դիմադրության փոփոխությունների միջև եղած անհամապատասխանությունը: Գրական տվյալների համաձայն սթեսային իրավիճակներում զարկերակային հիպերթենզիայի ձևավորման ընթացքում

մեծ դեր են խաղում ցանցանման գոյացության աղբյուրների կան մեխանիզմները, լիմբիացանցանման համակարգը, ինչպես նաև նշահամալիրի և ենթատեսաթմբի հուզածին գոտիները [13]:

Հետքննական շրջանում ստուգիչ խմբի մոտ ուսումնասիրված ցուցանիշները ելակետային մակարդակի համեմատ մնում են բավականին բարձր մակարդակի վրա՝ ՄԿՀ-ն՝ 14,99%-ով, ՍԶԸ-ն՝ 13,76%-ով, իսկ ԴԶԸ-ն՝ համապատասխանաբար 8,11 %-ով , ԱՃ-ն՝ 32,86 %-ով , իսկ ՄԴԸ-ն՝ 9,48 %-ով: Քննությունից հետո պահպանվող հուզական լարվածությունը ամենայն հավանականությամբ պայմանավորված է մի շարք շարժառիթներով՝ ուսումը շարունակելու ձգտումով, պատասխանատվությամբ և այլն: Միաժամանակ քննական իրավիճակը ենթադրում է ելակետային անորոշու-թյուն, որը պայմանավորված է անհրաժեշտ արդյունք (քննություն հանձնել կամ չհանձնելը, որոշակի գնահատական) ստանալու նկատմամբ անվստահությամբ [10]:

Մեր կողմից ստացված տվյալների վերլուծությունը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ քննաշրջանը հանդիսանում է բարձր դասարանցիների հոգեկան և վեգետատիվ ցուցանիշների մակարդակի վրա անդրադարձող ուժեղ հոգեհուզական սթրեսածին գործոն: Քննական հոգեհուզական լարվածության պայմաններում հեմոդինամիկայի ցուցանիշների մակարդակի բարձրացում տարբեր տիպի կրթօջախներում դիտվել է նաև մի շարք այլ հեղինակների կողմից [8, 12, 11, 13]:

Փորձնական խմբում դիտվել են հեմոդինամիկայի ցուցանիշների ավելի մեղմ փոփոխություններ (աղ. 1): Այսպես, նրանց մոտ գրանցվել է ՄԿՀ-ի բարձրացում ելակետային համեմատությամբ ընդամենը 18,34%-ով ($p<0,001$)(աղ. 1): ՍԶԸ-ն աճել է 13,15%-ով ($p<0,001$), իսկ ԴԶԸ-ն համապատասխանաբար 10,34 %-ով ($p<0,001$): Այս շրջանում ԱՃ-ի մեծությունն աճել է 19,12 %-ով ($p<0,05$), իսկ ՄԴԸ-ն 11,82 %-ով ($p<0,001$): Հետքննական շրջանում դիտվում է ուսումնասիրված ցուցանիշների ելակետային մակարդակի վերականգնման միտում, ՄԿՀ-ն քննությունից հետո ելակետային մակարդակից մնում է բարձր ընդամենը 8,03%-ով, ՍԶԸ-ն 7,04%-ով, իսկ ԴԶԸ-ն համապատասխանաբար 4,14 %-ով, ԱՃ-ն 13,24 %-ով, իսկ ՄԴԸ-ն՝ 5,67 %-ով:

Նմանատիպ արդյունքներ գրանցվել են նաև մի շարք հեղինակների կողմից: Ն.Ֆ. Կուշներովայի տվյալների համաձայն չինական կիտրոնի յուղն ունի բարերար ազդեցություն ուսանողների կենտրոնական նյարդային և սիրտանոթային համակարգերի վրա: Փորձնական խմբի ուսանողների մոտ նախաքննական շրջանում գրանցվել է ԶԸ-ն ցուցանիշների կայունացում, ինչպես նաև էլեկտրասրտագրի ցուցանիշների դրական փոփոխություններ ստուգիչ խմբի համեմատ [6]:

Այսպիսով սիրտանոթային համակարգի գործունեության ցուցանիշների վերլուծությունը օգտագործված ԿԱՀ-ի ընդունման դինամիկայում բացահայտել է հետևյալ փոփոխությունները.

1. ԿԱՀ-ն էականորեն բարելավել է փորձարկվողների ինքնագագացողությունը, ակտիվությունը, տրամադրությունը, նվազեցրել փորձարկվողների սուր և շարունակական հոգնածության երևույթները: Դա թույլ է տալիս ենթադրել, որ նշված չափաբաժիներով պրեպարատի կիրառումը ապահովում է սիմպաթո-աղբյենալային համակարգի լարվածության նվազում:
2. Զարկերակային ճնշման ցուցանիշների համեմատաբար ավելի թույլ շեղումներ ստուգիչ խմբի համեմատությամբ
3. սիրտանոթային համակարգի գործունեության կանոնավորում և հետևաբար, տարբեր գործոնների ազդեցության նկատմամբ օրգանիզմի կայունացման բարձրացում;
4. հետքննական շրջանում հեմոդինամիկայի ցուցանիշների ելակետային մակարդակի հավաստի վերականգնում, որը վկայում է փորձարկվողների օրգանիզմի հարմարվողական գործառական պահուստների բարելավման մասին:

Հավաստի է, որ աշակերտների կողմից ԿԱՀ-ի ռացիոնալ շարունակական ընդունումը նպաստում է.

1. քննությունների հանձնման ընթացքում բարձր հոգեհուզական ծանրաբեռնվածության ժամանակ օրգանիզմը գերլարումից փրկելը;
2. առաջադիմության ստանդարտ մակարդակի պահպանմանը;
3. սիմպաթո-ադրենալինային համակարգի լարվածության նվազմանը, որն արտահայտվում է քննությունների հանձնումից հետո շնչառության հաճախության արագ վերականգնմամբ, անոթազարկի և սիստոլային ճնշման կարգավորմամբ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Агаджанян Н.А., Миннибаев Т.Ш., Северин А.Е.* и др. Гиг. и сан., 3, 48-52, 2005.
2. *Антропова В.М.* Физиология человека, 18(1), 172, 1992.
3. *Кирюшин В.Л., Лобанов С.П., Стунеева Г.И.* Гиг. и сан., 1, 47-51, 2003.
4. *Колбанов В.В.* Валеология, 1, 27-30, 2002.
5. *Копосова Т.С., Чикова С.Н., Чиков А.Е.* Научные труды I съезда физиологов СНГ, Сочи, Дагомыс, 2, 274, 2005.
6. *Кушнерова Н.Ф., Агапов Я.В., Селезнев Л.Н.* и др. Валеология, 4, 74-77, 2002.
7. *Миннибаев Т.Ш.* Мат-лы конгресса «Здоровье, обучение, воспитание детей и молодежи в XXI веке». М., 2, 272-275, 2004.
8. *Новоселова Е. Н., Сухангунова Г.Г.* Вестник Башкирского университета, 1, 53-55, 2000.
9. *Осадчая Е.А.* Валеология, 4, 16-21, 2003.
10. *Симонов П.В.* Мотивированный мозг. М., Наука, 1997.
11. *Степанова М.И., Куинджи Н.Н.* Гиг. и сан. 1, 40-44, 2000.
12. *Умрюхина Е.А., Быкова Е.В., Климина Н.В.* Физиология человека, 22 (2), 108, 1996.
13. *Юматов Е.А., Кузьменко В.А., Бадиков В.И.* и др. Физиология человека, 27(27), 104-111, 2001.

Ստացվել է 11.06.2008



THE PSEUDO-RING STRUCTURES FORMATION IN DNA COMPLEXES WITH COVALENTLY BINDING LIGANDS

S.G. HAROUTIUNYAN¹, Sh. A. SARGSYAN²,
A.P. ANTONYAN², P.O. VARDEVANYAN²

¹Yerevan State University, Departments of Molecular Physics

²Yerevan State University, Departments of Biophysics

cis-diamminedichloroplatinum (II) (*cis*-DDP) and *cis*-diamminedichloropalladium (II) (*cis*-DDPd) form covalent adduct with DNA both *in vivo* and *in-vitro*. In the present study, the UV- spectroscopic helix-coil transition method is used to analyze the changes of the high-molecular DNA double helix occurring due to the formation of complexes with those ligands at the concentration ratio of ligands/DNA - $0.00001 < r_b < 0.58$ where r_b is the number of moles of bound ligand per mole of nucleotide. The analysis of the melting curve profiles of DNA with the high GC-contents specifies a possibility of ring structures formation in high-molecular DNA. The possibility of ring structures formation in DNA has been discussed both theoretically and experimentally.

Ցիս-դիամինդիքլորպալատինը (ցիս-ԴԴՊ) և ցիս-դիամինդիքլորպալլադինը (ցիս-ԴԴՊԴ) ԴՆԹ-ի հետ կարող են առաջացնել կովալենտ կապեր ինչպես *in vivo*, այնպես էլ *in vitro* պայմաններում: Այս աշխատանքում, կիրառվել է ԴՆԹ-ի պարույր-կծիկ անցման ՈՒՄ-սպեկտրոսկոպիկ հետազոտությունը՝ բացատրելու համար նշված լիգանդների առկայությամբ բարձրամոլեկուլային ԴՆԹ-ում առաջացած փոփոխությունները լիգանդ/ԴՆԹ հարաբերության $0.00001 < r_b < 0.58$ կոնցենտրացիոն տիրույթում, որտեղ r_b հարաբերական կոնցենտրացիան է, այսինքն մեկ նուկլեոտիդին բաժին ընկնող լիգանդի մոլեկուլների թիվն է: Բարձր GC պարունակությամբ ԴՆԹ-ի հալման կորերի վերլուծությունը վկայում է բարձրամոլեկուլային ԴՆԹ-ում օղակաձև կառուցվածքների առաջացման հավանականության մասին: Այս երևույթը ուսումնասիրվել է և՛ տեսական և՛ փորձարարական եղանակներով:

Цис-диаминдихлорплатина (цис-ДДП) и цис-диаминдихлорпалладий (цис-ДДПД) могут образовывать ковалентные связи с ДНК, как в *in vivo*, так и *in vitro* условиях. В данном исследовании использован метод УФ-спектрофотометрии для анализа изменений, имеющих место в двойной спирали ДНК вследствие формирования комплексов с изученными лигандами при концентрационном соотношении лиганд/ДНК $-0.00001 < r_b < 0.58$, где r_b – количество молекул лиганда, приходящееся на один нуклеотид. Анализ кривых плавления ДНК с высоким ГЦ-содержанием свидетельствуют о вероятности образования кольцевых структур в высокомолекулярной ДНК. Этот феномен исследован как теоретически, так и экспериментально.

cis-diamminedichloroplatinum(II) - *cis*-diamminedichloropalladium (II) (*cis*-DDPd) - helix-coil transition - interstrand crosslinks - pseudo-ring structures

The antitumor drugs *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (*cis*-DDP) and *cis*-diamminedichloropalladium (II) (*cis*-DDPd) form covalent adduct with DNA both *in vivo* and *in-vitro*. Several types of interaction between DNA and *cis*-DDP are well known [1, 7]. The most important type of interaction of *cis*-DDP with DNA is a 1-2 intrastrand crosslink, which is the result of bifunctional binding of *cis*-DDP to the N(7) position of two adjacent guanine bases in the same strand of a d(GpG) sequences (~65% of total platinations at $r_b < 0.01$) ($r_b = C_{\text{cis-DDP}}/C_{\text{DNA}}$, as a number of moles of platinum bound per mole of nucleotide). The second type of interaction (~23%) is a 1-2 intrastrand crosslink formed at the d(ApG) sequences. Finally a 1-3 intrastrand crosslink at the d(GpXpG) sequences (~7%) is the result of bifunctional attachment of *cis*-DDP to two guanines separated by any intervening base [4]. Monofunctional adducts of *cis*-DDP and interstrand crosslinks are relatively rare (~5% and 1% of total platinations, respectively). *cis*-DDP can also chelate at the N(7)-O(6) position of guanine. The formation of these adducts is accompanied by changes in melting temperature (T_m) and width of the melting interval (ΔT) of the helix-coil transition of DNA.

In the present study a UV-spectroscopic helix-coil transition method is used to analyze the changes of the high-molecular DNA double helix occurring due to formation of complexes with *cis*-DDP and *cis*-DDPd at the concentration of *cis*-DDP $1 \cdot 10^{-5} < r_b < 5.8 \cdot 10^{-1}$, where r_b is the number of the moles of bound DDP per mole of nucleotide.

Materials and methods. Native preparation as DNA *M. luteus* ($X_{GC} = 0,72$), *Cl. Perfringens* ($X_{GC} = 0,28$) (Sigma, USA) were used. *cis*-diamminedichloroplatinum (II) (*cis*-DDP) and *cis*-diamminedichloropalladium (II) (*cis*-DDPd) were received from Sigma Co. Since rigorous quantitative control of the metall complex interacting with DNA was not necessary, the concentration of the added *cis*-DDP and *cis*-DDPd was determined by weight. The concentration range of ligands was 10^{-9} - $5 \cdot 10^{-5}$ M. DNA solutions prepared in 10^{-2} M NaClO₄ + 10^{-3} M NaCl were incubated with these ligands for 48 h at 20°C. The DNA concentration in UV measurements determined on UV-VIS spectrophotometer UnicamSP8-100 (England) with thermostated cells, was 10 ml. The rate of the temperature changes was 0.25 °C / min.

Results and discussion. The characteristic behavior of the DNA melting temperature T_m on concentration of *cis*-DDP and *cis*-DDPd shows that there are three precisely expressed areas of ligand concentration depending on efficiency of influence of those ligands on DNA (table 1): The behaviour of DNA in the first two areas of concentration of these two ligands, was in detail considered in the works [3,5,6]. The character of T_m changes in the first area of *cis*-DDP concentration seems rather strange. The observed changes of parameters of helix-coil transition cannot be explained in terms of local alterations of the double helix caused by local, kinetically inert, bidentate and monodentate platinum binding to DNA sequences.

Table 1. Melting temperature (T_m) and melting interval (ΔT) for complexes of *cis*-DDP and *cis*-DDPd with DNA of different GC-composition at various concentration of ligands

C, Mol	r_b	Cl.Perfringens				M.Luteus			
		T_m		ΔT		T_m		ΔT	
		<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -DDPd	<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -DDPd	<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -DDPd	<i>cis</i> -DDP	<i>cis</i> -DDPd
0	0	60.0	60.0	5.8	5.8	78.8	78.8	7.0	7.0
10^{-9}	10^{-5}	60.1	60.9	6.2	6.5	69.7	68.1	20.0	21.0
5×10^{-9}	5.8×10^{-5}	60.0	61.2	6.3	6.9	69.9	68.1	19.8	20.9
10^{-8}	10^{-4}	59.7	58.5	6.0	6.9	-	-	-	-
5×10^{-8}	5.9×10^{-4}	60.8	58.1	6.1	7.1	66.1	64.7	16.0	21.3
10^{-7}	7×10^{-4}	58.2	57.3	6.2	7.4	-	-	-	-
5×10^{-7}	6×10^{-3}	58.0	56.9	6.4	7.9	66.3	63.8	17.1	22.2
10^{-6}	8×10^{-3}	55.0	53.1	6.7	8.5	-	-	-	-
5×10^{-6}	6×10^{-2}	51.8	48.4	8.5	9.5	62.0	60.1	28.8	29.9
10^{-5}	10^{-1}	43.8	40.2	10.9	12.1	-	-	-	-
5×10^{-5}	5.8×10^{-1}	45.2	38.3	12.8	13.3	50.8	48.2	20.8	30.5

1. the area of monotonous increase of DNA melting temperature at $10^{-5} < r_b < 10^{-4}$;
2. the area of monotonous downturn of DNA melting temperature ($10^{-4} < r_b < 10^{-3}$)
3. the area of sharp fall of DNA melting temperature of ($10^{-3} < r_b$).

Exposition of the model. *cis*-platinum is known to be the cross-linked agent, connecting nitrogen bases of different nucleotides. The outcome of the interaction can be the cross-linking of the neighboring nucleotides of one or complementary chains [7]. Such point interactions and their influence at low concentration on thermodynamic parameters is aimed at zero, proportional to the concentration [7].

Such a situation is probable, when the binding with a chain is monodentate [7,2] (when the nucleotides are not, capable of binding with the second valency of the *cis*-platinum at the closest environment from the place of binding).

In this case active non-saturated valence will be off-the shelf to bind with the appropriate nucleotide, outlying along the chain. Such cross-linking is quite probable, as for rather long DNA it represents a friable coil with significant number of two-body contacts. Thus, the monodentate bound ligand can meet with nucleotide during a considerably long period of time, and capable of forming cross-links in an outcome of two-body contacts of groups outlying along a chain.

Ring structures are formed as a result of such cross-linking. If a few such cross-links per one macromolecule is present, the formed structure will be similar to a ring closed DNA, because in this case the chains of a part of DNA can not be divided due to cross-linking.

Thus, the small amount of ligands (some pieces per one macromolecule) will decrease to an originally new type of structure (pseudo-ring structure) with new properties.

Let's note that for usual ligands the system is described by the concentration per one repeated unit. In the case of formation of ring structures the system is described by the concentration per one macromolecule. And these concentrations for long DNA differ in the order of the lengths of macromolecules.

It is the mentioned reasons which underlie the elementary model, describing the behavior of DNA-ligand complex melting temperature.

Let us suppose that the following parameters are present in a solution:

N - the number of DNA macromolecules.

n - the number of base pairs in one macromolecule

m - the number of ligands, bound with one macromolecule

p_0 - the probability of ligand monodentate binding capable of forming ring structures

Let's designate c - a ligand concentration per base pair.

Then $c = \frac{m}{Nn}$, $m = Nnc$.

The number of monodentally bound ligands will be $f = Nnp_0c$.

As a result the number of ring structures will be defined as $S = Nnpc$, where p is defined as probabilities of monodentally bound ligands to construct the cross-links and average number of cross-links to construct the topologically closed structures. Let's suppose the existing of a mixture consisted of S - ring structures with T_1 melting temperature and N - linear structures with T_0 melting temperature in a solution.

It is correct though it is improbable to link strictly the two ends of a chain.

The non - ring parts of the chain will always remain.

Thus, the melting temperature will be

$$T = \frac{NT_0 + ST_1}{N + S}, \Delta T = T - T_0 = \frac{\delta T \alpha c}{1 + \alpha c} \quad (1)$$

where $\delta T = T_1 - T_0$, $\alpha = pn$.

It is known that cisplatin bidentate bound with DNA basically destabilizes the helical structure [7]. In this case we can use the general result of ligand theory according to [8].

$$\delta\left(\frac{1}{T}\right) = \frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} = \frac{c}{\tau} \quad (2)$$

where τ - constant has temperature dimensionality. The melting temperature is expressed as:

$$T = \frac{T_0}{1 + \frac{T_0}{\tau}c}; \Delta T_2 = T - T_0 = -\frac{\frac{cT_0^2}{\tau}}{1 + c\frac{T_0}{\tau}} = -\frac{T_0\beta c}{1 + \beta c} \quad (3)$$

Thus, through ring structures form and the bidentate binding are being destabilize, the common change of melting temperature is determined by an additive sum

$$\Delta T = \Delta T_1 + \Delta T_2 = \frac{\delta T \alpha c}{1 + \alpha c} - \frac{T_0 \beta c}{1 + \beta c} \quad (4)$$

Thus there is good agreement of experimental data obtained for ring structures formation with appropriate theoretical calculations.

REFERENCES

1. Boudvillian M., Dalbies R., Leng M. *Met.Ions Biol.Syst.* 33, p.87, 1996.
2. Butour J.L., Macquet J.P. *Biochim. Biophys. Acta* 653, p.305-315, 1981.
3. Dalyan Y.B., Haroutiunian T.S., Haroutiunian S.G., Vardevanyan P.O. *Exp.and Mol. Medicine* 35, p.534-537, 2003.
4. Eastman A. *Biochemistry* 24, p.5027, 1985.
5. Haroutiunian S.G., Dalyan Y.B., Morozov V.F., Mamasachlissov Eu. Sh., Shahinian M.S., Akhrem A.A., Lando D.Y., Messori L., Orioli P. *Inorg. Chimica Acta* 275-276, p.510-514, 1998.
6. Haroutiunian S.G., Bruni B., Monnanni R., Mangani S., Orioli P. *Inorg. Chimica Acta* 184, p.127-132, 1991.
7. Sherman S.E., Lippard S.J. *Chem. Rev.* 87, p.1153, 1987.
8. Vedenov A.A., Dykhne A.M., Frank-Kamenetskii M.D. *Uspekhi Fizich. Nauk* (in Russian) 105, p.479-549, 1971

Received 14.06.2008



Biolog. Journal of Armenia, 1-2 (60), 2008

UDC: 577.150.2

**METHOD OF THE SIMULTANEOUS DETERMINATION
OF L-PHENYLALANINE AND L-TYROSINE BY MEANS
PHENYLALANINE – AMMONIA-LYASE FROM
RHODOTORULA AURANTIACA KM-1**

**I.L. BAZUKYAN¹, A.A. HAMBARDZUMYAN²,
S.A. ANDREASYAN², YU.G. POPOV¹**

¹Yerevan state university, ²SRI “Biotechnology”, Yerevan,
E-mail: bazukyan@yahoo.com

An enzymatic method of simultaneous determination of L-phenylalanine (Phe) and L-tyrosine (Tyr) in blood and other biological liquids by phenylalanine – ammonia-lyase of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 was developed. Differences between optical absorptions of trans-cinnamic, p-hydroxy-cinnamic acids, Phe and Tyr at 250 nm and 310 nm wavelengths allow for simultaneous quantitative detection of these aromatic amino acids in investigated samples. The linear model of the dependence of concentration measured from prepared samples is statistically significant for Phe (calculated by SPSS 11.5). Similarly, the linear model of the dependence of measured concentration from prepared samples is statistically significant for Tyr. Besides, the measured concentrations of Phe and Tyr are mutually independent. The regression analysis of measurements of Phe concentration in dried spots of blood taken from normal and sick children by offered method and by means of amino acid analyzer reveals strong correlation.

Разработан метод одновременного определения концентраций L-фенилаланина (L-фен) и L-тирозина (L-тир), в пробах крови и других биологических жидкостях, посредством фенилаланин – аммиак-лиазы *Rhodotorula aurantiaca* KM-1. Различие оптических поглощений транс-коричной кислоты и п-гидроксикоричной кислоты при длинах волн 250 нм и 310 нм, а также низкое оптическое поглощение L-фен и L-тир в указанном диапазоне можно использовать для одновременного количественного определения этих ароматических аминокислот в исследуемых образцах. Как для L-фен, так и для L-тир линейная модель зависимости измеренных концентраций от приготовленных статистически значима (рассчитанно по программе SPSS 11.5). В то же время измеренные значения L-фен и L-тир взаимонезависимы. Регрессионный анализ измерений концентраций L-фен в высушенных пятнах крови нормальных и больных детей данным методом и при помощи аминокислотного анализатора выявляет сильную регрессию.

Մշակվել է *R. aurantiaca* KM-1-ից անջատված և մաքրած ՖԱԼ-ի կիրառմամբ արյան մեջ և այլ կենսաբանական հեղուկներում L-ֆենիլալանինի (L-Ֆեն) և L-թիրոզինի (L-թիր) խտությունների միաժամանակյա չափման մեթոդ: Տրանս-դարչնաթթվի և պիդրոքսիդարչնաթթվի օպտիկական խտությունների տարբերությունը 250 և 310 նմ ալիքի երկարության պարագայում, ինչպես նաև տվյալ ալիքների տիրույթում L-Ֆեն և L-թիր ցածր օպտիկական խտությունը կարելի է կիրառել հետազոտվող նմուշներում նշված արոմատիկ ամինոթթվների միաժամանակյա չափման համար: Ինչպես L-Ֆեն, այնպես էլ L-թիր համար չափված խտությունների կախվածության գծային մոդելը պատրաստվածներից -վիճակագրորեն հավաստի է (հաշվարկը կատարվել է SPSS 11.5 ծրագրով): Մի առ ժամանակ L-Ֆեն և L-թիր չափումները կախյալ չեն իրարից: L-Ֆեն խտությունների չափման ռեգրեսիոն վերլուծումը հիվանդ և առողջ երեխաների արյան չորացած բծերում առաջարկվող մեթոդով և ամինաթթվային անալիզատորի օգնությամբ ցուցաբերում է հստակ ռեգրեսիա:

L-phenylalanine, L-tyrosine, L-phenylalanine – ammonia-lyase, Rhodotorula aurantiaca KM-1, differential spectrophotometry, phenylketonuria.

Phenylketonuria (PKU) is an inborn error of Phe metabolism. Mutations in L-phenylalanine hydroxylase (PAH) gene result in enzyme deficiency leading to the hyper phenylalaninemia (HPA) [4], i.e. to the accumulation in blood and other liquids of organism of Phe ($600\text{--}1800\ \mu\text{mol L}^{-1}$ instead of $180\text{--}480\ \mu\text{mol L}^{-1}$ as normal), phenylpyruvic, phenylacetic, orthoxyphenylacetic acids and other agents, which are excreted with urine. The consequences of metabolic disorder are mental retardation, microcephaly, epileptic seizures, and, without the curing of the disease, the patients become a deep invalids for the whole life.

Two types of PKU are known:

1. Classical PKU, which is the result of just PAH deficiency owing to the mutation in the enzyme coding gene.
2. The group of atypical forms of PKU determined by the PAH cofactor - tetrahydrobiopterine deficiency owing to the mutant genes inheritance. Among these genes are ones coding for 5'-GTP-cyclohydrolase, 6-pyruvyltetrahydropterinsynthase, sepiapterinreductase, dihydropterinreductase, etc.

The disease is inherited through autosome-recessive type. The probability of mutant gene appearance is approximately 1-2 per 100 persons, but the disease develops only in the case when both mother and father are the carriers of the risk gene and the child inherits it in double set. That is why the disease occurs much more seldom. The morbidity of PKU has ethnic and race variability. The average frequency of occurrence among Europeans is 1:10000; the range is varies between 1:4000 – 1:25000. According to the data of Ministry of Health of Republic of Armenia the number of registered PKU children in the age up to one year old was: in 2004 – 3, in 2005 – 2. In 1998 in RA 76 patients (1975-1998 years of birth) with PKU diagnosis have been registered and cared.

Obviously, the timely revelation of disease and immediate realization of necessary medical measures (diet therapy and other methods of treatment) might promote patients recovery and minimize or completely prevent disability. This will allow for achieving their social rehabilitation and integration into the society.

The attempts were made to cure PKU by the Phe removal from the blood. In such way the mice were injected by *Rhodospiridium toruloides* phenylalanine – ammonia-lyase (PAL): the purified enzyme was intramuscularly injected to mice with PAH mutation. It was shown, that injections decreased Phe concentration in blood plasma of treated mice to physiological value [3].

By all its characteristics PKU corresponds to inherited metabolic defects, which are subjected to the total screening. The microbiological, chromatographic, fluorometric and enzymatic methods are used for urine and blood screening in PKU diagnostics [8].

The disadvantages of microbiological methods are: semi quantitative results, long duration of analyses (no less than 24 h.) and possibility of the influence of antibiotics on the results of analysis, which can be a cause of false-negative results. Chromatographic and fluorometric methods are inaccessible for majority of clinics because of necessity of expensive apparatuses. For developing countries like Armenia, enzymatic photo colorimetric methods for quantitative determinations of Phe in dried blood samples are more convenient.

The enzymatic method of Phe determination by phenylalanine dehydrogenase (PDH) is often used in Armenian clinics. This method is quite specific, fast and automation friendly [3]. The method of simultaneous determination of Phe and Tyr by PAL of *Rhodotorula glutinis* was also described [5].

The micro method of quantitative determination of Phe for PKU diagnostics by using *Proteus rettgeri* was described too. Authors referred to the ability of this strain to deaminate Phe, but the true mechanisms of reaction were not described. Despite to the statistical validity of this method, it is complicated, prolonged and the mechanism is not clear [7].

For Phe determination the method of sensitive (0.03-3.00 mM) enzymatic electrode preparation on the base of recombinant PDH from *Bacillus badius* is known. However required working volume of electrode - 5 ml is too large for PKU diagnostics [9].

In the healthy organism Tyr is non essential amino acid, synthesized from Phe under the influence of PAH. Its concentration depends on the condition of organism and varies during the day (35 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). PKU patients, subjected to strong anti-phenylalanine diet, have a problem of hypo tyrosinemia. In dietary products, prescribed to the treated PKU patients, the quantity of Tyr varies in the range of 30 to 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$. But sometimes in the blood of such patients' one can observe the Tyr concentration's increase up to 340 $\mu\text{mol L}^{-1}$ [6]. The increased concentration of Tyr, in its turn, exerted toxic influence on the organism. Thus, Tyr determination in the blood of PKU patient is of great importance too for scientists and physicians.

The purpose of this work is developing the method, convenient for clinical application, which allows the simultaneous determination of Phe and Tyr in blood samples and other biological liquids by PAL of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1.

Materials and Methods. PAL. The purified PAL of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 with 2.5-3.0 U/mg specific activity was used in this study [1].

Spectral researches. Spectral researches were carried out on UV-VIS spectrophotometer Perkin-Elmer 550S (Bodenbeewerk, Germany). Trans-cinnamic and p-hydroxy-cinnamic acid, Phe, Tyr were purchased from Sigma-Aldrich-Fluka. Molecular extinction coefficients of studied compounds at 250 nm and 310 nm were determined by single point mode.

Analytical methods. Phe and Tyr concentrations were measured in the reaction mixture, which contained in 200 µl of final volume: 100 µl of model mixture extract of amino acids after precipitation of blood plasma enzymes with 3% trichloroacetic acid (TCA), and 100 µl of mixture of 500 mM Tris-HCl buffer (pH 8.9) and 0.1 U PAL. The model mixture of amino acids contained 60 % (V/V) human blood plasma. Two reaction mixtures were prepared for each model system. In the first mixture the reaction was stopped after 5 min incubation in a boiling water bath just after PAL addition (control), and in the second mixture the reaction was stopped by the same way after 4 h incubation at 30°C. The method of calculation of amino acids' concentrations is given with results.

The measurement of Phe concentrations in dried blood spots of normal and sick children by means of PAL was carried out using above described way, after extraction of amino acids in round pieces of a filter paper (1 cm diameter). The extraction of amino acids was realized by shaking pieces of filter paper on a round rocking chair B. ITH1 (Braun, Germany) in tubes containing 0.5 ml of 3 %TCA during 30 min at a room temperature. Blood proteins were removed by centrifugation. The volume of the blood, by which was impregnated the piece of filter paper, was counted by the quantity of distilled water, sucked in with the filter paper piece of the same size.

Measurement of Phe concentration in dried spots of blood of normal and sick children was carried out by amino acid analyzer AAA T339 (Microtechna, Praha). The above described amino acid extracts were used for these analyses.

Statistics. The regression analyses were carried out by software package SPSS 11.5.

Results and Discussions. Dependences of extinction coefficients on wavelengths for trans-cinnamic and p-hydroxy-cinnamic acids, Phe and Tyr are shown in Chart 1.

$$\begin{aligned} D_{250}^K &= \epsilon_{250}^P \times C_{250}^P + \epsilon_{250}^T \times C_{250}^T + D_{250} \\ D_{250} &= \epsilon_{250}^{Cin} \times C_{250}^{Cin} + \epsilon_{250}^{HC} \times C_{250}^{HC} + D_{250} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} D_{310}^K &= \epsilon_{310}^P \times C_{310}^P + \epsilon_{310}^T \times C_{310}^T + D_{310} \\ D_{310} &= \epsilon_{310}^{Cin} \times C_{310}^{Cin} + \epsilon_{310}^{HC} \times C_{310}^{HC} + D_{310} \end{aligned} \quad (2)$$

Where

D_{250}^K - optical density of control at 250 nm,

D_{310} - optical density of sample at 310 nm after PAL action,

ϵ_{250}^P - extinction coefficient of L-phenylalanine at 250 nm,

P, T, Cin, HC - L-phenylalanine, L-tyrosine, t-cinnamic acid and p-hydroxy-cinnamic acid

$$C_P = \frac{(D_{250} - D_{250}^K) \times (\epsilon_{310}^{HC} - \epsilon_{310}^T) - (D_{310} - D_{310}^K) \times (\epsilon_{250}^{HC} - C_{250}^T)}{(\epsilon_{250}^{Cin} - \epsilon_{250}^P) \times (\epsilon_{310}^{HC} - \epsilon_{310}^T) - (\epsilon_{310}^{Cin} - \epsilon_{310}^P) \times (\epsilon_{250}^{HC} - C_{250}^T)} \quad (3)$$

$$C_T = \frac{(D_{310} - D_{310}^K) \times (\epsilon_{250}^{Cin} - \epsilon_{250}^P) - (D_{250} - D_{250}^K) \times (\epsilon_{310}^{Cin} - \epsilon_{310}^P)}{(\epsilon_{250}^{Cin} - \epsilon_{250}^P) \times (\epsilon_{310}^{HC} - \epsilon_{310}^T) - (\epsilon_{310}^{Cin} - \epsilon_{310}^P) \times (\epsilon_{250}^{HC} - C_{250}^T)} \quad (4)$$

Where

C_P - L-phenylalanine concentration

C_T - L-tyrosine concentration

Chart 1. Formulas for calculation of Phe and Tyr concentrations.

The results obtained show that differences between optical absorptions of trans-cinnamic and p-hydroxy-cinnamic acids at 250-260 nm and 300-310 nm wavelengths, as well as low optical absorptions of Phe and Tyr in the mentioned diapason can be used for simultaneous quantitative determination of these aromatic amino acids in investigated samples.

Experimental estimation of combinations of different wavelength pairs allows choosing a pair 250 and 310 nm as optimal in this respect. The coefficients of molecular extinctions for mentioned wavelengths are presented in Table 1.

Table 1. Molecular extinction coefficient for trans-cinnamic and p-hydroxy-cinnamic acids, L-Phe and L-Tyr

Agent	Extinction coefficient, $M^{-1}cm^{-1}$	
	250 nm	310 nm
L-Phe	158±15	12±01
L-Tyr	2630±56	208±10
Trans-cinnamic acid	7640±67	220±11
p-hydroxy-cinnamic acid	3733±45	14550±96

The idea of simultaneous measurement of Phe and Tyr concentrations in unknown biological solutions is based, according to Ber's law, on the measurement of initial optical absorption of solution (at 1 cm light path) depending on the concentrations of Phe, Tyr and other agents (the formulas 1 and 3 on the Fig. 1) and the absorption of the same solution after PAL treatment depending, in this time, on the absorption of trans-cinnamic, p-hydroxy-cinnamic acids and not reacted agents (the formula 2 and 4 on the chart 1) synthesized during enzymatic deamination.

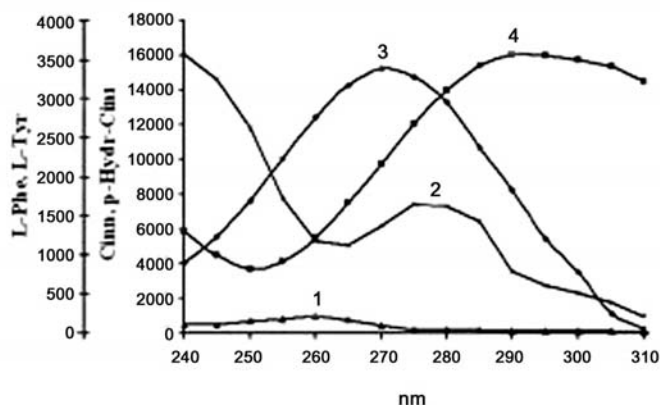


Fig. 1. Dependences of extinction coefficients on wavelength for trans-cinnamic (3) and p-hydroxy-cinnamic (4) acids, Phe (1) and Tyr (2).

Then unknown concentrations of Phe and Tyr were determined by solving the system of two linear equations consisting of differences of equations (2) and (1), on the one side, and equations (4) and (3), on the other side. They were calculated by formulas (5) and (6) respectively (chart 1). The data of simultaneous measurement of Phe and Tyr concentrations in model solutions, which were prepared on human blood plasma, are presented in Table 2.

Table 2. Measurement of Phe and Tyr concentrations in model solutions prepared from human blood plasma

Probe	Measured, mM		Prepared, mM	
	Phe	Tyr	Phe	Tyr
1	16.04	2.12	15.0	2.0
2	5.53	2.05	5.0	2.0
3	2.39	2.08	2.0	2.0
4	0.63	2.29	0.5	2.0
5	0.29	2.23	0.2	2.0
6	16.15	0.95	15.0	1.0
7	5.58	0.99	5.0	1.0
8	2.54	1.11	2.0	1.0
9	0.63	1.21	0.5	1.0
10	0.24	1.22	0.2	1.0
11	16.63	0.19	15.0	0.2
12	5.49	0.24	5.0	0.2
13	2.16	0.24	2.0	0.2
14	0.65	0.22	0.5	0.2
15	0.25	0.24	0.2	0.2

The regression analysis of correlation between Phe concentration measured by offered method and the prepared concentrations of this amino acid, calculated by SPSS 11.5, reveals the linear dependence shown on the chart 2 (the formula 7). Similar regression dependence for Tyr is presented by the formula 8 on the chart 2.

$$[\text{Phe}_{\text{measured}}] = a_1 + b_1 \times [\text{Phe}_{\text{prepared}}] \quad (5)$$

Where

$$a_1 = 0.118 \pm 0.053$$

$$b_1 = 1.078 \pm 0.007$$

$$[\text{Tyr}_{\text{measured}}] = a_2 + b_2 \times [\text{Tyr}_{\text{prepared}}] \quad (6)$$

Where

$$a_2 = 0.017 \pm 0.041$$

$$b_2 = 1.071 \pm 0.032$$

Chart 2. Dependence of Phe (7) and Tyr (8) concentrations measured by PAL on prepared concentrations of these amino acids.

The linear model of concentration dependence measured from prepared samples is statistically significant for Phe, since $R = 1.000$; $R^2 = 0.999$; $F = 21439.118$, $\text{Sig } F = 0.000$; $t = 146.421$, $\text{Sig } t = 0.000$ (where R – coefficient of correlation, R^2 – coefficient of determination, $\text{Sig } F$ – consequence of F-statistics, $\text{Sig } t$ – consequence of t-statistics) [2]. Similarly the linear model of dependence of measured concentration from prepared samples is statistically significant for Tyr too, since in this case $R = 0.994$; $R^2 = 0.989$; $F = 1150.510$, $\text{Sig } F = 0.000$; $t = 33.919$, $\text{Sig } t = 0.000$. Besides the measured concentrations of Phe and Tyr are mutually independent, since calculated by SPSS 11.5 correlation coefficient between them $R = 0.068$.

It is necessary to note also, that initial concentrations of Phe – $a_1 = 0.118$ mM and Tyr – $a_2 = 0.017$ mM (chart 2) specify concentrations of corresponding amino acids, included in model system with human blood plasma.

The results of measurement of Phe concentrations in dried blood spots of normal and sick children by offered method and by amino acid analyzer are presented in Table 3.

Table 3. Measurement of Phe concentration in dried blood spots of normal and sick children by PAL and the amino acid analyzer

Probe	Phe concentration, mM	
	Offered method	Amino acid analyzer
1	0.11	0.10
2	0.12	0.13
3	0.09	0.10
4	0.17	0.15
5	0.07	0.08
6	0.31	0.35
7	0.38	0.37
8	1.09	1.01
9	0.78	0.81

The regression analysis of measurements of Phe concentration in dried spots of blood taken from normal and sick children by offered method and by means of amino acid analyzer reveals strong regression with following parameters: $R = 0.996$; $R^2 = 0.992$; $F = 886.183$, $\text{Sig } F = 0.000$; $t = 29.769$, $\text{Sig } t = 0.000$.

Discussion. The method is based on the ability of *Rhodotorula aurantiaca* KM-1 PAL at pH 8.9 to transform completely Phe to trans-cinnamic acid, and Tyr - to p-hydroxy-cinnamic acid accordingly [8] and on essential differences of absorption spectra of trans-cinnamic, p-hydroxy-cinnamic acids and corresponding amino acids. This allows to measure quantitatively trans-cinnamic and p-hydroxy-cinnamic acids, derived after enzymatic hydrolysis, by the differences of optical absorption of initial and final solutions (before and after enzymatic hydrolysis) at two different wavelengths (250 and 310 nm).

This method favorably differs from other enzymatic methods of PKU diagnosis, as it allows simultaneous determination of Phe and Tyr [1, 3-7]. Tyr determination is necessary for correct PKU therapy. The known method of Phe and Tyr simultaneous determination by Shen and Abell, though being rather simple, is less precise [4]. It does not take into account absorptions of Tyr and other blood components in employed wavelength areas. The proposed method of differential spectrophotometric determination of Phe and Tyr allows solving this problem. The apparent difficulties of calculation of concentrations with using advised formulas does not comprise any separate difficulty as they can be done, for example, by Excel software package.

REFERENCES

1. Bazukyan IL, Vardanyan AE, Hambardzumyan AA. In G.E. Zaikov, Ed. Biocatalysis and Biocatalytic technologies, Nova Science Publisher, p. 9-21, 2006.
2. Magnus JR, Katyshev PK, Peresetsky AA. Econometrics. Initial Courses: Manual. 4-th issue M.: Delo, p. 400, 2000,
3. Sarkissian ChN, Shao ZhSh, Blain F. Natl. Acad. Sci. USA 96: p. 2339-2344, 1999.
4. Scriver CR, Waters PJ. Trends Genet. 15: p. 267–272, 1996.
5. Shen R, Abell CW. Science 197: p. 665-7, 1977.
6. Spronsen FJ, Rijn M, Bekhof J, Koch R, Smit PG. Am. J. Clin. Nutr. 73: p. 153-157, 2001.
7. Vallian S, Moeini H. J. Appl. Genet. 47(1): p. 79–83, 2006.
8. Vilaseca MA, Farre C, Ramon F. Clin. Chem. 39/1: p. 129-131, 1993.
9. Villalonga R, Fujii A, Shinohara H. Biotechnol. Lett. 29: p. 447–452, 2007.

Received 15.06.2008



Биолог. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 577.150

ВЛИЯНИЕ МАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ *cis*-DDP НА АДСОРБЦИЮ ЛИГАНДОВ НА ДНК

В.Б. АРАКЕЛЯН, С.Г. АРУТЮНЯН, Г.С. САРКИСЯН,
П.О. ВАРДЕВАНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

В рамках стохастического описания адсорбции лигандов на ДНК показано, что при малых концентрациях *cis*-DDP, связываясь с ДНК, вызывает изменения как изотермы адсорбции лигандов, так и дисперсии числа связанных с ДНК лигандов. Линейная, в координатах Скэтчарда, изотерма адсорбции трансформируется в нелинейную изотерму, а на кривой зависимости дисперсии от концентрации лигандов изменяются как величина максимума, так и его положение.

ՊՆԹ-ի հետ լիգանդների կապման ստոխաստիկ նկարագրության շրջանակներում ցույց է տրված, որ *cis*-DDP-ի փոքր կոնցենտրացիաները հագեցնում են ՊՆԹ-ի հետ լիգանդների ադսորբման կորերի, ինչպես նաև կապված մոլեկուլների դիսպերսիայի փոփոխությունների: Սկետչարդի կորրդինատներով կառուցված կապման ուղղագիծ կորը ձևափոխվում է ոչ զծային կորի, իսկ լիգանդի կոնցենտրացիայից դիսպերսիայի կախվածության կորի վրա փոխվում են և մաքսիմումի մեծությունը, և դիրքը:

Within the framework of stochastic description of ligands adsorption on DNA it is shown that at low concentrations *cis*-DDP, bound with DNA, causes changes in both isotherms of ligand adsorption and dispersions of number of ligands bound with DNA. The linear isotherm of adsorption, in Scatchard's coordinates, transforms to a nonlinear one. The value of maximum as well as its position on the curve of dispersion dependence on the ligand concentration are also changed.

ДНК - cis-DDP - лиганды - кривая Скетчарда – изотерма адсорбции

В настоящее время широко исследуется взаимодействие различных низкомолекулярных веществ-лигандов с ДНК, поскольку, связываясь с ДНК различными способами – нековалентным (интеркаляционным, внешним) и ковалентным, эти вещества могут по-разному менять конформацию макромолекулы и тем самым влиять на структуру ДНК [2, 4, 5 18]. Нековалентное связывание лигандов с ДНК является обратимым.

Это обстоятельство позволяет с помощью хорошо разработанного метода анализа изотерм адсорбции получать ценную информацию о взаимодействии большого класса обратимо связывающихся лигандов с ДНК. Однако целый ряд веществ, в том числе и противоопухолевый препарат *cis*-DDP, связываются с ДНК ковалентно, необратимым образом. Это исключает прямое применение метода анализа изотерм адсорбции для исследования процесса связывания таких лигандов с ДНК. Можно ожидать, что необратимое связывание некоторых лигандов с ДНК может привести к такому изменению структуры ДНК, которое будет влиять на адсорбцию обратимо связывающихся лигандов с ДНК. Эти исследования представляют ценность еще и потому, что в реальной клеточной системе ДНК окружена многочисленными различными соединениями и связывание только одного лиганда с ДНК скорее всего является исключением, чем правилом. Особый интерес представляет исследование взаимодействия противоопухолевого препарата *cis*-DDP с ДНК. Считается, что *cis*-DDP ингибирует синтез ДНК в быстро размножающихся раковых клетках, необратимо связываясь с ней [7, 14, 17]. Связывание этого вещества с ДНК нарушает ее структуру таким образом, что репликация либо не происходит, либо она приводит к образованию нежизнеспособных клеток.

Целью данной работы является исследование влияния *cis*-DDP на адсорбцию лигандов с ДНК, поскольку исследование изотермы связывания в трехкомпонентной системе может дать дополнительную информацию о механизме необратимо связывающихся лигандов с ДНК.

Теоретическая часть. Рассмотрим адсорбцию лигандов в условиях, когда мало не только количество необратимо связывающегося вещества (*cis*-DDP) с ДНК, но и количество обратимо связывающегося лиганда, т.е. при малых заполнениях ДНК. Будем исходить из того факта, что при малых заполнениях ДНК *cis*-DDP в молекуле ДНК образуются псевдокольцевые структуры [1], поскольку *cis*-DDP образует мостики между гуанинами ДНК, удаленными друг от друга. Образование псевдокольцевых структур в ДНК приводит к тому, что в молекуле полимера образуются частично раскрученные участки. Это обстоятельство позволяет принять, что в ДНК можно различить две области с различными адсорбционными свойствами – области с кольцевыми структурами и области внекольцевых ДНК. Естественно считать, что эти области имеют различные константы связывания и различное число мест, с которыми может связаться одна молекула лиганда. Так как адсорбция на этих участках идет независимым образом, то адсорбцию лиганда на ДНК можно представить как результат совместной адсорбции на двух участках ДНК. Для вычисления изотермы адсорбции на такой ДНК вначале вычислим изотерму адсорбции на одном из участков ДНК, а затем по аналогии – для второго участка и просуммируем их.

Предположим, что число адсорбционных центров (число пар оснований) на ДНК равно N и с ДНК связалось m молекул *cis*-DDP. Для простоты примем, что каждая связанная молекула *cis*-DDP приводит к образованию кольца, в котором заключено l пар оснований. (Поскольку общее число связанных с ДНК *cis*-DDP мало, то число молекул *cis*-DDP

внекольцевых структур тоже мало и их влиянием на свойства ДНК можно пренебречь.) Таким образом, число пар оснований в кольцевой ДНК будет $N_2 = ml$. Число пар оснований внекольцевой ДНК будет $N_1 = N - N_2$.

Опишем адсорбцию лиганда на внекольцевых участках ДНК. Примем, что одна молекула лиганда при связывании с линейными участками ДНК занимает n_1 подряд расположенных мест. Вывод изотермы адсорбции лиганда на ДНК проведем на основе квазихимической модели связывания лиганда с ДНК. Адсорбцию лиганда на ДНК представим как квазихимическую реакцию связывания лиганда (L) из раствора со свободным местом (M) на линейном участке ДНК [9]



где (LM) – комплекс лиганда с ДНК; k_1 и k_{-1} – константы образования и распада комплекса соответственно.

Квазихимическое описание адсорбции лиганда на ДНК позволяет воспользоваться хорошо разработанным аппаратом формальной химической кинетики. Детальное описание процесса адсорбции лиганда на ДНК можно провести в рамках стохастического описания процесса адсорбции [8]. Для стохастического описания связывания лиганда с ДНК введем функцию $w(x_1, t)$ вероятности того, что на ДНК в момент времени t имеется x_1 молекул лиганда. Учитывая, что число связанного лиганда на ДНК может увеличиться или уменьшиться на единицу, можно записать следующее уравнение, описывающее изменение $w(x_1, t)$ со временем в виде [3,13]

$$\frac{\partial w(x_1, t)}{\partial t} = t^+(x_1 - 1) \cdot w(x_1 - 1, t) + t^-(x_1 + 1) \cdot w(x_1 + 1, t) - (t^+(x_1) + t^-(x_1)) \cdot w(x_1, t), \quad (2)$$

где $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ – вероятности переходов в единицу времени из состояния x_1 в состояние $x_1 + 1$ и из x_1 в $x_1 - 1$ соответственно. Уравнение (2) позволяет вычислить наиболее важные статистические параметры связывания. Умножив обе части уравнения (2) на x_1^k и просуммировав по всем k , можно получить следующее уравнение для моментов $\bar{Y}x_1^k$:

$$\frac{d\bar{x}_1^k}{dt} = \bar{t}^+(x_1)((x_1 + 1)^k - x_1^k) + \bar{t}^-(x_1)((x_1 - 1)^k - x_1^k). \quad (3)$$

Из (3) при $k=1$ получим уравнение для среднего числа лигандов, связанных с ДНК, в виде

$$\frac{d\bar{x}_1}{dt} = \bar{t}^+(x_1) - \bar{t}^-(x_1). \quad (4)$$

Вероятности переходов в единицу времени $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ вычислим на основе результатов работ [12,15,16], в которых приведен подробный вывод $t^+(x_1)$ и $t^-(x_1)$ для различных типов реакций. Основываясь на этих работах, для квазихимической реакции (1) можно записать

$$t^+(x_1) = k_1 c_f (N_1 - (2n_1 - 1)x_1), \quad (5)$$

$$t^-(x_1) = k_{-1} x_1, \quad (6)$$

где c_f – число лигандов в растворе. Подставив (5) и (6) в (4), получим следующее уравнение, описывающее изменение во времени среднего числа лигандов на ДНК при малых заполнениях:

$$\frac{d\bar{x}_1}{dt} = k_1 c_f (N_1 - \bar{x}_1 (2n_1 - 1)) - k_{-1} \bar{x}_1. \quad (7)$$

Принимая, что в начальный момент времени на ДНК нет адсорбированных лигандов, т.е. при условии $x_1(0) = 0$, нетрудно решить уравнение (7). Можно показать, что это решение имеет вид

$$\bar{x}_1(t) = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f} [1 - \exp(-(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)t)], \quad (8)$$

где $K_1 = k_1 / k_{-1}$ – константа равновесия реакции (1). Из (8) можно получить стационарное значение среднего числа связанных с ДНК лигандов, т.е. изотерму адсорбции лигандов с ДНК при малых заполнениях:

$$\bar{x}_1 = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f}. \quad (8a)$$

Аналогичным образом можно показать, что изотерма адсорбции лигандов на кольцевых участках ДНК имеет вид

$$\bar{x}_2 = \frac{K_2 c_f N_2}{1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f}, \quad (9)$$

где $\bar{x}_1$ – среднее число лигандов на кольцевых участках ДНК, n_2 – число мест на кольцевых участках ДНК, с которыми связывается одна молекула лиганда, K_2 – константа равновесия при связывании лиганда с кольцевым участком ДНК. Поскольку адсорбция лигандов на кольцевых и линейных участках ДНК идет независимо, то можно написать $x = x_1 + x_2$ и далее $\bar{x} = \bar{x}_1 + \bar{x}_2$.

Учитывая (8a) и (9), для окончательного выражения среднего числа адсорбированных на ДНК лигандов имеем

$$\overline{x} = \frac{K_1 c_f N_1}{1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f} + \frac{K_2 c_f N_2}{1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f}. \quad (10)$$

Используя уравнение (3), можно вычислить дисперсию числа адсорбированных на ДНК лигандов $\overline{\Delta x^2}$. Поскольку адсорбция лигандов на кольцевую и внекольцевую ДНК идет независимо, то можно написать $\overline{\Delta x^2} = \overline{\Delta x_1^2} + \overline{\Delta x_2^2}$

При вычислении дисперсии $\overline{\Delta x^2}$ будем исходить из ее определения $\overline{\Delta x_1^2} = \overline{x_1^2} - (\overline{x_1})^2$

Подставив $k = 2$ в уравнение (3), нужно определить $\overline{\Delta x_1^2}$, а затем, используя (8), после несложных, но громоздких вычислений можно получить следующее окончательное выражение для нестационарной дисперсии:

$$\begin{aligned} \overline{\Delta x_1^2}(t) = & \frac{K_1 c_f N_1 (1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)k_{-1}t)) + \\ & + \frac{(K_1 c_f)^2 N_1 (2n_1 - 1)}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \cdot (1 - \exp(-2(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)k_{-1}t)) \end{aligned} \quad (11)$$

Из формулы (11), устремив время к бесконечности, получим стационарную дисперсию в виде

$$\overline{\Delta x_1^2}(t) = \frac{K_1 c_f N_1}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} \quad (12)$$

Выражения для нестационарной и стационарной дисперсии при адсорбции на кольцевых ДНК можно получить аналогичным образом. Эти выражения совпадают с (11) и (12) с точностью до замены индекса 1 на индекс 2. Так, стационарная дисперсия при адсорбции на кольцевых ДНК равна

$$\overline{\Delta x_2^2}(t) = \frac{K_2 c_f N_1}{(1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f)^2}. \quad (13)$$

Учитывая (12) и (13), получим следующее окончательное выражение для стационарной дисперсии числа адсорбированных на ДНК лигандов:

$$\overline{\Delta x^2} = \frac{K_1 c_f N_1}{(1 + (2n_1 - 1)K_1 c_f)^2} + \frac{K_2 c_f N_1}{(1 + (2n_2 - 1)K_2 c_f)^2}. \quad (14)$$

Результаты и обсуждение. Рассматриваемая в данной работе адсорбция при малых заполнениях представляет интерес по ряду причин. Хорошо известно, что при анализе экспериментальных данных по адсорбции лигандов на ДНК важным является достижение состояния, когда все места на ДНК полностью заняты лигандами.

Однако в ряде случаев из-за слабого связывания лиганда с ДНК не удается достичь полностью связанного состояния [10,11]. Отметим, что во всех случаях достижение полностью связанного состояния связано с затратами большого количества ДНК. Заметим также, что малые заполнения не только позволяют относительно просто описать процесс адсорбции, но имеют и самостоятельный интерес. В условиях реальной клеточной системы в подавляющем большинстве случаев заполнение лигандами ДНК можно считать малым. Малые заполнения представляют интерес еще и потому, что малое количество лигандов на ДНК при прочих равных условиях слабо возмущает систему, и полученные результаты адекватно описывают систему.

При обработке экспериментальных данных наиболее часто используется изотерма адсорбции. Для анализа полученной нами изотермы адсорбции (10) перепишем ее в виде

$$r = \frac{K_1 c_f (1-p)}{1 + (2n_1 - 1) K_1 c_f} + \frac{K_2 c_f p}{1 + (2n_2 - 1) K_2 c_f}, \quad (10a)$$

$$r = \bar{x} / N, \quad p = N_2 / N$$

где r – число адсорбированных лигандов, приходящееся на одну пару оснований, p – доля от полного числа пар оснований, находящихся в кольцевой ДНК. Рассмотрим, как изменяется вид изотермы адсорбции лигандов при связывании *cis*-DDP с ДНК. Как правило, сопоставление экспериментальных данных с теоретической изотермой проводится в координатах Скэтчарда. Изотерму адсорбции лигандов до связывания *cis*-DDP с ДНК можно получить из (10a), подставив в нее $p = 0$. В координатах Скэтчарда эта изотерма линейна и имеет вид

$$\frac{r}{K_1 c_f} = 1 - \alpha_1 r, \quad \alpha_1 = 2n_1 - 1. \quad (15)$$

Можно показать, что в координатах Скэтчарда изотерма (10a) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{r}{K_1 c_f} = & \frac{1 - \alpha_1 r - \gamma \alpha_2 r + p(\gamma - 1)}{2} + \\ & + \sqrt{\frac{(1 - \alpha_1 r - \gamma \alpha_2 r + p(\gamma - 1))^2}{4} - \gamma r (\alpha_1 \alpha_2 r - \alpha_2 - p(\alpha_1 - \alpha_2))} \end{aligned} \quad (16)$$

$$\alpha_2 = 2n_2 - 1, \quad \gamma = K_2 / K_1$$

Как видно из (16), при появлении кольцевых участков на ДНК изотерма адсорбции в координатах Скэтчарда становится нелинейной. Это обстоятельство продемонстрировано на рис.1. Кривая 1 на рис.1 изображает линейную изотерму (15) и соответствует случаю адсорбции лигандов на чистой ДНК при малых заполнениях, т.е. на ДНК нет молекул *cis*-DDP. Принято, что при связывании лиганда с ДНК лиганд занимает $n_l = 2$ пары оснований.

Кривая 2 отвечает случаю, когда в результате связывания ДНК с *cis*-DDP на ДНК образовались кольцевые участки, адсорбционные свойства которых отличны от адсорбционных свойств чистой ДНК. Доля кольцевых структур на кривой (2) равна $p = 0,1$, число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда, равна $n_2 = 3$, и константа связывания на кольцевом участке на порядок больше, чем на чистой ДНК ($\gamma = 10$). Отметим, что сумма двух линейных изотерм адсорбции в координатах Скэтчарда может привести к нелинейной изотерме [6].

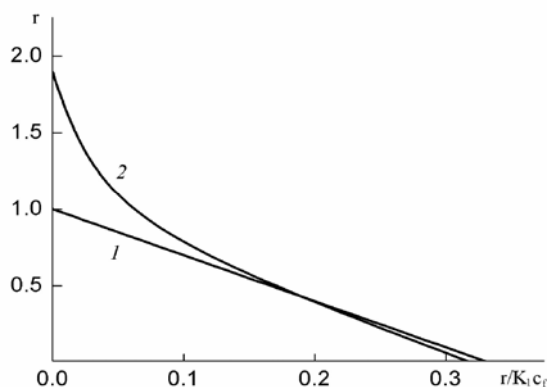


Рис 1. Изотермы адсорбции лиганда на ДНК:

1 – ДНК без *cis*-DDP, 2 – ДНК, содержащая *cis*-DDP. Кривая 1 построена при $n_1 = 2$; кривая 2 – при $n_1 = 2$, $n_2 = 3$, $p = 0.1$, $\gamma = 10$.

При связывании *cis*-DDP с ДНК изменяется также и дисперсия адсорбированных на ДНК лигандов. Это видно из анализа (14) и продемонстрировано на рис.2. Из рис.2 видно, что дисперсия адсорбированных лигандов на чистой ДНК (кривая 1) имеет вид кривой с максимумом. Наличие максимума характерно для зависимости дисперсии от концентрации лигандов [8,9].

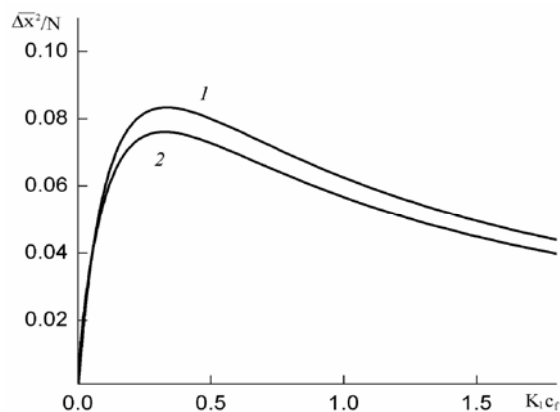


Рис 2. Дисперсия числа адсорбированных на ДНК лигандов:

1 – ДНК без *cis*-DDP, 2 – ДНК, содержащая *cis*-DDP.

Параметры для кривых 1 и 2 те же, что и на рис.1.

При связывании *cis*-DDP с ДНК часть ДНК оказывается в кольцевой структуре с иными адсорбционными свойствами, чем на чистой ДНК. И поскольку мы приняли, что в кольцевой ДНК число пар оснований, с которыми связывается одна молекула лиганда, больше, чем на чистой ДНК, то согласно [9], это должно привести к уменьшению максимума дисперсии и смещению координаты максимума в сторону меньших концентраций лиганда, что и видно на рис.2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян С. Г., Мамасакхлисов Е.Ш., Морозов В.Ф., Далян Е.Б., Хачикян Р.Е., Вардеванян П.О., Карапетян А.Т., Ориоли П., Бруни Б. Биофизика, 42, 2, 372, 1997.
2. Борисова О.Ф., Щелкина А.А., Карапетян А.Т., Суровая А.Н., Мол. биол., 32, 855, 1998.
3. Ван Кампен Н.Г. Стохастические процессы в физике и химии. М., Высш. шк. 1990.
4. Вардеванян П.О., Антонян А.П., Парсаданян М.А., Давтян А.Г., Карапетян А.Т. Биофизика, 48, 4, 644, 2003.
5. Веселков А.Н., Барановский С.Ф., Дымант Л.Н., Петренко Н.В., Веселков Д.А., Такер А., Дэвис Д.Б. Мол. биол., 31, 2, 263, 1997.
6. Кантор Ч., Шиммель П. Биофизическая химия. М., Мир, 1985. т.3.
7. Alonso A., Almendral M.J., Curto Y., Criado J.J., Rodriguez E., Manzano J.L. Anal. Biochem., 355, 157, 2006.
8. Arakelyan V.B., Babayan S.Yu., Tairyan V.I., Arakelyan A.V., Parsadanyan M.A., Vardevanyan P.O. J. Biomol. Str. Dyn., 23, 4, 479, 2006.
9. Arakelyan V.B., Babayan Yu.S., Potikyan G.G. J. Biomol. Str. Dyn., 18, 2, 231, 2000.
10. Babayan Yu.S., Manzini G., Quadrifoglio F. Mol. Biol. (Russian), 22, 898, 1988.
11. Babayan Yu.S., Manzini G., Quadrifoglio F. Nucleic Acids Res., 15, 5803, 1987.
12. Bartholomay A.F. Biochemistry, 1, 223, 1962.
13. Gardiner C.W. Handbook of stochastic methods, Springer, Verlag, Berlin, 1985.
14. Hambley T.W. J. Chem. Soc. Dalton Trans, 2711, 2001.
15. Heyde C.C., Hedy E. J. Theor.Biol., 25,159, 1969.
16. McQuarrie D.A., Keiser J. Theoretical chemistry 9: Advanse and Perspectives. N.-Y., V.6A, 165, 1981.
17. Sundquist W.I., Lippard S.J. Coordin. Chem. Rev., 100, 293, 1990.
18. Vardevanyan P.O., Antonyan A.P., Parsadanyan M.A., Pirumyan K.V., Muradyan A.M., Karapetian A.T. J. Biomol. Str. Dyn., 25, 6, 641, 2008.

Поступила 10.07. 2008



Биол. журн. Армении, 1-2 (60), 2008

УДК 574.669.21

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БОЛОТНОЙ ЧЕРЕПАХИ *EMYS ORBICULARIS* В ДОЛИНЕ РЕКИ АРАКС

М.С. АРАКЕЛЯН, Ф. Д. ДАНИЕЛЯН, Н. ГАЗАВЕЙ

Ереванский государственный университет, кафедра зоологии

Уникальные находки болотной черепахи *Emys orbicularis* в долине реки Аракс зарегистрированы в 2004-2008 гг.. Проникновение этого вида в долину реки Аракс возможно от места слияния с водами реки Куры и далее с побережья Каспийского моря. Подвидовая принадлежность ее остается спорной. Морфологически эти черепахи близки к *E. o. iberica*.

Ճահճային կրիան *Emys orbicularis* հայտնաբերվել է Արաքս գետի հովտում, 2004-2008 թվ.: Այս տեսակի թափանցումը Արաքսի հովիտ հնարավոր է Կուր և Արաքս գետերի միախառնման տեղից մինչև Կասպից ծովի մերձափնյա շրջաններ՝ Արաքսի հոսանքի միջոցով: Ճահճային կրիայի ենթատեսակային պատկանելությունը մնում է վիճելի, սակայն ըստ ձևաբանական հատկանիշների և կենդանաաշխարհագրական վերլուծության այն կարող է պատկանել *E. o. iberica* ենթատեսակին:

A unique finds of poud turtle *Emys. orbicularis* have been revealed in 2004-2008 from Valley of Araks River. The penetration of this species to Valley of Araks River is possible through place of junction with flow of Kura River and from coast of Caspian Sea. The subspecies position of *E. orbicularis* is staying questionable, however according to morphological features and zoogeographical analysis they can belong to *E. o. iberica*.

Emys orbicularis – распространение

На территории Армении встречаются два вида пресноводных черепах: болотная черепаха *Emys orbicularis* (Emydidae) и каспийская черепаха *Mauremys caspica* (Geoemydidae). Болотная черепаха занесена в Красную Книгу Армении (1987) как редкий и узкоареальный вид. В Армении *E. orbicularis* встречается крайне редко, в отличие от широко распространенного на севере и юге Армении каспийской черепахи.

Отличительным внешним признаком болотной черепахи являются желтые пятна на шее, лапах и карапаксе, в то время как у каспийской черепахи на голове, шее и лапах имеются продольные желтые полосы, вырезка на задней части пластрона и отсутствует подвижность пластрона.

Единичные достоверные находки болотной черепахи на севере Армении были отмечены Далем [8] в пойме реки Агстев (бассейн р. Куры) выше Иджевана и Даревским [9] в р. Джогас, притоке р. Агстев.

Повторные встречи с особями этого вида из северной популяции были зарегистрированы нами в 1999 и 2000 гг.

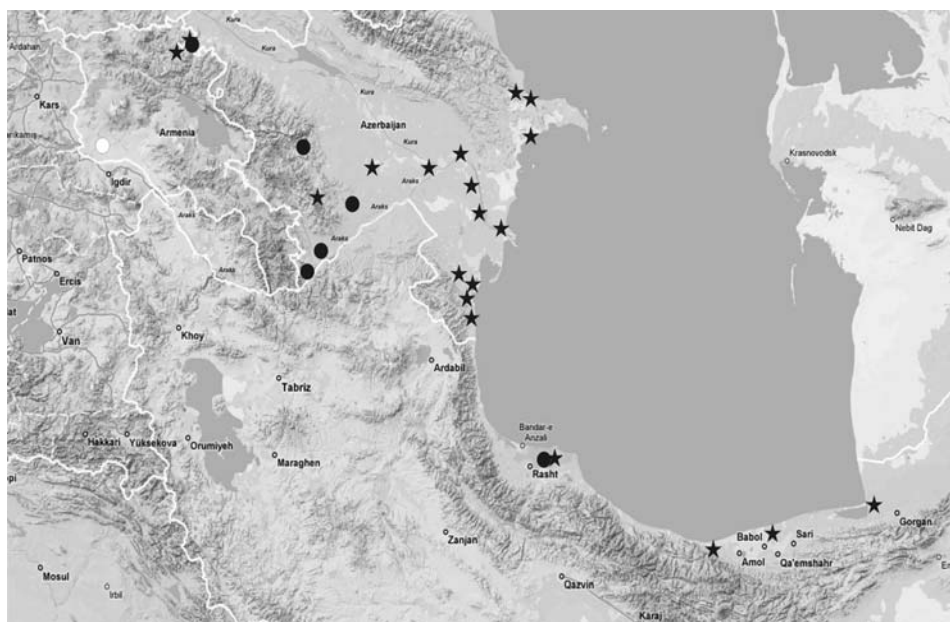
Для территории Армении болотная черепаха впервые была указана Ляйстером [5], который приводит ее для р. Раздан (Занга) в окр. Еревана и р. Аракс в окр. г. Ордубад. По данным Бобринского [4] и паразитологической экспедиции Скрябина [10], в долине Аракс встречается болотная черепаха. В 1970 году была сделана уникальная находка болотной черепахи в Арартской долине, недалеко от р. Сев Джур, являющейся притоком р. Аракс [1], однако до сегодняшнего дня повторных находок не отмечено. Позднее о возможном существовании популяции болотной черепахи в долине реки Аракс мы узнали из устного сообщения Агасяна А. В 2004 г. нами была предпринята экспедиция вдоль берега р. Аракс, где была отловлена одна особь этого вида в Кашатахском районе Нагорно-Карабахской Республики (НКР). Судя по сообщениям местного населения, территория распространения болотной черепахи не ограничена местом находки (канал р. Аракс), а охватывает более широкий район вдоль берега р. Аракс. Наше предположение о более широком распространении этого вида подтвердилось в 2008 г., когда была обнаружена еще одна особь болотной черепахи в 7 км от границы Армении и НКР на берегу р. Аракс.

Болотная черепаха на севере Армении населяет небольшие каналы и заболоченные участки в пойме реки Агстев [8]. В юго-западном Азербайджане у границы Армении болотная черепаха и каспийская черепаха обитают в оросительных каналах и небольших болотцах [9]. Эти черепахи также были найдены в заболоченном канале на юге Армении, в долине р. Аракс.

По нашим данным, основным ограничивающим фактором распространения болотной черепахи на территории Армении является высота их обитания до 1000 м над ур. м.. Согласно Далю [8], этот вид отмечен на высоте до 960 м над ур.м.. Алекперов [2] указывает максимальную высоту распространения этого вида до 900 м над ур. м.

Необходимо отметить, что распространению болотной черепахи с севера Армении на юг препятствуют горные хребты. Проникновение этого вида в долину реки Аракс можно объяснить, если рассмотреть распространение вида в сопредельных странах (рис. 1).

Ареал болотной черепахи охватывает территорию от Южной и Центральной Европы, Передней Азии и Северно-Западной Африки до западного Туркменистана и западного Казахстана на востоке [3]. На территории НКР, по данным Алекперова [2], болотная черепаха отмечена в окрестностях гг. Агдама и Шуши.



Условные обозначения:

- - по наблюдениям в природе
- ★ - по литературным данным

Рис. 1. Распространение болотной черепахи в долине реки Аракс и в сопредельных районах.

Во время предпринятых нами экспедиций на территории НКР были обнаружены новые популяции в окрестности с. Амарас (Мартунинский район) и на берегу р. Тартар в Шаумяновском районе [11]. В Азербайджане черепаха распространена весьма широко и встречается почти во всех пресноводных водоемах, за исключением высокогорных районов [2]. Особенно многочисленны черепахи на берегу Каспийского моря. Алекперов также указал этот вид в Аракс-Куринской низменности [2]. Особый интерес представляет находка этого вида вблизи слияния р. Аракс и Куры. На территории Ирана болотная черепаха отмечена только вдоль берега Каспийского моря. Согласно литературным источникам [14,15] и собственным исследованиям, данный вид отмечен в западной части р-на Гилян, близи г. Рашд, в р-ах Мазандаран, Голестан вдоль южного и юго-восточного побережья Каспийского моря. Следовательно, единственно возможным путем проникновения болотной черепахи в долины рек Аракс и Кура является продвижение этого вида с побережья Каспийского моря до слияния этих рек и далее по долинам до подножья горных хребтов.

Наши данные о распространении болотной черепахи согласуются с предложенной Фрицем [4] схемой распространения генетических линий, основанной на результатах секвенирования митохондриальной ДНК. Черепахи из Аракс-Куринской низменности и побережья Каспийского моря Азербайджана и Ирана относятся к одной генетической линии. В целом вид имеет сложную структуру.

В настоящее время выделяют 13 подвигов болотной черепахи, объединяемых в 5 групп. По данным Фрица, болотные черепахи, обитающие на севере Армении, относятся к подвиду *Emys orbicularis iberica* Eichwald, 1831 (= *E. o. kurae*) [14]. Найденные нами особи на юге (бассейн р. Аракс) практически не отличаются от обитающих на севере черепах (бассейн р. Кура) и, возможно, также относятся к подвиду *E. o. iberica*. Окраска карапакса, пластрона, шеи и зрачков отловленных нами в долине р. Аракс черепах очень схожа с таковыми у *E. o. iberica*. Определение подвиговой принадлежности болотных черепах Армении и НКР вообще проблематично, т.к. в долине реки Кура проходит зона вторичной интеграции *E. o. orbicularis* и *E. o. iberica*. Так, морфологические признаки (в частности, оранжевый зрачок) болотной черепахи, отловленной в окрестностях монастыря Амарас (Мартунинский район НКР), указывают на принадлежность ее к номинативному подвиду. Согласно морфометрическим данным Чихквадзе [7], на сопредельной территории Грузии обитают как минимум 2 подвида болотной черепахи: *E. o. orbicularis* и *E. o. ssp.* Более того, в восточной Грузии в бассейне р. Куры *E. o. orbicularis* представлены двумя генетическими линиями (I и VII) [14]. Также возможно нахождение на территории НКР особей болотной черепахи с признаками *E. o. persica* Eichwald, 1831 (= *E. o. orientalis* Fritz, 1994), обитающей на побережье Каспийского моря в Иране и западной Туркмении. Таким образом, уточнение таксономического положения болотной черепахи в Армении, НКР и Иране требует проведения дополнительных морфологических и генетических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Պանիբեյան Ֆ.Դ. Հայաստանի երկկենցաղների և սողունների որոշիչ, Երևան 176 էջ, 1971.
2. Алекперов А.М. Амфибии и рептилии Азербайджана. Баку, Изд-во Эльм, 264 стр., 1978.
3. Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г., Даревский И.С., Рябов С.А., Барабанов А.В. Атлас пресмыкающихся Северной Евразии. Зоологический институт, Санкт-Петербург, 232 стр., 2004.
4. Бобринский Н.А. Результаты орнитологических экскурсий в Сурмалинский и Эчмиадзинский уезды Эревунинской губернии летом 1911 и 1912 гг. Издательство Кавказского музея. 8(3):171-250, 1915.
5. Ляйстер А.Ф. Фауна Эревунинской губернии. Заметки Эревунинской губернии за 1912., 1912.
6. Чернов С.А. Герпетофауна Армянской ССР и Нахичеванской АССР. Зоологический сборник Армянского филиала Арм.ССР 1: 79-194., 1939.
7. Чихквадзе В.М. Мат-лы региональной научной конференции, посвященной 60-летию Института зоологии НАН РА 7-8 октября, Ереван: 169-170., 2003.

8. *Даль С.К.* Фауна Армянской ССР. V1. Ереван: Академия наук Армянской ССР, 415 стр., 1954.
9. *Даревский И.С.* Автореф. канд. дисс., Ереван., 1957.
10. *Скрябин К.И.* Трематоды. Труды Тропического института Арм. СССР 1: 34-40., 1924.
11. *Arakelyan M., Corti C., Sindaco R.* The discovery of new populations of in Nagorno-Karabakh Republic (Artsakh). 5 th Annual Symposium on Conservation and Biology of Tortoises and Fresh-water Turtles 25-29 July 2007 Atlanta, Georgia, 2007.
12. *Fritz, U.* Zur innerartlichen Variabilität von *Emys orbicularis* (Linneus, 1758). 4. Variabilität und Zoogeographie im pontoscaspischen Gebiet mit Beschreibung von drei neuen Unterarten (Reptilia: Testudines: Emydidae). Faunistische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde. Dresden 48 (4): 53-93, 1994.
13. *Fritz, U.* Introduction to zoogeography and subspecific differentiation in *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758). *Mertensiella* (10): 1-27, 1998.
14. *Fritz U., Guicking D., Kami H, Arakelyan M., Auer M, Ayaz D., Fernandez C A., Bakiev A G, Celani A, Džuki G, Fahd S, Havaš P, Joger U, Khabibullin V F, Mazanaeva L F., Široky P, Tripep S, Velez A.V, Anton G V, Wink M.* Mitochondrial phylogeography of European pond turtles (*Emys orbicularis*, *Emys trinacris*) – an update. *Amphibia-Reptilia* 28: 418-426, 2007.
15. *Hojjati V., Kammi H.G., Pashaii Rad SH.* An introduction to the biology of the European pond turtle , *Emys orbicularis* in Golestan and Mazandaran provinces of Iran. *Pajouhesh and Sazandegi* (64): 90-97, 2004.

Поступила 13.06.08



Համառոտ հաղորդագրումներ • Краткие сообщения • Short communications

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1-2 (60), 2008

ՀՏԴ 579.64:631.46

**ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐԻ ԵՎ ՆՐԱՆՑ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ
ՊԵԿՏԻՆԻ ՅՈՒՐԱՑՄԱՆ ՈՒ ԱԶՈՏԻ ՖԻՔՍՄԱՆ
ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ**

Վ. Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, Արմավան

The problems relevant to the usage of pectin and nitrogen-fixing activity by diazotrophs' communities are studied.

Դիազոտրոֆներ - համակեցություն - ազոտֆիքսացիա - պեկտին

Ազոտի կենսաբանական ֆիքսացիայի ռացիոնալ օգտագործման նպատակով վերջին տարիներին առանձնապես խորությամբ են ուսումնասիրվում պալարագոյացման հնարավորությունները այն բույսերի մոտ, որոնք բնական պայմաններում ունակ չեն այն իրականացնել: Ներկայումս գրականությունից հայտնի են մի շարք արժեքավոր տվյալներ, որոնք հաստատում են պալարաբակտերիաների պեկտինոլիտիկ ակտիվության կարևորությունը թիթեոնածաղկավոր բույսերի հետ նրանց էֆեկտիվ սիմբիոզի ձևավորման գործում (1, 4): Պատահական չէ, որ ոչ թիթեոնածաղկատու բույսերի արմատների վրա պալարանման գոյացումներ մի շարք հեղինակների հաջողվել է ստանալ պեկտինոլիտիկ մեծ ակտիվությամբ օժտված *Arthrobacter sp.*-ի ու ազատ ապրող ազոտֆիքսատորների խառը կուլտուրայի համատեղ օգտագործման միջոցով (2):

Ներկայացված նախադրյալներից ելնելով, մեզ հետաքրքրել է պարզել արդյո՞ք հացազգի և այլ բույսերի արմատային գոնայում զարգացող դիազոտրոֆներ պարունակող ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունները (ԱՄՀ) և նրանց առանձին կոմպոնենտներն օժտված են պեկտինը որպես ածխածինի միակ աղբյուր օգտագործելու հատկությամբ: Առանձնապես կարևոր էր բացահայտել նաև ԱՄՀ-ների և առանձին դիազոտրոֆների ազոտի ֆիքսման ակտիվության փոփոխությունները պեկտինի օգտագործման պայմաններում: Սույն հաղորդմամբ ներկայացված է այդ ուղղությամբ մեր կատարած հետազոտությունների արդյունքները:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունների նյութ է հանդիսացել հանրապետության տարբեր հողերից, ջրերից, հացազգի ու այլ բույսերի արմատային գոնայից նախկինում մեր կողմից մեկուսացված 225 ԱՄՀ-ները, այնտեղ զարգացող դիազոտրոֆներն ու նրանց ուղեկցող այլ մանրէները:

Փորձերի ընթացքում համեմատության համար օգտագործել ենք նաև Հայաստանի Մանրէների Ավանդադրման Հանրապետական կենտրոնում (ՌՑԴՄ) պահպանվող *Azotobacter chroococcum* B-6111 շտամը:

ԱՄՀ-ների, դիագնոտրոֆների և առանձին մանրէների պեկտինի օգտագործման ունակության որոշման համար փորձարկել ենք Էշբիի ազարային սննդամիջավայրը, որտեղ սախարոզը փոխարինվել է 1 (-անոց պեկտինով: Որպես ստուգիչ օգտագործվել է 1(սախարոզ պարունակող Էշբիի սննդամիջավայրը: Ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը Վինոգրադսկու հեղուկ սննդամիջավայրում (3(որոշել ենք ացետիլենային եղանակով (6(Այդ նպատակով 15 մլ տարողության 3 մլ սննդամիջավայր պարունակող պենիցիլինի սրվակները վարակել ենք տարբեր համակեցություններով կամ առանձին մանրէներով և 27(-ում զարգացման ընթացքում պարբերաբար որոշել նիտրոգենազային ակտիվությունը: Որպես ստուգիչներ օգտագործել ենք՝ ծորակի ջուր (1(պեկտին, Վինոգրադսկու սննդամիջավայրն առանց սախարոզի և 1(սախարոզ պարունակող Վինոգրադսկու սննդամիջավայրը:

Արդյունքներ և քննարկում: Ինչպես ցույց են տալիս աղ. 1-ում բերված տվյալները փորձարկված դիագնոտրոֆների մաքուր կուլտուրաների մոտ կեսի աճի ինտենսիվությունը պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում նվազել է, իսկ դիագնոտրոֆներին ուղեկցող մանրէների դեպքում, ճիշտ հակառակը՝ նույն չափով ավելացել: Այդ է պատճառը, որ ԱՄՀ-ների տարբերակում, որտեղ առկա են պեկտինը յուրացնող դիագնոտրոֆներին ուղեկցող մի շարք բակտերիաներ, փորձարկված համակեցություններից միայն 33(-ի մոտ է նկատվել աճի ինտենսիվության նվազում: Հավանաբար, պետք է հետևեցնել, որ պեկտինի յուրացման հատկությամբ օժտված տարբեր ցեղերի ու տեսակների պատկանող դիագնոտրոֆներին ուղեկցող բակտերիաները բնական բիոցենոզներում զգալիորեն նպաստում են ԱՄՀ-ներում զարգացող դիագնոտրոֆների ածխածինային սննդառությանը: Առանձնապես կարևոր է նշել, որ ուսումնասիրված ԱՄՀ-ների և դիագնոտրոֆներին ուղեկցող մանրէների մեծ մասը, ինչպես նաև որոշ դիագնոտրոֆներ, պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում 3-5 վերացանքներից հետո պահպանել են իրենց նորմալ աճն ու զարգացումը:

Աղյուսակ 1. Տարբեր կուլտուրաների և ԱՄՀ-ների թիվը 1(պեկտին պարունակող Էշբիի ազարային սննդամիջավայրում զարգանալիս

ԱՄՀ-ներ, կուլտուրաներ	Փորձարկված ԱՄՀ-ների և կուլտու- րաների թիվը	Աճի ինտենսիվությունը 1(պեկտին պարունակող Էշբիի սննդամիջավայրի համեմատ		
		նվազել է	պահպանվել է	ավելացել է
ԱՄՀ-ներ	48	16	21	11
Դիագնոտրոֆներ	63	30	25	8
Դիագնոտրոֆներին ուղեկցող մանրէներ	114	17	39	58

Աղյուսակ 2. Դիագնոստիկայի և նրանց համակեցությունների
նիտրոգենազային ակտիվությունը տարբեր սննդամիջավայրերում
(ն մոլ C₂ H₂ 7 օրում)

ԱՄՀ-ներ, կուլտուրաներ	Տարբերակներ			
	ս տ ու գ ի չ			Վինոգրադսկի, պեկտինը 1(
	Ծորակի ջուր, պեկտինը 1(	Վինոգրադսկի, առանց շաքար	Վինոգրադսկի, շաքարը 1(	
ԱՄՀ A 65	0	200	7000	7000
A 65, <i>A. chroococ-</i> <i>cum</i> (Յ -1)	0	50	8000	8000
ԱՄՀ A66	40	50	10000	7000
A 66, <i>A. armeniacus</i> (Az 2)	0	35	8200	3600
A 66, <i>Bacillus sp.</i>	40	0	1200	350
ԱՄՀ U-97-32	0	300	8000	10000
U-97-32, <i>A. chroococcum</i> (ն -1)	0	0	5000	6000
U-97-32, <i>Clostridium sp.</i>	0	0	8000	6000
A 42, <i>A. armeniacus</i> (Az-5)	0	0	2200	2000
A 42, <i>Bacillus sp.</i>	0	0	1250	120
A 42, <i>Klebsiella sp.</i>	0	35	1200	20
<i>Klebsiella sp.</i> 56 ¹	0	0	4000	2000
<i>Flvobacterium sp.</i> (A51-5-1)	0	30	300	0
<i>Agrobacterium</i> <i>radiobacter</i> (A 51-5-2)	0	0	500	0
<i>Bacillus sp.</i> A-7	20	0	5000	4500
<i>A. chroococcum</i> B- 6111	0	50	5000	5000

Հետագա ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ փորձարկված դիագնոստիկներն ու նրանց համակեցությունները նիտրոգենազային մեծ ակտիվություն են ցուցաբերել նաև պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում (աղ. 2): Առանձնապես ուշագրավ է, որ ինչպես U-97-32 համակեցության և այնտեղ զարգացող *A. chroococcum*-ի, այնպես էլ *A. chroococcum* B- 6111-ի նիտրոգենազային ակտիվությունը պեկտին պարունակող միջավայրում ավելի մեծ է, քան սախարոզ պարունակող սննդամիջավայրում:

Չնայած բերվածի բացառությամբ *Bacillus sp. A-7*-ի, փորձարկված մնացած ԱՄՀ-ներում զարգացող ազոտֆիքսող բացիլների նիտրոգենազային ակտիվությունը պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում ավելի ցածր է, քան սախարոզի առկայության դեպքում:

Պետք է նշել, որ ստացված տվյալները մասամբ տարբերվել են գրականությանից հայտնի այն տվյալներից (3), որտեղ ցույց է տրված պեկտինոլիտիկ ակտիվությամբ և բույսերի արմատների վրա գաղութառաջացման հատկությամբ օժտված միայն *Bacillus* ցեղի բակտերիաները, իսկ *Azotobacter*-ի մոտ թե՛ մեկը և թե՛ մյուսը չի հայտնաբերվել:

Մեր կարծիքով այդ երևույթը, հավանաբար, պետք է վերագրել դիագնոտրոֆների տեսակային առանձնահատկություններին:

Այսպիսով, հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ փորձարկված դիագնոտրոֆների և նրանց համակեցությունների մեծ մասը ունակ են զարգանալու պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում, բազմակի վերացանքներից հետո պահպանում են իրենց այդ հատկությունը և, ամենակարևորը, պեկտին պարունակող սննդամիջավայրում ցուցաբերում են նիտրոգենազային մեծ ակտիվություն, պետք է հետևեցնել, որ նրանք իրոք օժտված են պեկտինոլիտիկ ակտիվությամբ:

Հավանաբար, պետք է ենթադրել նաև, որ բույսերի արմատային զոնայից մեկուսացված ասոցիատիվ դիագնոտրոֆների համակեցությունների պեկտինի օգտագործման հատկությունը կարևոր նշանակություն կարող է ունենալ բույսերի արմատների վրա նրանց գաղութառաջացման ու ադգեզիայի պրոցեսներում, ստեղծելով պալարառաջացման պոտենցիալ հնարավորություն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Антипчук А. Ф., Андреюк Е. И. Микробиол. ж. 59, 3, 59- 65, 1997
2. Глаголева О.Б., Лобакова Е.С., Ковальская Н.Ю., Корженевская Т. Г., Умаров М. М. Докл. АН, 362, 2, 283-285, 1998.
3. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 27, 10, 886- 888, 1984.
4. Скочинская Н.Н., Айзенберг В.Л., Антипчук А.Ф., Танцюренко Е.В. Микробиол. журн. 52, 1, 22-23, 1990.
5. Forlani G., Pastorolli R., Branzoni M., Favilli F. J. Genet. and Breed, 49, 4, 343-352, 1995.
6. Hardy R.W., Holsten R D., Jochson E K., Burns R C. Plant Physiol. 43, 1185-1207, 1968.

Ստացվել է 25.03.2008