

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

2009

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 ԽՈՐՀՈՒԴԴ

Յու.Թ. Ալեքսանյան, Մ.Ս. 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, Դ.Ա. Գеворкян,
Տ.Խ. Майрапетян, Լ.Ր. Манвелян, Ր.Օ. Оганесян, Ա.Ա. 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, Դ.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 •

Պարոնյան Ա.Խ., Գասպարյան Ա.Վ. Ֆոտոսինթետիկ բակտերիաների կենսազանգվածի ստացումը անասնապահական և թռչնաբուծական թափոնների հիման վրա.....	5
Սավիլով Պ.Ն. Լյարդի ռեզեկցիայի և հիպերբարիկ օքսիգենացիայի ազդեցությունը նեյտրոֆիլներով <i>E.coli</i> -ի ֆագոցիտոզի վրա	11
Նաղդսյան Ս.Զ., Քոչարյան Ե.Ս., Վարդանյան Ն.Ս. Քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների համակեցության առանձնահատկությունները պղնձի խտանյութի տարալվացման ընթացքում.....	18
Սարգսյան Ս.Յ. Սիայնակ խրճի կորիզի նեյրոնների ելակետային ազդակային ակտիվության փոփոխությունները թրթռումից հետո.....	24
Սեֆերյան Թ.Ե. Էլեկտրաինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը մոդելային և բնական թաղանթների լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վրա	34
Հարությունյան Ն.Ս., Ավետիսյան Ն.Ս., Մանուկյան Կ.Լ. Մաքուր զարգացման մեխանիզմը (ՄՁՄ) որպես Հայաստանում կայուն զարգացմանը նպաստող հնարավոր գործոն	40
Հովհաննիսյան Լ.Պ., Սկրտչյան Գ.Ս, Սուքիասյան Ս.Գ., Համբարձումյան Ս.Բ., Ավետիսյան Գ.Վ., Բոյաջյան Ա.Ս. Կոմպլեքսները որպես հետվնասվածքային սթրեսի պաթոգեն գործոն.....	48
Խաչատրյան Դ.Է. Ագրոֆիզիկական մեթոդների կիրառման ազդեցությունը տեխնածին աղտոտված հողերի կենսաբանական ակտիվության վրա	54
Սարգսյան Խ.Լ. Տարբեր սննդարար լուծույթների և լցանյութերի ազդեցությունը <i>Colchicum szovitsii</i> Fisch. –ի աճման արդյունավետության վրա.....	59

• Համառոտ հաղորդումներ •

Նանադուլյան Ս.Գ., Մարգարյան Գ.Գ. Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության ժանգասների խմբավորումն ըստ տեր-բույսերի.....	65
Միրզոյան Վ.Ս., Աճեմյան Լ.Յ., Կարապետյան Տ.Դ., Հանիսյան Ռ.Ս. Մոսպիլան ինսեկտիցիդի մնացորդների որոշման նոր մեթոդ նրբաշերտ քրոմատագրության եղանակով.....	69
Նիկողոսյան Վ.Գ., Բաղդասարյան Ի.Բ. Դիագնոստիկներ պարունակող համակեցություններում ֆոսֆորի միացությունները փոխակերպող միկրոօրգանիզմների առկայության մասին.....	72
Եղիազարյան Է.Ս. Հայաստանի երկկենցաղների զուգավորման ծայների բնութագրումը.....	75

Կանոններ հեղինակների համար.....	78
---------------------------------	----

Биолог. журн. Армении, 1 (61), 2009

СОДЕРЖАНИЕ

• Экспериментальные и теоретические статьи •

Паронян А.Х., Гаспарян А.В. Получение биомассы фотосинтетических бактерий на основе животноводческих и птицеводческих отходов.....	5
Савилов П.Н. Влияние резекции печени и гипербарической оксигенации на фагоцитоз нейтрофилами <i>E. coli</i>	11
Нагдалян С.З., Кочарян Е.М., Варданян Н.С. Особенности сообщества хемолитотрофных бактерий при выщелачивании медного концентрата	18
Саркисян С.Г. Поствибрационные изменения фоновой активности нейронов ядра солитарного тракта	24
Сеферян Т.Е. Влияние электроиндуцированных свободных радикалов на перекисное окисление липидов модельных и нативных мембран.. ..	34
Арутюнян Н.С., Аветисян Н.С., Манукян К.Л. Механизм чистого развития (МЧР) как потенциальный фактор, способствующий	

устойчивому развитию Армении.....	40
<i>Оганесян Л.П., Мкртчян Г.М., Сукиасян С.Г., Амбарцумян М.К.,</i> <i>Аветисян Г.В., Бояджян А.С.</i> Комплемент как патогенный фактор при посттравматическом стрессе	48
<i>Хачатрян Г.Э.</i> Влияние применения агрофизических методов на биологическую активность техногенно загрязненных почв.....	54
<i>Саргсян Х.Л.</i> Влияние различных наполнителей и питательных растворов на продуктивность <i>Colchicum szovitsii</i> Fisch. в условиях открытой гидропоники	59

• *Краткие сообщения* •

<i>Найагюлян С.Г., Маргарян Г.Г.</i> Распределение ржавчинных грибов Нагорно-Карабахской Республики по растениям-хозяевам.....	65
<i>Мирзоян В.С., Аджемян Л.А., Карапетян Т.Д., Анисян Р.М.</i> Новый метод определения остаточных количеств инсектицида моспилан с помощью тонкослойной хроматографии.....	69
<i>Никогосян В.Г., Багдасарян И.Б.</i> О наличии микроорганизмов, преобразующих соединения фосфора в диязотрофсодержащих сообществах.....	72
<i>Егизарян Э.М.</i> Биоакустическая характеристика амфибий Армении.....	75
<i>Правила для авторов</i>	79

Biolog. Journ. Armenia, 1 (61), 2009

CONTENTS

• *Experimental and Theoretical articles* •

<i>Paronyan A.Kh., Gasparyan A.V.</i> Production of biomass of photosynthetic bacteria on base of stock-breeding and poultry wastes.....	5
<i>Savilov P.N.</i> Impact on liver resection and hyperbaric oxygenation on the phagocytosis of E.coli by neutrophils	11
<i>Naghdalyan S.Z., Kocharyan Y. M., Vardanyan N.S.</i> Properties of consortium of chemolithotrophic bacteria during of bioleaching of copper concentrate.....	18
<i>Sargsyan S.H.</i> The postvibration changes of background impuls activity of the nucleus tractus solitarius neuronal activity.....	24
<i>Seferyan T.Ye.</i> Influence of electro induced free radicals on lipid peroxidation in model and native lipid membranes.....	34
<i>Harutyunyan N.S., Aветисян N.S., Manukyan K.L.</i> Clean Development Mechanism (CDM) potential for promoting Sustainable Development in Armenia.....	40
<i>Hovhannisyan L.P., Mkrтчян G.M., Sukiasyan S.G., Hambardzumyan M.Q.</i> <i>Aветисян G.V., Boyadjyan A.S.</i> Complement as a pathogenic factor in posttraumatic stress.....	48
<i>Khachatryan H.E.</i> The influence of using agrophysical methods on the biological activity of a technogen-polluted soil	54
<i>Sargsyan Kh.L.</i> Efficiency of various nutrient solutions and substrates on productivity of <i>Colchicum szovitsii</i> Fisch. under open-air hydroponics conditions.....	59

• *Short communications* •

<i>Nanagulyan S.G., Margaryan G.G.</i> Distribution of the rust fungi of the Nagorno-Karabakh Republic on plants-hosts.....	65
<i>Mirzoyan V.S., Ajemyan L.H., Karapetyan T.D., Hanisyan R.M.</i> New method of insecticide mospilan residues determination by thin layer chromatography.....	69
<i>Nikogosyan V.G., Baghdasaryan I.B.</i> About the presence of microorganisms transforming the phosphorus compounds in the nitrogen-fixing communities.....	72
<i>Yeghiazaryan E.M.</i> The bioacoustic characteristics of Armenian Amphibians	75
<i>Guide to authors</i>	80



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Biol. Journal of Armenia, 1 (61), 2009

PRODUCTION OF BIOMASS OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIA ON BASE OF STOCK-BREEDING AND POULTRY WASTES

A.Kh. PARONYAN, A.V. GASPARYAN

*Centre of Microbiology and Microbial Depository (CMMD),
NAS of Armenia, Abovyan city*

On base of stock-breeding and poultry wastes the cheap nutrient media for cultivation and production of biomass of phototrophic bacteria have been developed. Cultivation of purple nonsulfur bacteria *Rhodobacter sphaeroides* together with *Bacillus megaterium* in mixed culture has been succeeded in high biomass yield. The obtained biomass was distinguished with rich contents of biologically active substances.

Photosynthetic bacteria – biomass – mixed culture

Անասնապահական և թռչնաբուծական թափոնների հիման վրա մշակվել են էժան սննդամիջավայրեր ֆոտոտրոֆ բակտերիաների աճեցման և կենսազանգվածի ստացման համար: Կիրառելով խառը կուլտուրաների՝ *Rhodobacter sphaeroides* ոչ ծծմբային ծիրանագույն բակտերիաների և *Bacillus megaterium* ի համատեղ աճեցումը, հաջողվել է զգալի բարձրացնել կենսազանգվածի ելքը: Ստացված կենսազանգվածը առանձնանում է կենսաբանական ակտիվ միացությունների հարուստ պարունակությամբ:

Ֆոտոսինթետիկ բակտերիաներ □ կենսազանգված □ խառը կուլտուրա

Разработаны дешевые питательные среды на основе животноводческих и птицеводческих отходов для выращивания и получения биомассы фототрофных бактерий. С использованием смешанного культивирования несерных пурпурных бактерий *Rhodobacter sphaeroides* и *Bacillus megaterium* удалось заметно увеличить выход биомассы. Полученная биомасса отличается богатым содержанием биологически активных соединений.

Фотосинтетические бактерии – биомасса – смешанная культура

The abilities of photosynthetic bacteria to assimilate carbon dioxide, to fix molecular nitrogen possessing with photosynthetic metabolism, as well as to grow on different wastes permit to use phototrophs in biotechnology [7,11]. The phototrophic bacteria are effective producers of biologically active substances, such as carotinoides, organic acids, moreover the biomass of phototrophs contains valuable substances and has practical importance as feed protein [2, 10].

Application of phototrophs in Armenia has high perspectives since this group of microorganisms are widely distributed, especially, in mineral springs, lakes, natural reservoirs, and can be grown from early spring till late autumn [6]. The literature data on cultivation and production of biomass of phototrophic bacteria on different agricultural wastes as nutrient media are less known.

The present work reports the results of investigation on production of biomass of phototrophic bacteria using as nutrient media the agricultural wastes such as stock-breeding manure and poultry dung.

Materials and methods. The strains of purple nonsulfur photosynthetic bacteria *Rhodobacter sphaeroides* sp.D-8 and *Rhodobacter sphaeroides* sp. A-10 isolated from mineral springs of Jermuk and Arzni as well as strain *Bacillus megaterium* INMIA B-1502 have been studied. All strains of bacteria were deposited in Culture Collection of the Centre of Microbiology and Microbial Depository (CMMD), NAS of Armenia.

Strains of phototrophic bacteria were grown on Ormerud's medium [9]. The strain of *Bacillus megaterium* was grown on a medium containing fish hydrolysate [1].

The agricultural wastes such as stock-breeding manure and poultry dung were periodically taken from stock-breeding and poultry farms of Abovyan region. The wastes were dried at 60° for 15 days until containing 30 % of humidity in manure and 20% of humidity in dung. The 100 g dry matter samples after grinding were dissolved in one litre of tap water and were kept under room conditions periodically stirring for 4-6 hours. After filtration the extracts obtained were used as a base of nutrient media for cultivation of phototrophs. The initial pH was nearly 6.5-6.9. The chemical analysis of extracts showed that they contain ions of HCO_3^- - 1321.0-1858. 5 mg/l, carbohydrates (glucose, sucrose) - 0.08-0.86 %, salts of organic acids which could satisfy the growth requirements of purple nonsulfur bacteria.

The phototrophs were grown at 30-32° with 2500–3000 lux illuminating and under different conditions of aeration. The inoculum was added in amount of 5 % (v/v) in the nutrient media. The growth of cultures was monitored spectrophotometrically determining the optical density of cell suspension at wave length 660 nm and by determining the dry weight of bacterial biomass. Microscopic control was performed using microscope MBB-1A and a KF-4 phase contrast device. Absorption spectra of whole cells were measured on “Specord” UV-Vis spectrophotometer. The phototrophs were grown for 5-8 days until the considerable decrease of growth. The content of wet protein was determined by nitrogen method. The amino acids composition was determined on amino acid analyzer AAA-339. The vitamins were determined by Odincova's method [8], vitamin B₁₂ – by Kuceva's method [5]. Three-day-old cultures of phototrophic bacteria grown anaerobically under 2500-3000 lux illumination and one-day-old culture of *B. megaterium* grown on a flask-shaker were used as an inoculum for mixed cultivation with optimal combination 2:1 (v/v) of phototrophic and heterotrophic cultures.

Statistical analysis was based on data from experiments of ten replicates.

Results and discussion. The yield of biomass is few on clean extracts. It is explained by the high contents of calcium salts in extracts which affects on penetration of light increasing the optical density of the media. Good results of the growth were mentioned when the extracts were diluted with tap water in ratio 1:1(v/v). The accumulation of biomass in considerably increased when small amount of yeast extract (0.02%) is added in different media as a growth stimulator. The results of composition and content of amino acids (Table 1), total nitrogen and protein (Table 2), valuable vitamins (Table 3) and carotenoids (Fig. 1) of obtained biomass are represented respectively on tables.

Table 1. Amino acid composition of biomass of *Rh. sphaeroides* sp. D-8 grown on different media (g/100g dry weight of biomass)

Amino acids	Ormerud's medium (control)	Medium with stock-breeding manure	Medium with poultry dung
DL-Alanine	4.57	4.55	4.3
L-Arginine	3.2	3.2	3.12
DL-Aspartic acid	4.34	4.35	4.05
Glycine	2.38	2.18	2.0
L-Glutamic acid	5.43	5.43	5.33
L-Histidine	1.1	1.1	1.05
L-Isoleucine	2.42	2.25	2.2
DL-Leucine	3.15	2.88	2.72
DL-Lysine	2.72	2.68	2.68
DL-Methionine	1.08	0.85	0.64
DL-Phenylalanine	1.99	1.9	1.69
L-Proline	2.6	2.5	2.16
DL-Serine	1.58	1.58	1.58
DL-Threonine	2.83	2.8	2.68
DL-Tryptophane	+	+	+
DL-Tyrosine	1.48	1.3	1.07
DL-Valine	3.43	3.3	3.11

Table 2. Contents of total nitrogen and protein in biomass of phototrophic bacteria grown on different media

Media	1)Total nitrogen, %	1)Protein, %	2)Total nitrogen, %	2)Protein, %
Ormerud's medium (control)	9.4	59	8.67	54.1
Medium with stock-breeding manure	9.25	58.6	8.45	53.7
Medium with poultry dung	9.2	58.2	8.22	53.3

Legend: 1)- *Rh. sphaeroides* sp. D-8, 2) – *Rh. sphaeroides* sp. A-10.

Table 3. Contents of vitamins in biomass of *Rh. sphaeroides* sp. D-8

Amino acids	Ormerud's medium	Medium with stock-breeding manure	Medium with poultry dung
Biotin	0.42	0.39	0.37
Cyanocobalamin	513	503	487
Niacin	415	398	389
Pantothenic acid	2.5	2.3	2.3
Pyredoxin	2.6	2.6	2.17
Thiamin	6.03	5.8	5.35

Legend: Vitamins content, µg/g dry weight.

The results of composition and content of amino acids, total nitrogen and protein, valuable vitamins in biomass obtained on media with waste extracts didn't give up and in some cases exceeded the same results on the control Ormerud's medium (Tables 1, 2, 3).

It is known that the organic compounds of carbon serve as a source of carbon and electron donor for purple nonsulfur bacteria. The less of carbon source media affects not only on growth of the cultures but also on biosyntheses of carotinoides.

The absorption spectra showed that the synthesized carotinoides on medium with stock-breeding manure by their quantitative and qualitative characteristics are similar to same results obtained on control Ormerud's medium (Fig. 1).

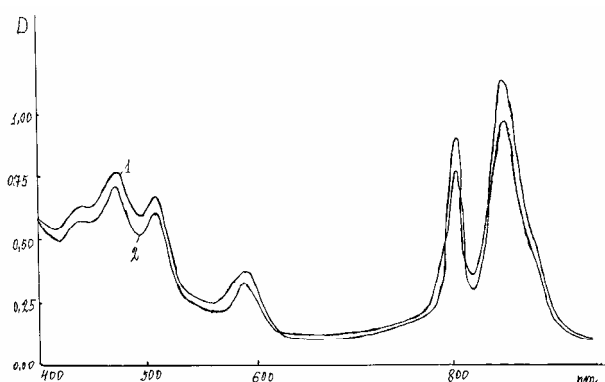


Fig. 1. Absorption spectra of whole cells of *Rh. sphaeroides* sp. D-8 grown in different media: 1. Ormerud's medium, 2. Medium with stock-breeding manure

The results showed that the extracts of poultry dung were poor of some elements in comparison with the stock-breeding manure. The addition of 0.3% glucose to poultry dung stimulates the growth of bacteria up to 3.3-3.8g/l. It is more effective to use molasses in concentration of 0.25% in media with the extracts of poultry dung.

It is known that during the mixed cultivation of different microorganisms the constant balance or stimulation of the growth of single or mixed cultures of microorganisms is observed. Physiological properties of microorganisms, the composition of media and the conditions of cultivation have great role in this process [3]. The data on cultivation statistics of mixed cultures under different conditions confirm the great influence on the growth of monocultures and mixed cultures [4].

In our experiments we have used the method of mixed cultivation for production of high level of biomass of phototrophic bacteria on base of wastes. As heterotrophic microorganism *B. megaterium* was used.

The purple nonsulfur bacteria are facultative anaerobes though they grow also well under conditions of weak aeration in dark. In association of facultative anaerobic phototrophic bacteria and aerobic *B. megaterium* essentially the partners are differed with their requirements to oxygen.

The results on mixed cultivation of phototrophic bacteria and *B. megaterium* are represented in Table 4.

In our experiments the active growth of *B. megaterium* was observed under aerobic conditions using both monoculture and mixed culture. Microaeration in mixed culture increased the growth of phototrophs and decreased the growth of heterotrophic culture but the heterotrophic culture in this case had rather stimulating influence on growth of phototrophs. In case of anaerobic conditions the growth of phototrophic bacteria was high in monoculture but the single cells of *B. megaterium* were observed in monoculture. In mixed culture the growth of phototrophic bacteria under anaerobic conditions was high in comparison with monoculture. In this case the stimulation effect of *B. megaterium* even with weak growth was available (Table 4).

Table 4. Influence of aeration on the biomass yield during mixed cultivation of phototrophic bacteria and *B. megaterium* on medium with stock-breeding manure extracts (g/l dry weight of biomass)

Cultures	Aerobic (dark)	Microaerophilic (light)	Anaerobic (light)
<i>Rh. sphaeroides</i> , sp. D-8	0.43	3.36	3.06
<i>Rh. sphaeroides</i> , sp. A-10	0.54	3.85	3.7
<i>B. megaterium</i>	2.2	1.9	0.048
<i>Rh. sphaeroides</i> , sp. D-8 + <i>B. megaterium</i>	2.41	4.8	4.24
<i>Rh. sphaeroides</i> , sp. A-10 + <i>B. megaterium</i>	2.66	5.03	4.94

The analysis of the growth of single culture-components showed that the mixed growth of cultures is based on symbiotic interaction as commensalism. The commensal relations among phototrophic and heterotrophic bacteria have their best effect under microaerophilic conditions. The stimulating influence of heterotrophic bacterial culture was the highest when the correlation of phototrophic and heterotrophic bacteria was in ratio 2:1(v/v) in inoculum. In association of phototrophic and heterotrophic bacteria the yield of biomass could be increased about 33-42% in comparison with monoculture. Microscopic examination conformed that the biomass obtained was mainly consisted of phototrophic bacteria.

Thus, the cheap nutrient media on the base of agricultural wastes such as stock-breeding manure and poultry dung have been developed for production of biomass of phototrophic bacteria. The highest yield of biomass was observed by mixed cultivation under microaerophilic conditions of growth. Besides being rich feed product the biomass can be also used as a source of valuable biologically active substances and can be applied as fertilizer in agriculture.

REFERENCES

1. *Afrikyan E.K.* Entomopathogenic bacteria and their significance. Yerevan, [in Russian], 1973.
2. *Jun M., Yasuo A., Sugio K.* Rept. Ferment. Res. Inst., 74, 33-42, 1992.
3. *Ko S.H., Lebeault J.M.* J. Appl. Microbiol. 87,1, 72-79, 1999.
4. *Krooneman J., Akker S.V.D., Gomes T.M.P., Forney L.J., Gatschal J.C.* Appl. Environ. Microbial, 65, 1, 131-137, 1999.

5. *Kuceva L.S.* Microbiological methods for determine of vitamin B₁₂ . In: Vitamin resources and their use. M., 133-156 [in Russian], 1961.
6. *Malatyan M.N., Arutjunyan T.G., Paronyan A.Kh., Keppen O.I., Alexandrushkina N.I.* Microbiology, 51, 3, 517-520[in Russian], 1982.
7. *Malatyan M.N., Paronyan A.Kh.* Appl. Biochem. Microbial. 33, 2, 208-210, 1997.
8. *Odincova E.N.* Microbiological methods for determine of vitamins. M., 93-204 [in Russian], 1959.
9. *Ormerod J.G., Ormerod K.S., Gest H.* Arch. Biochem. Biophys., 94, 2, 449-463, 1961.
10. *Paronyan A.Kh.* Microbiological J., 64, 2, 28-34, 2002.
11. *Sasaki K., Noparatnaraporn N., Nagai S.* Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from agroindustrial wastes. In: Bioconversion of waste materials to industrial products. U.K., 223-261, 1991.

Received 24.12.2008



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи
•Experimental and Theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 1 (61), 2009

ВЛИЯНИЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ И ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ НА ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛАМИ *E. COLI*

П. Н. САВИЛОВ

Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко
E-mail: p_savilov@rambler.ru

В опытах на 82 беспородных белых крысах (самках) исследовали влияние резекции печени (РП, 15-20% массы органа) и ее сочетания с гипербарической оксигенацией (ГБО, 3 ата, 50 мин, 1 сеанс в сутки, трехкратно) на способность нейтрофилов артериальной и венозной (портальная вена, печеночные вены) крови поглощать *E.coli* (*Escherichia coli*). Установлено, что в условиях ГБО ограничивается ингибирующее влияние печени на фагоцитоз-стимулирующую способность нейтрофилов для *E.coli*. В постгипероксическом периоде данная функция оперированной печени нормализуется. ГБО предупреждает развивающуюся при РП задержку в оперированном органе нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E.coli*.

Гипероксия – печень – резекция – нейтрофилы – кишечная палочка – фагоцитоз

Ոչ ցեղական 82 սպիտակ առնետների վրա կատարված փորձերում (էգեր) հետազոտել ենք լյարդի մասնատման (ԼՄ, օրգանի զանգվածի 15-20%) և դրա հետ համատեղ հիպերբարիկ օքսիգենացման (ՀԲՕ, 3 ата, 50 րոպե, 1 սեսան/օր երեք անգամ) ազդեցությունը զարկերակային և երակային արյան (դռներակային երակ, լյարդի երակներ) նեյտրոֆիլների *E. coli*-ն կլանելու ունակության վրա: Հաստատված է, որ ՀԲՕ-ի պայմաններում նվազում է լյարդի արգելակող ազդեցությունը *E. coli*-ն ֆագոցիտոզի ենթարկելու նեյտրոֆիլների ունակության վրա: Ետհիպերոքսիկ շրջանում վիրահատված լյարդի տվյալ գործառույթը կանոնավորվում է: ՀԲՕ-ն կանխում է զարգացող *E. coli*-ն ակտիվորեն ֆագոցիտոզ կատարող նեյտրոֆիլների կանգը վիրահատված օրգանում, որը սովորաբար զարգանում է ԼՄ-ի ժամանակ:

Հիպերօքսիա – լյարդ – մասնատում – նեյտրոֆիլներ – աղիքային ցուպիկ – ֆագոցիտոզ

Experiments were conducted on 82 outbred female albino rats exposed to liver resection (LR, 25-29% of the organ mass) and hyperbaric oxygenation (HBO, at 3 ata, for 50 min once, three times per day within the first three days after surgery. The capacities of neutrophils of arterial (aorta) and venous (portal vein, hepatic veins) blood to ingest and digest *E. coli* were investigated. Under HBO, the inhibitory

impact of LR on the phagocytosis-stimulating ability of the liver to *E. coli* was limited for neutrophils. In the posthyperoxic period, the phagocytosis-stimulating function of the operated liver was found to be normalized. HBO prevented the post-LR delay of the neutrophils which actively englobe *E. coli* in the operated organ.

Hyperoxia – liver – resection – neutrophils – E. coli – phagocytosis

Исследованиями последних лет установлено, что печень млекопитающих способна стимулировать поглотительную способность фагоцитов (нейтрофилы, моноциты) в отношении Грам(+) и Грам(-) микроорганизмов [7], одновременно регулируя бактерицидную активность гуморальных факторов крови [6]. Установлено, что удаление уже небольшого объема печени (15-20% массы органа) нарушает антистафилококковую активность нейтрофилов и моноцитов [8]. Состояние поглотительной способности нейтрофилов и моноцитов в отношении естественного симбионта организма млекопитающих *E. coli* после резекции печени (РП) в настоящее время не известно.

Известно, что гипербарический кислород способен устранять вызываемые РП нарушения стимулирующего влияния печени на поглотительную способность нейтрофилов в отношении золотистого стафилококка [8]. Влияние гипербарической оксигенации (ГБО) на способность оперированной печени изменять поглотительную способность нейтрофилов к *E. coli* не изучено.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния РП и ее сочетания с ГБО на способность нейтрофилов поглощать *E. coli* как в притекающей, так и в оттекающей от печени крови.

Материал и методика. Опыты проведены на 82 беспородных белых крысах (самках) массой 170-220 г. Резекцию печени проводили на фоне эфирного наркоза, удаляя электроножом часть левой доли печени (15-20% массы органа). Операционное поле очищали от шерсти, обрабатывали раствором хлорамина. Хирургический инструментарий подвергали стерилизации по общепринятой методике. После удаления части печени и контроля гемостаза ушивали мышечный слой брюшной стенки кетгутом. На кожу накладывали П-образные шелковые швы, которые предотвращают кожные края раны от подвертывания и тем самым ускоряют процесс заживления. Антибиотики и антисептики парентерально не вводили. Частота послеоперационных нагноений – 2,5%. Животные с послеоперационными нагноениями из опыта исключались. ГБО проводили медицинским кислородом в первые трое суток после операции, в режиме 3 ата, 50 мин, по 1 сеансу в сутки. Первый сеанс начинали через 4-8, второй и третий – соответственно через 24 и 48 ч после операции. Все животные были разделены на 10 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма); 2, 3, 4 серии – животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии («ложнооперированные» животные). 5, 6, 7 серии – животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после РП. Эти серии служили контролем для выявления «чистого» эффекта ГБО. 8, 9, 11 серии – оксигенированные животные с РП, исследованные на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного (1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического) периода соответственно. Животных выводили из эксперимента декапитацией на фоне этаминалового наркоза (40 мг этаминала натрия/кг).

Объектами исследования служили нейтрофилы артериальной крови (АК) и венозной крови: кровь воротной вены (КВВ) и кровь печеночных вен (КПВ).

Артериальную кровь получали пункцией аорты, венозную – соответственно пункцией портальной вены и печеночных вен. Получение крови из печеночных вен осуществляли по разработанной ранее методике [6]. Последовательность забора крови составляла: печеночные вены → портальная вена → аорта. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов определяли по их способности поглощать убитые нагреванием микробы [9]. Для этого 0,1 мл гепаринизированной крови инкубировали с 0,05 мл моновзвеси *E. coli* (штамм К-12), убитой нагреванием, в концентрации 500 млн микробных тел/мл и 0,05 мл физиологического раствора в течение 30 мин при 37⁰, встряхивая через каждые 5 мин. По завершении инкубации пробирки помещались на 2 мин в ледяную воду, далее центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Плазму удаляли микродозатором, а из верхнего слоя осадка готовили мазки и окрашивались по Романовскому. Подсчет фагоцитированных микроорганизмов проводили под микроскопом «БИОЛАМ» ув.100, ок12. Определяли следующие показатели: фагоцитарное число нейтрофилов (ФЧн) - % клеток, поглотивших тест-микроб за единицу времени. ФЧн рассчитывали на 100 нейтрофилов. Одновременно рассчитывали фагоцитарный индекс нейтрофилов (ФИн) - среднее количество тест-микробов, поглощенных одной клеткой. Этот показатель характеризует интенсивность поглощения микроба фагоцитами. Результаты обработаны статистически с учетом непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы 1, у интактных крыс ФЧн к *E. coli* в КПВ достоверно превышало аналогичный показатель в АК и КВВ соответственно на 52% и 61%. ФИн у интактных животных достоверно не различался и составил в АК, КВВ и КРВ $5,27 \pm 0,25$; $5,64 \pm 1,6$ и $5,27 \pm 0,3$ соответственно.

Таблица 1. Динамика фагоцитарного числа нейтрофилов по отношению к *E. coli* в крови после резекции печени и гипербарической оксигенации ($M \pm m$)

Сроки послеоперационного, (постгипероксического) периода, сутки		Кровь		
		артериальная	воротной вены	печеночных вен
Норма, n=10		$33,3 \pm 2,1$	$31,3 \pm 2,54$	$50,0 \pm 2,6^{\blacktriangle}$
3 (1)	ЛО, n=9	$25,8 \pm 2,7$	$33,3 \pm 3,2$	$38,4 \pm 3,1^{\blacktriangle*}$
	РП, n=9	$38,4 \pm 3,96^{\blacklozenge}$	$30,6 \pm 1,92$	$26,8 \pm 2,9^{\blacktriangle* \blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=10	$24,0 \pm 2,8^{**}$	$30,5 \pm 2,23$	$35,8 \pm 2,8^{\blacktriangle**}$
7 (4)	ЛО, n=10	$31,9 \pm 2,9$	$35,3 \pm 2,64$	$54,8 \pm 4,2^{\blacktriangle}$
	РП, n=9	$49,4 \pm 4,7^{* \blacklozenge}$	$49,2 \pm 3,0^{* \blacklozenge}$	$37,3 \pm 3,3^{* \blacktriangle \blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=8	$46,9 \pm 4,8^{\blacklozenge*}$	$38,5 \pm 3,9^{\bullet}$	$58,5 \pm 4,5^{\blacktriangle \blacklozenge \bullet}$
14 (11)	ЛО, n=10	$34,3 \pm 4,4$	$36,1 \pm 3,8$	$49,5 \pm 5,3^{\blacktriangle}$
	РП, n=8	$37,5 \pm 3,8$	$37,6 \pm 3,1$	$35,1 \pm 2,8^{* \blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=8	$37,1 \pm 1,95$	$34,0 \pm 1,3$	$53,9 \pm 3,3^{\blacktriangle \blacklozenge \bullet}$

Примечание. ЛО- «ложнооперированные» животные, РП – животные с резекцией печени, РП+ГБО – животные с резекцией печени и гипербарической оксигенацией, n – число животных по сериям опытов; $*$ ($p < 0,05$) - достоверность различий по сравнению с нормой; $\blacktriangle$ ($p < 0,05$) – с аналогичным показателем артериальной и портальной крови данной серии соответственно; $\blacklozenge$ и $\bullet$ ($p < 0,05$) – по сравнению с аналогичным показателем послеоперационного периода «ложнооперированных» животных и животных с РП соответственно.

Следовательно, интактная печень, увеличивая в крови количество нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*, не влияет на интенсивность поглощения ими данного микроба.

Нарушение целостности брюшной полости посредством лапаротомии вызывало кратковременное (на 3-и сут после операции) снижение на 24% по сравнению с нормой ФЧн к *E. coli* только в КПВ. Фин к *E. coli* в этот период достоверно не менялся, но избирательно увеличивался на 14-е сут после лапаротомии в АК и КПВ (табл. 1). Следовательно, лапаротомия, вызывая кратковременное ограничение стимулирующего влияния печени на фагоцитарную активность нейтрофилов к *E. coli*, создает условия для отсроченного увеличения интенсивности поглощения ими данного микроба в артериальной крови и крови печеночных вен.

Дополнение лапаротомии РП вызывало значимое по сравнению с нормой снижение ФЧн в КПВ на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного периода соответственно на 46%, 25% и 30% (табл. 1). При этом на 3-и и особенно на 7-е сут послеоперационного периода ФЧн в оттекающей от печени крови становилось достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в притекающей к ней крови (табл. 1). Одновременно достоверно увеличивалось по сравнению с «ложнооперированными» животными ФЧн в АК на 3-и и 7-е сут послеоперационного периода соответственно на 49% и 91%. В последнем случае это сопровождалось сохранением повышенного показателя в КВВ (табл. 1). Из этого следует, что механическое повреждение печени не только нарушает способность этого органа «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагцитирующими *E. coli*, но и приводит к частичной ретенции в нем клеток. Это сопровождается активацией внепеченочных механизмов, направленных на увеличение содержания в артериальной и портальной крови нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*, но истощающихся к 14-м сут послеоперационного периода.

В отличие от ФЧ нейтрофилов их ФИ при РП снижался в притекающей и оттекающей от печени крови на 3-и сут послеоперационного периода, по сравнению как с нормой, так и с «ложнооперированными» животными. При этом к 14-м сут послеоперационного периода ингибирующее влияние РП на интенсивность поглощения нейтрофилами *E. coli* сохранялось (рис. 1.).

Следовательно, механическое повреждение печени устраняет механизмы, запускаемые непосредственно лапаротомией и направленные на отсроченное увеличение в артериальной крови и крови печеночных вен нейтрофилов, максимально поглощающих *E. coli*.

Как видно из табл. 1, в условиях гипероксии (3-и сут после РП) ФЧн к *E. coli* в КПВ на 34% превышало аналогичный показатель животных с РП без ГБО, но при этом оставалось на 28% ниже нормы. Однако появлялось достоверное различие между ФЧн в КПВ и АК. Это указывает, во-первых, на ограничение в условиях применения ГБО снижения способности оперированной печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E. coli*; во-вторых, ослабление при гипероксии ретенции последних в оперированной печени.

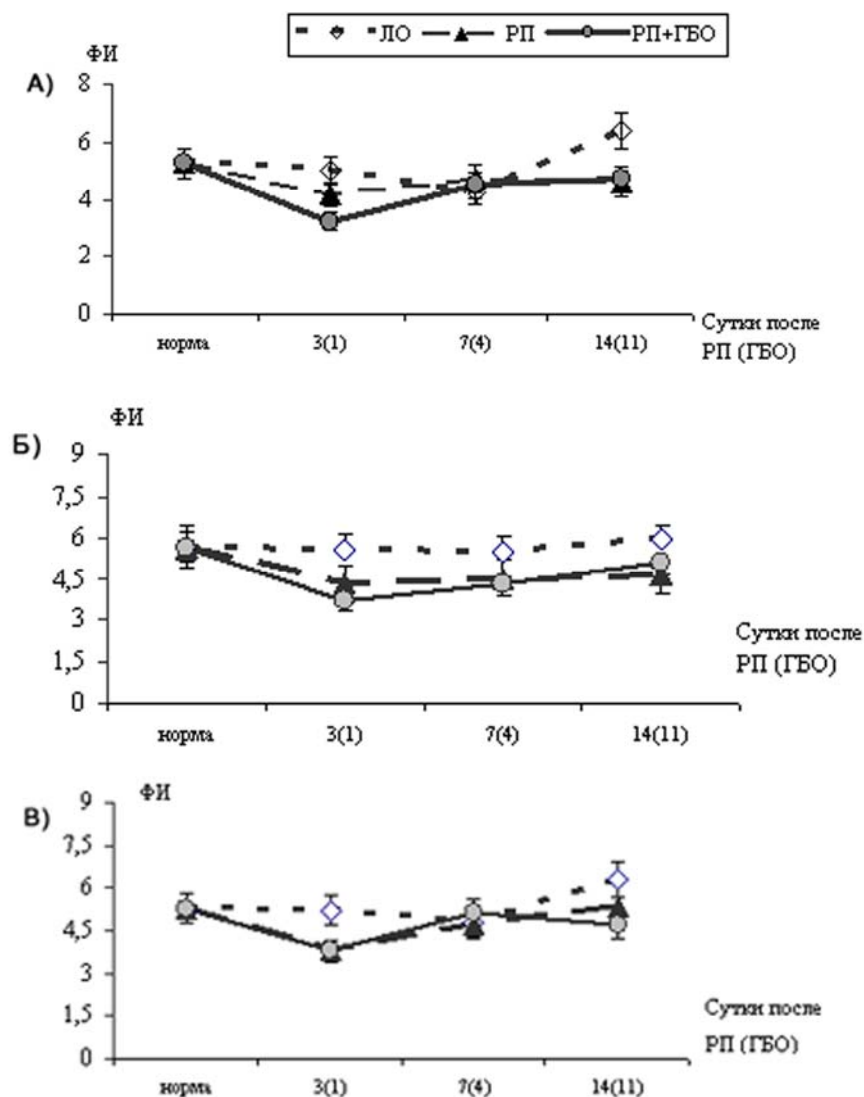


Рис. 1. Динамика фагоцитарного индекса нейтрофилов в артериальной крови (А), крови воротной вены (Б) и крови печеночных вен (В) после резекции печени и гипербарической оксигенации.

По оси абсцисс – сутки послеоперационного (постгипероксического) периода.

По оси ординат – абсолютная величина ФИ. ЛО – «ложнооперированные» животные.

В первые сутки постгипероксического периода выявлено избирательное снижение относительно здоровых животных и животных с РП без ГБО, ФЧн в АК, которое прекращалось к 4-м сут постгипероксического периода, но при этом появлялось отсроченное ингибирующее влияние ГБО на ФЧн в КВВ (табл. 1). При этом восстанавливалось достоверное превышение ФЧн в КПВ над аналогичным показателем в АК и КВВ (табл. 1). Это свидетельствует о нормализации в постгипероксическом периоде способности оперированной печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно-фагоцитирующими *E. coli*.

Исследование ФИн к *E. coli* в первые сутки постгипероксического периода выявило сохранение негативного влияния РП на данный показатель в КВВ и КПВ в условиях гипероксии при его усилении в АК (рис. 1).

Прекращение гипероксического воздействия на организм не оказывало существенного влияния на исследуемый показатель фагоцитоза (рис. 1). Следовательно, ингибирующее влияние ГБО на интенсивность поглощения *E.coli* нейтрофилами определяется длительностью гипероксического воздействия и только для клеток, находящихся в артериальной крови.

Общеизвестно, что в крови циркулируют два пула нейтрофилов - «дремлющие» и «активные», различающихся по фагоцитарной активности [1], которая традиционно оценивается по величинам ФЧ и ФИ [9]. Если первый характеризует количество клеток, находящихся в «активном» пуле фагоцитов, то второй отражает количество микробов, поглощенных одним «активным» фагоцитом и зависит от количества рецепторов на мембране последнего. Анализ изменений ФЧн и ФИн к *E. coli* позволяет говорить о том, что увеличение поглотительной способности нейтрофилов к указанному микробу при прохождении крови по печеночным синусоидам достигается не экспрессией рецепторов на поверхности данных клеток, а обогащением нейтрофилов «дремлющего» пула рецепторами *de novo*. Аналогичный процесс обнаружен в культуре неактивных макрофагов, инкорпорирующих на своих мембранах при контакте с «активными» фагоцитами белок C_{1q} системы комплемента, выступающий в роли Fc-рецептора [10]. РП нарушает этот процесс, что приводит к снижению ФЧн к *E. coli* в оттекающей от оперированной печени крови (табл. 1). Одновременно при РП нарушается поглотительная функция печеночных макрофагов – клеток Купфера [4], содействуя появлению в центральном кровотоке кишечной палочки, имеющейся в норме только в крови воротной вены [3]. Вероятно, последнее и активирует «внепеченочные» механизмы увеличения содержания в крови оперированных крыс нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*. При этом наблюдающуюся после РП ретенцию части «активных» нейтрофилов в оперированном органе следует рассматривать как компенсаторную реакцию организма в ответ на нарушение антимикробной функции печени. В результате в оперированном органе формируется своеобразный нейтрофильно-моноцитарный антимикробный барьер [8], берущий на себя антимикробную функцию купферовских клеток, которые переключаются после РП на регуляцию репаративных процессов гепатоцитов [2]. К компенсаторной реакции при РП следует отнести и снижение содержания в крови нейтрофилов, максимально поглощающих *E. coli*. Есть все основания говорить об увеличении их выхода из сосудистого русла не только в интерстициальное пространство оперированной печени, но и органов пищеварительного тракта, что приводит к увеличению местного иммунитета последнего.

Применение трехдневного курса ГБО восстанавливает нарушаемую РП способность данного органа «обогащать» кровь активно фагоцитирующими *E. coli* нейтрофилами. При этом лечебный эффект ГБО развивается не сразу, а постепенно, в динамике постгипероксического состояния, под которым понимают совокупность функционально-метаболических

и морфогенетических изменений, формирующихся в организме после прекращения гипероксического воздействия [5].

Это дает основание говорить о последовательном вовлечении в гипероксический саногенез физиологических реакций, детерминирующих фагоцитозстимулирующую функцию печени и нарушаемых при РП. Восстановление ГБО стимулирующего влияния оперированной печени на фагоцитарную активность в отношении *E.coli* устраняет необходимость во «внепеченочных» механизмах перевода нейтрофилов из «дремлющего» пула в активно фагоцитирующие *E.coli* клетки, активируемых РП.

Таким образом, применение в первые трое суток после РП курса ГБО создает условия для устранения вызываемого операцией нарушения способности печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E.coli*. Лечебный эффект ГБО сохраняется к 14-м сут послеоперационного периода, чего нельзя сказать о животных с РП без ГБО.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д. Патофизиология фагоцитов. М.: Медгиз, 1961.
2. Маянский Д. Н., Щербаков В. И., Шимек И. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 5, 50-54, 1985.
3. Маянский Д. Н., Виссе Э., Деккер К. Новые рубежи в гепатологии. Новосибирск, Изд-во НГУ, 1982.
4. Плющ И. В., Цырендоржиев Д. Д., Маянский Д. Н. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 5, 477-479, 1995.
5. Савилов П. Н. Бюлл. гипербарич. биол. и медицины, 7, 1-4, 121-122, 1999.
6. Савилов П. Н., Кузьмина Н. И., Дьячкова С. Я. Вестник ВГУ. Серия: Проблемы химии, биологии. Воронеж, 1: 41-43, 2001.
7. Савилов П. Н. Росс. физиол. журнал. 90, 8, Приложение. Часть 2: 121, 2004.
8. Савилов П. Н. Общая реаниматология, 4, 5, 40-44, 2008.
9. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете. М.: Медицина, 1978.
10. Yagawa K., Onone K., Aida K. J. Immunol. 122, 1, 366-373, 1979.

Поступила 09.12.2008



Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

ОСОБЕННОСТИ СООБЩЕСТВА ХЕМОЛИТОТРОФНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ВЫЩЕЛАЧИВАНИИ МЕДНОГО КОНЦЕНТРАТА

С.З. НАГДАЛЯН, Е.М. КОЧАРЯН, Н.С. ВАРДАНЯН

Центр микробиологии и депонирования микроорганизмов НАН РА,
E-mail; nvard@sci.am

Проведено сравнительное исследование активности чистых культур и сообщества хемолитотрофных бактерий (ХБ) для выщелачивания медного концентрата. Установлена высокая эффективность сообщества ХБ, выделенного из полиметаллической руды Ахтала, в извлечении меди и железа из медного концентрата. Микробиологический анализ сообщества бактерий показал доминирование в нем сероокисляющих бактерий, а также наличие некультивируемых железоокисляющих бактерий. Выделена и изучена грамположительная сероокисляющая бактерия. Показано, что в монокультуре выделенная бактерия не способна к окислению сульфидов металлов. Однако в ассоциации с бактериями *Leptospirillum* spp. активно окисляет медный концентрат.

Сообщество бактерий – выщелачивание - медный концентрат

Ուսումնասիրվել է քեմոլիտոտրոֆ բակտերիաների (ՔԲ) համակեցության և մաքուր կուլտուրաների համեմատական ակտիվությունը պղնձի խտանյութի տարալվացման գործում: Հաստատվել է Ախթալայի բազմամետաղային հանքավայրից մեկուսացված ՔԲ համակեցության պղնձի խտանյութից երկաթի և պղնձի կորզման բարձր արդյունավետությունը: Բակտերիաների համակեցության մանրէաբանական անալիզը ցույց է տվել դրանում ծծումբ օքսիդացնող բակտերիաների գերակշռումը, ինչպես նաև աճեցման չենթարկվող երկաթ-օքսիդացնող բակտերիաների առկայությունը: Մեկուսացվել և ուսումնասիրվել է գրամ-դրական ծծումբ օքսիդացնող բակտերիա: Պարզվել է, որ մեկուսացված բակտերիան ընդունակ չէ օքսիդացնելու մետաղների սուլֆիդներ, սակայն *Leptospirillum* spp. բակտերիաների հետ համատեղ ակտիվորեն օքսիդացնում է պղնձի խտանյութը:

Բակտերիաների համակեցություն - տարալվացում - պղնձի խտանյութ

Comparative activities of pure cultures and consortium of chemolithotrophic bacteria (CB) for bioleaching of copper concentrate have been studied. High efficiency of bacterial consortium isolated from Akhtala multi-metallic ore in bioleaching of copper concentrate has been established. Microbiological analysis of consortium showed predominantly the presence of sulphur oxidizing bacteria as well as uncultivable iron oxidizing bacteria. A gram positive sulphur oxidizing bacteria has been isolated and studied. It has been shown that isolated bacteria represent no activity in metal sulphide oxidation. However, in association with bacteria *Leptospirillum* spp. they actively oxidize copper concentrate.

Consortium of bacteria - bioleaching - copper concentrate

Биовыщелачивание - это использование различных типов хемолитотрофных бактерий (ХБ) (мезофильных, умеренно термофильных и экстремально термофильных) для извлечения ценных металлов из сульфидных руд [9, 10, 16]. Долгое время считалось, что центральная роль в процессах биовыщелачивания в коммерческих установках, функционирующих при температурах, не превышающих 40°, принадлежит мезофильной бактерии *Acidithiobacillus ferrooxidans* [13]. Однако исследования последних лет, основанные на использовании полимерной цепной реакции (ПЦР) для амплификации и характеристики 16S рРНК генов бактерии, подтвердили, что во многих установках биовыщелачивания пиритсодержащих руд доминируют умеренно термофильные бактерии и бактерии *Leptospirillum spp.* в комбинации с сероокисляющими бактериями *Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidi-thiobacillus caldus* [11,14]. Имеются также данные, указывающие на участие гетеротрофных бактерий в ускорении окисления сульфидных минералов [8].

Что касается основного минерала меди - халькопирита, то его окисление наиболее активно протекает с участием термофильных бактерий и экстремально термофильных архебактерий [15].

Предполагается, что термофильные бактерии создают такие условия, при которых в среде поддерживается сравнительно низкий потенциал, способствующий преодолению эффекта «пассивации» халькопирита [12].

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение эффективности выщелачивания медных концентратов при использовании чистых культур и сообщества ХБ.

Материал и методика. Объектом исследования служило сообщество хемолитотрофных бактерий, полученное при инкубировании проб полиметаллической руды Ахтала (Армения) на среде 9К с двухвалентным железом в качестве источника энергии, чистая культура сероокисляющей бактерии (SMP 1), доминирующей в сообществе, а также выделенные нами ранее лабораторные штаммы умеренно термофильной бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans* и бактерии *Leptospirillum spp.*

Чистая культура SMP-1 выделена из пульпы периодического выщелачивания медного концентрата с использованием сообщества бактерий из полиметаллической руды. Пробы пульпы на среде 9К, содержащей серу в качестве источника энергии, инкубировали при 30°. Чистые культуры бактерии получали высевом на плотную среду Маннинга с тетрагидратом натрия ($\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) [1], содержащую 0,6% агарозы (Agarose, Type I, SIGMA). Чистоту выделенных штаммов проверяли посевами на среду с 0,02- 0,05%-ным дрожжевым экстрактом (Koch-light, Англия) в присутствии или отсутствии глюкозы. Используемые в исследованиях выделенные нами ранее ХБ *S. thermosulfidooxidans* шт.86 и бактерии *Leptospirillum spp.* [3] выращивали на среде Браерли с двухвалентным железом (2,0 г/л) в качестве источника энергии в присутствии и отсутствии дрожжевого экстракта соответственно.

Основные фенотипические особенности выделенной бактерии изучали при их выращивании в термостате при 37°. Опыты по выщелачиванию концентратов проводили в колбах в режиме встряхивания (180 об./мин) в условиях периодического культивирования бактерий.

Бактериальному выщелачиванию подвергали образцы медного концентрата Зангезурского медно-молибденового комбината (ЗММК). Химический анализ образцов концентрата, приведенный в табл. 1, был проведен общепринятыми в минералогии методами и любезно предоставлен нам ЗММК.

Таблица 1. Химический анализ образцов медных концентратов

Образцы	Содержание, в % (Ag, Au в г/т)												
	Si	Al	Mg	Ca	Fe	Mn	Co	Mo	Zn	Cu	Ag	Au	Cd
Обр. 1	0,32	0,18	0,1	-	26,0	0,02	$4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	12,5	22,2	102	46,2	0,06
Обр. 2	1,3	0,42	1,3	0,12	24,0	0,014	$4 \cdot 10^{-3}$	$7 \cdot 10^{-4}$	8,33	22,2	159	54,4	0,1

Образцы концентрата измельчали до частиц размером 0,080 мм. Навески измельченных образцов помещали в колбы Эрленмейера объемом 250 мл, смачивали дистиллированной водой и стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин. Затем колбы заполняли 50 мл питательной среды 9К без железа.

Интенсивность выщелачивания концентрата оценивали по количеству выщелоченных меди и железа, а также по снижению pH среды и увеличению титра использованных культур бактерий.

Количество Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексонометрическим методом с трилоном Б [6], медь - колориметрически [7] на спектрофотометре СФ-26 (Ленинградское опытно-механическое объединение (ЛОМО), Россия), а также на атомно-абсорбционном спектрофотометре ААС 1N (Carl Zeiss, Германия).

За ростом бактерий следили с использованием микроскопа МБИ-3 (ЛОМО, Россия) с фазово-контрастным устройством. Количество жизнеспособных клеток определяли методом предельных разведений, наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблицам Мак-Креди [1].

pH среды измеряли pH-метр-милливольтметром "pH-121" (Гомельский завод измерительных приборов, Беларусь).

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные обрабатывали статистически. [4].

Результаты и обсуждение. Образцы медного концентрата Кафанской обогатительной фабрики подвергли биовыщелачиванию с использованием сообщества бактерий, полученного из полиметаллической руды Ахтала, а также лабораторных штаммов чистых культур ХБ.

Исследования показали высокую степень извлечения меди из двух образцов концентрата при использовании сообщества бактерий по сравнению с лабораторным штаммом умеренно термофильной бактерии *S. thermosulfidooxidans* шт. 86. Так, за 9 дней культивирования сообществом бактерий при 30° из образца 1 было извлечено в 2 раза больше меди и железа, чем с участием умеренно термофильной бактерии *S. thermosulfidooxidans* шт. 86 при 45° (рис.1). В случае образца 2 высокая активность сообщества бактерий в выщелачивании железа проявилась лишь после 20 дней культивирования, что можно объяснить особенностью его химического состава, в частности высокой кислотоемкостью.

Полученные результаты подтверждают, что сообщество бактерий, сформировавшееся в пульпе при биоокислении медного концентрата и состоящее из бактерий, изначально более адаптированных к экстремальным условиям, в том числе высоким концентрациям различных металлов, может служить эффективным потенциальным кандидатом для осуществления биовыщелачивания медного концентрата.

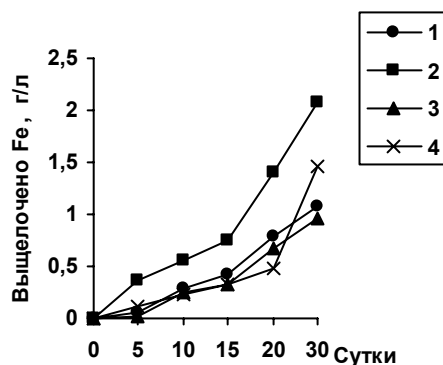


Рис. 1. Выщелачивание железа при окислении двух образцов медного концентрата *S. thermosulfidooxidans* шт. 86 (1, 3) и сообществом мезофильных ХБ (2, 4)

Микробиологический анализ сообщества бактерий, использованного для окисления образцов медного концентрата, показал доминирование в нем сероокисляющих бактерий, а также наличие некультивируемых железоокисляющих бактерий. Но ни одного из широко распространенных видов железоокисляющих бактерий, в том числе *A. ferrooxidans* и *S. thermosulfidooxidans*, не было обнаружено.

Из пульпы бактериального выщелачивания медного концентрата была изолирована в чистую культуру еще не описанная в литературе грамположительная сероокисляющая бактерия. На плотной среде с тетрационатом бактерия образует нерегулярные, похожие на снежинку колонии молочного цвета, покрытые толстым слоем слизи. В молодой культуре бактерии представляют собой палочки размером 0,8 x 1,5–2,0 мкм. По мере роста они превращаются в длинные нити, иногда переплетенные между собой (рис. 2).

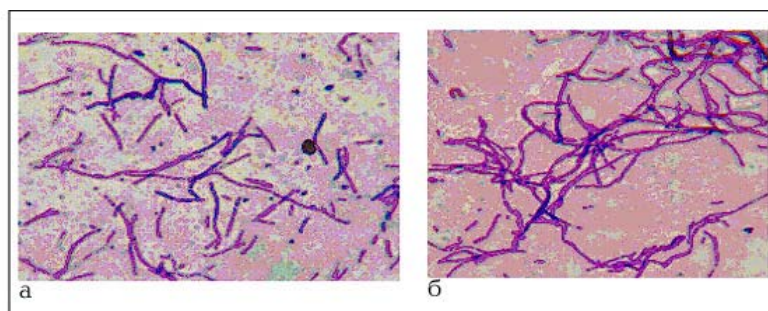


Рис. 2. Микрофотографии окрашенных клеток SMP-1 (а) и SMP-2 (б)

Оптимальная температура роста выделенной бактерии 30⁰. Оптимальное значение pH - 2,8-3,0.

В качестве источника энергии бактерии могут использовать тетрагидрат (Na₂S₄O₆·2H₂O), а также элементарную серу (S⁰), не способны окислять сульфиды металлов. Строгий автотроф, дрожжевой экстракт ингибирует рост бактерии и окисление элементарной серы (табл.2).

Таблица 2. Влияние дрожжевого экстракта на рост шт. SMP-1, образование S/SO₄ и pH среды (время культивирования 4 сут)

	Добавление дрожжевого экстракта, %			
	-	0,005	0,01	0,02
Количество бактерий, кл/мл	6,7х 10 ⁸	4,5х 10 ⁸	2,5х 10 ⁶	4,5х 10 ⁵
S/SO ₄ , г/л	580 ± 7,0	553 ± 5,6	437 ± 16,8	365 ± 14,0
pH, нач./конеч.	2,8 /1,7	2,8 /1,75	2,8 /1,95	2,8 /2,2

В чистой культуре бактерия не проявляет способности к выщелачиванию медного концентрата, однако в ассоциации с бактериями *Leptospirillum* spp. активно переводит медь в раствор (рис. 3).

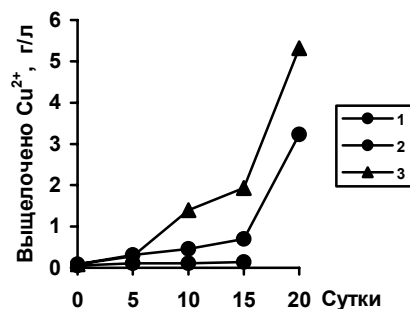


Рис. 3. Окисление медного концентрата с использованием сероокисляющей бактерии SMP.-1 (1), бактерий *Leptospirillum* sp. шт.64 (2) и их ассоциаций (3)

Таким образом, в процессе выщелачивания медных концентратов под действием соответствующих физико-химических факторов (pH, высокая концентрация меди и железа) формируется высокоэффективное и особое по своему составу сообщество, состоящее преимущественно из сероокисляющих и некультивируемых железоокисляющих бактерий.

Выделена и изучена грамположительная сероокисляющая хемолитотрофная бактерия, которая по основным физиологическим признакам (источники энергии, ацидофилия, отношение к температуре, pH) проявляет близкое сходство с известной *A. thiooxidans*. Однако существенным отличием выделенной сероокисляющей бактерии от известной *A. thiooxidans* является форма и размеры клеток, и, что особенно важно, ультраструктурная организация клеточной стенки, поскольку в

отличие от *A. thiooxidans* клетки выделенной бактерии окрашиваются по Граму положительно. В этом отношении выделенная бактерия более близка к сульфобациллам [5], но отличается от последних четко выраженной автотрофией.

Предполагается, что некультивируемые железooksисляющие бактерии, входящие в состав сообщества, принадлежат к роду *Leptospirillum*.

Дальнейшие более детальные исследования, включая молекулярно-генетические, позволят идентифицировать выделенную бактерию, выявить ее основные цитолого-биохимические и кинетические характеристики, а также потенциал в выщелачивании меди и других металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Биогеотехнология металлов*. Практическое руководство. Под ред. Г.И.Каравайко, Дж. Росси, А.Агате, С. Грудера, З.А. Авакян, М., Центр Международных проектов ГКНТ, 1989.
2. *Вардanian Н.С.* Биотехнология, 6., 79 – 83, 2003.
3. *Вардanian Н.С., Акопян В.П.* Микробиология, 72, 4, 1- 5 , 2003.
4. *Ждан-Пушкина С.М., Мовчан Н.А., Щелкунова С.А.* Задания к практическим занятиям по микробиологии. - Л.: 1974.
5. *Каравайко Г.И., Дубинина Г.А., Кондратьева Т.Ф.* Микробиология, 75, 5, 593-629, 2006.
6. *Резников А.А. Муликовская Е.П., Соколов И.Ю.* Методы анализа природных вод, М., Недра, 140с, 1970.
7. *Файнберг С.Ю.* Анализ руд цветных металлов, М., с.374 , 1953.
8. *Bacelar-Nicolau P., Johnson D.B.* L Appl. Environ. Microbiol., 65, 2, 585 – 590, 1999.
9. *Brierley J.A., Brierley C.L.* Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of 21st century, IBS 99. Amilis R., Ballester A. (eds) - Elsevier, Amsterdam, p. 81 – 89, 1999.
10. *Brierley J.A., Brierley C.L.* Hydrometallurgy, 59, 1233- 1239, 2001.
11. *Coram N. J., Rawlings D. E.* Appl. Environ. Microbiology., 68, 2, 838 – 845, 2002.
12. *Petersen J., Dixon D.G.* Hydrometallurgy, 83, 40-49, 2006.
13. *Plumb J. J., McSweeney N.J., Franzmann P.D.* Minerals Engineering, 21, P.91-93, 2008.
14. *Rawlings D.E., Tributsch H., Hansford G.S.* Microbiology, 145, 5 – 13, 1999.
15. *Rawlings D.E., Dew D., du Plessis C.* TRENDS Biotechnol., 21, 38-44, 2003.
16. *Romano P., Blazquez M.L., Alguacil F.J., Munos J.A., Ballester A., Gonzales F.* FEMS Microbiol. Lett., 196, 71-75, 2001.

Поступила 26.09.2008



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи
•Experimental and Theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 1 (61), 2009

ПОСТВИБРАЦИОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОНОВОЙ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ЯДРА СОЛИТАРНОГО ТРАКТА

С. Г. САРКИСЯН

Ереванский государственный университет, биологический факультет,
E-mail: susi.sar@rambler.ru

Проведен on-line программный математический анализ импульсной фоновой активности нейронов ядра солитарного тракта крыс в динамике длительного вибрационного воздействия. После пяти, 10-и и 15-дневного вибрационного воздействия (60 Гц, 2 ч ежедневно) в исследованной группе нейронов обнаруживались достоверные изменения в распределении нейронов по степени регулярности и динамическим типам фоновой активности. Показано, что после 5 и 10 дней наблюдались также статистически достоверные изменения средней частоты импульсации нейронов за счет уменьшения числа нейронов, разряжающихся с высокой частотой (свыше 31 Гц).

*Вибрация - ядро солитарного тракта - фоновая импульсная активность
- межимпульсные интервалы*

Երկարատև թրթռման ազդեցությունից հետո համակարգչային ծրագրով հետազոտվել և վերլուծվել է առնետների միայնակ խրձի կորիզի նեյրոնների էլակետային ազդակային ակտիվությունը: 5, 10 և 15 օր տևողությամբ թրթռու-մից (60 Հց, 2 ժ օրական) հետո հայտնաբերվել են հավաստի փոփոխություններ հետազոտվող նեյրոնների խմբում՝ ըստ էլակետային ակտիվության կա-նոնավորության աստիճանի և դինամիկական տիպերի: 5 և 10 օրյա թրթռման ազդեցության պայմաններում դիտվել է նեյրոնների ազդակահոսքի միջին հա-ճախության վիճակագրորեն հավաստի փոփոխություն՝ ի հաշիվ բարձր հաճախությամբ (31 Հց-ից բարձր) լիցքավորվող նեյրոնների թվաքանակի կրճատման:

*Թրթռում - միայնակ խրձի կորիզ - ազդակային ակտիվություն -
միջազդակային ժամանակահատված*

The on-line programmed mathematical analysis of the back-ground impulse neuronal activity of the nucleus tractus solitarius has been carried out. After 5, 10 and 15 day vibration (60 Hz, 2 h. daily) in studied groups of neurons the reliable changes in neuronal distribution at degree of regularity and dynamic types of back-ground activity were revealed. It has been shown that after 5 and 10 days with vibration session by 2 h duration statistically reliable changes of the neurons impulsion frequency was observed due to decrease of neurons number discharged at high frequency (over 31 Hz).

Vibration - nucleus tractus solitarius - background neuronal activity - interspike intervals

Одним из наиболее распространенных неблагоприятных факторов производственной среды, действующих на организм человека, является вибрация. Установлено, что она может стать причиной возникновения вибрационной болезни, поражающей нервную, сердечно-сосудистую, двигательную и другие системы организма [3, 14, 20]. В вибрационной патологии важная роль принадлежит измененной афферентации с рецепторных зон ряда анализаторов – вестибулярного, проприоцептивного, кожного [9, 15, 18]. При действии вибрации на организм человека часто наблюдаются расстройства функций вестибулярного анализатора, который является основным сенсорным входом, ответственным за генез «болезни движения». Последняя сопровождается вегетативными реакциями, реализация которых возможна благодаря тесным связям вестибулярных ядер с вегетативными центрами продолговатого мозга. Гистоморфологическими методами установлена прямая проекция вестибулярных ядер к структурам вагусного комплекса [1].

Перспективным направлением в изучении бульбарных механизмов регуляции вестибуло-вегетативных функций является выяснение роли в этих процессах характера изменений реакций нейронов ядра солитарного тракта, на которых оканчиваются первичные афферентные волокна блуждающего нерва. Известно, что некоторые ядра продолговатого мозга, в частности, группа ядер вагосолитарного комплекса (ядро солитарного тракта и дорсальное моторное ядро блуждающего нерва), включаются в механизмы реализации собственных рефлексов ряда внутренних органов [16].

Сенсорное ядро солитарного тракта является зоной окончания ларингиальных, трахеобронхиальных, легочных, сердечных и гастроинтестинальных афферентных волокон блуждающего нерва. Обширные связи этой области со многими структурами центральной нервной системы свидетельствуют об участии ее не только в формировании ваго-вагальных рефлексов, но и в реализации супрабульбарного контроля вегетативных механизмов продолговатого мозга [19]. В этом отношении особый интерес представляет вопрос о нейронной организации вестибуло-солитарной системы регуляции висцеральных функций.

В доступной нам литературе не освещен вопрос о влиянии вибрации на динамику импульсной активности нейронов ядра солитарного тракта. Несомненно, изучение последнего позволит вскрыть одну из сторон механизма «болезни движения».

Целью данного исследования является изучение фоновой импульсной активности нейронов ядра солитарного тракта под воздействием вибрации.

Материал и методика. Эксперименты были проведены на 29 белых крысах (масса 220-250 г), наркотизированных нембуталом (40 мг/кг, внутривенно), в условиях острого опыта. Животных подвергали предварительному воздействию вибрации на вибростенде (частота 60 Гц, амплитуда колебаний 0.4 мм) ежедневно по 2 ч. Регистрацию импульсной активности левосторонних нейронов ядра солитарного тракта проводили на пятый (62 нейрона), десятый (75 нейрона) и пятнадцатый (93 нейрона) дни с сеансами вибрационного воздействия.

Импульсную активность нейронов отводили экстраклеточно с применением стеклянных микроэлектродов (диаметр кончика 1-1.5 мк, сопротивление 3-5 МОм), заполненных раствором хлористого натрия (2.0 М). Стереотаксическую ориентацию электродов для попадания в структуру осуществляли по координатам атласа [17].

Для гистологического контроля локализации кончика отводящего микроэлектрода в пределах ядра солитарного тракта после каждого эксперимента с помощью вольфрамового электрода, погруженного по треку последнего отведения, проводили электролитическую коагуляцию ткани мозга (ток 2 мА, длительность 20-25 с).

С использованием подходов, примененных нами в предыдущих исследованиях, анализировали последовательные участки записей импульсной активности нейронов, включающие до 1200 потенциалов действия. По форме графиков скользящей частоты оценивали стационарность фоновой активности нейронов. В случае стационарности исследуемых выборок строили нормированные гистограммы межимпульсных интервалов и аутокоррелограммы до восьмого порядка, отражающие вероятность генерации потенциалов действия в различные моменты времени.

Для «стационарных» нейронов рассчитывали среднюю частоту разрядов и коэффициент вариации межимпульсных интервалов, равный отношению среднеквадратического отклонения межимпульсных интервалов к его среднему значению (%). Гистограммные межимпульсные интервалы классифицировали как моно-, би- и полимодальные. По частоте фоновой активности исследованные нейроны подразделяли на три группы: с низкой (до 10 Гц), средней (11-30 Гц) и высокой (свыше 31 Гц) частотой импульсации. С учетом формы аутокоррелограмм проводили классификацию нейронов по трем степеням регулярности импульсного потока: I – нейроны с регулярной активностью (аутокоррелограмма включала в себя восемь отчетливо выраженных колебаний, соответствующих периодическому увеличению вероятности появления импульса и ее снижению почти до нуля); II – промежуточные по степени регулярности импульсации нейроны (в аутокоррелограмме присутствовали несколько максимумов, вслед за которыми отмечалось плато); III – нерегулярно разряжающиеся нейроны (аутокоррелограмма характеризовалась отсутствием четко очерченных максимумов, т.е. примерно одинаковой вероятностью генерации импульсов на всем анализируемом участке фоновой активности). Нейроны с нестационарной активностью были объединены в IV группу.

Динамическую структуру импульсных потоков определяли путем вычисления сериальных коэффициентов корреляции. Коэффициенты корреляции последовательных межимпульсных интервалов рассчитывали для совокупности смежных интервалов (коэффициент корреляции первого порядка), пар межимпульсных интервалов, взятых через один, два интервала и так далее (до коэффициента корреляции 50-го порядка). Совокупность сериальных коэффициентов корреляции с их графическим представлением характеризовала динамику следования межимпульсных интервалов в текущей импульсной активности. В наших экспериментах была выявлена совокупность сериальных коэффициентов корреляции четырех типов. В совокупности первого типа все коэффициенты корреляции до 50-го порядка равнялись нулю, что указывало на независимое, чисто случайное появление межимпульсных интервалов той или иной длительности в анализируемом отрезке импульсного потока. При совокупности сериальных коэффициентов корреляции второго типа наблюдались только положительные и нулевые значения коэффициентов корреляции, что свидетельствует о локальных кратковременных увеличениях и уменьшениях частоты разрядов. Наличие положительных, отрицательных и нулевых значений коэффициентов корреляции в совокупности сериальных коэффициентов корреляции позволило полагать, что в фоновой активности возникали периодические изменения частоты в виде пачечных или групповых разрядов (третий тип динамики). Совокупность четвертой разновидности в отличие от описанных имела только положительные значения коэффициентов корреляции, что свидетельствует о тенденции к стойкому смещению (тренду) частоты текущей активности: ее учащению или урежению (монотонное изменение частоты разрядов).

Для оценки достоверности обусловленных вибрационными воздействиями изменений распределений нейронов ядра солитарного тракта по различным признакам использовался критерий χ^2 . Достоверность изменений средней частоты и коэффициента вариации оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение. В контрольной группе животных зарегистрировано 80 нейронов, из которых по степени регулярности межимпульсных интервалов в левостороннем ядре солитарного тракта преобладали единицы с нерегулярным типом разрядов (50 %). Число единиц с промежуточной по степени регулярности импульсной активностью составило 32,5%, клетки с нестационарной активностью - 17,5 %. В норме нейроны с регулярным типом следования импульсных потоков отсутствуют.

После 5-дневной вибрации число промежуточных и нестационарных нейронов уменьшилось в 2 и 11 раз соответственно, а количество нерегулярных единиц увеличилось в 1,6 раза ($p < 0,01$) (рис. 1, А). После 5- и 10-дневного вибрационного воздействия как и в норме отсутствуют единицы с регулярной активностью.

После 10-дневной вибрационной экспозиции уменьшилось число промежуточных единиц в 2,4 раза и увеличилось количество нерегулярных единиц в 1,7 раза ($p < 0,01$), в указанный период нестационарные единицы отсутствовали. 15-дневное вибрационное воздействие приводило к снижению количества промежуточных единиц в 1,1 раза, а нестационарных - в 5,4 раза. В данный период выявилось также незначительное повышение числа нерегулярных клеток в 1,3 раза и восстановление типа регулярных нейронов по степени регулярности межимпульсных потоков в 1,1% ($p < 0,01$). Вибрационное воздействие различной длительности (5,10,15 дней) привело к статистически значимым изменениям распределения фоновой импульсной активности нейронов ядра солитарного тракта по степени регулярности (рис. 1, А).

Динамические характеристики активности в контрольной группе животных распределялись следующим образом; значительную часть составляли нейроны с локальными изменениями частоты разрядов (43.8%); нейроны с пачечно-групповой и монотонными изменениями частоты разрядов представлены почти поровну и составили 27,5 и 28,7% соответственно (рис. 1, Б); нейроны со случайным следованием импульсных потоков отсутствовали как в норме, так и после 5-дневной экспозиции.

После 5-дневного вибрационного воздействия выявлена трансформация ритма. В данный период выявилось повышение количества нейронов с пачечно-групповой активностью почти в 2 раза, а единицы с локальными и монотонными изменениями частоты разрядов понизились в 1,2 и 2,5 раза соответственно ($p < 0,01$). После 10-дневного воздействия число пачечно-групповых единиц увеличилось в 1,7 раза по сравнению с нормой, а нейроны с монотонными изменениями импульсной активности уменьшились в 5,4 раза. Клетки со случайным следованием представлены 5,3 % ($p < 0,01$). После 15-дневного вибрационного воздействия нейроны с пачечно-групповой активностью превалировали в 2 раза, а число нейронов со случайным следованием, локальными изменениями частоты разрядов и монотонными изменениями межимпульсных интервалов уменьшилось в 2, 1,2, 4,5 раза соответственно ($p < 0,01$). По характеру динамической активности 5-, 10- и 15-дневная вибрация выявила статистически достоверные отклонения (рис 1, Б).

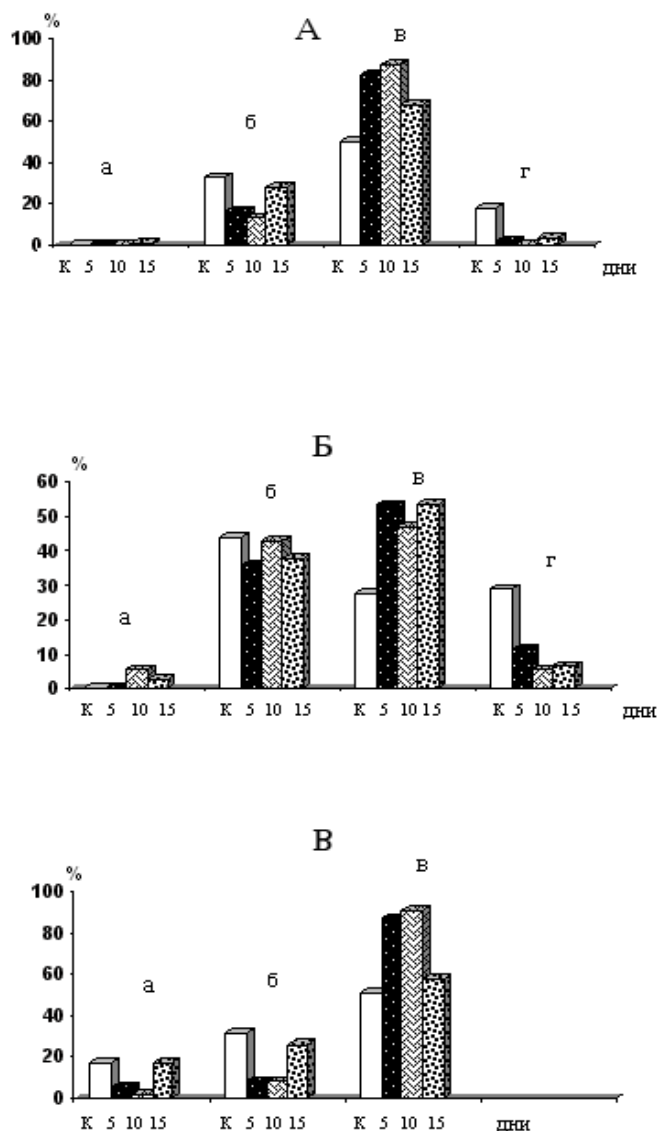


Рис. 1. Изменения относительного количества (%) нейронов ядра солитарного тракта с различной степенью регулярности фоновой импульсации (соответственно форме аутокоррелогограмм, А), динамическими типами активности (соответственно совокупности серийных коэффициентов корреляции 1-50-го порядков, Б) и типами гистограмм распределения межимпульсных интервалов фоновой активности (В).

На А: а – нейроны с регулярным, б – промежуточным по степени регулярности и в – нерегулярным характером следования импульсов; г – нейроны с нестационарной импульсацией. На Б: а – нейроны, которые генерируют фоновую активность, представляющую собой случайные последовательности импульсов, б – фоновую активность с локальными изменениями частоты импульсов, в – пачечную или групповую фоновую активность, г – фоновую активность с монотонными изменениями частоты разрядов. На В: а – нейроны с моно-, б – би- и в – полимодальными распределениями межимпульсных интервалов. В каждой группе столбцов слева направо – группа контроля (К) и группы с длительностью вибрационного воздействия 5, 10 и 15 дней.

Исследования параметров фоновой импульсной активности стационарных единиц ядра солитарного тракта по модальности межимпульсных интервалов показали, что в контрольной группе доминировали полимодальные нейроны (51,5%), а бимодальные и мономодальные единицы составляли соответственно 31,8% и 16,7%.

После 5- и 10-дневной экспозиции наблюдалось увеличение полимодальных единиц в 1,7 и 1,8 раз, уменьшение числа мономодальных – в 3,4 и 12,8 раза и бимодальных единиц – в 3,8 и 3,9 раза ($p < 0,01$) соответственно. После 15-дневного воздействия наблюдалась тенденция восстановления исходного уровня соотношений поли- би- и мономодальных единиц. Статистически достоверные изменения выявлены после 5- и 10- дневного воздействия (рис.1, В).

Анализ распределения нейронов ядра солитарного тракта по частотным диапазонам в контрольной группе показал, что доминирующим является среднечастотная (42,4%), низкочастотные и высокочастотные составляли 31,8% и 25,8% соответственно. Статистический анализ почастотного распределения нейронов показал, что достоверные изменения формировались во все сроки вибрационного воздействия. После 5- и 10- дневного вибрационного воздействия наблюдалось уменьшение числа высокочастотных единиц в 2,2 и 4,9 раза и увеличение среднечастотных в 1,4 и 1,3 раза соответственно. Группа низкочастотных единиц уменьшилась в 1,1 раз после 5-дневного воздействия и увеличилась в 1,2 раза после 10-дневного воздействия. 15-дневная экспозиция выявила повышение среднечастотных и высокочастотных единиц в 1,3 и 1,1 раза соответственно и понижение низкочастотных в 2,4 раза (рис.2).

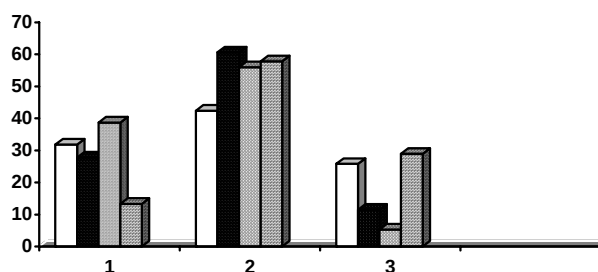


Рис. 2. Изменение относительных количеств нейронов (%), генерирующих (1) низко-, (2) средне- и (3) высокочастотную фоновую активность (<10, 11-30, > 31 Гц, 1-3 соответственно). За 100% принято общее количество нейронов в исследованных группах. По горизонтали – длительность вибрационного воздействия, группа контроля (К) и группы с длительностью вибрационного воздействия 5, 10 и 15 дней.

Анализ статистических показателей фоновой импульсной активности зарегистрированных клеток показал, что в динамике вибрационного воздействия после 5- и 10-дневной экспозиции наблюдаются достоверные изменения значений средней частоты импульсации ($p < 0,05$) (рис.3, 1).

Показатель же коэффициента вариации достоверно изменяется после 10- ($p > 0,05$) и 15-дневного воздействия ($p < 0,1$) (рис.3,2). Средняя частота импульсации нейронов ядра солитарного тракта контрольной группы составляла $22,5 \pm 2,4$ Гц, а коэффициент вариации $78,4 \pm 4,3$ % (рис 3, 1,2).

Анализ спонтанной импульсной активности левосторонних нейронов ядра солитарного тракта показал, что в течение всего эксперимента импульсация большинства клеток данного ядра характеризовалась стационарным течением.

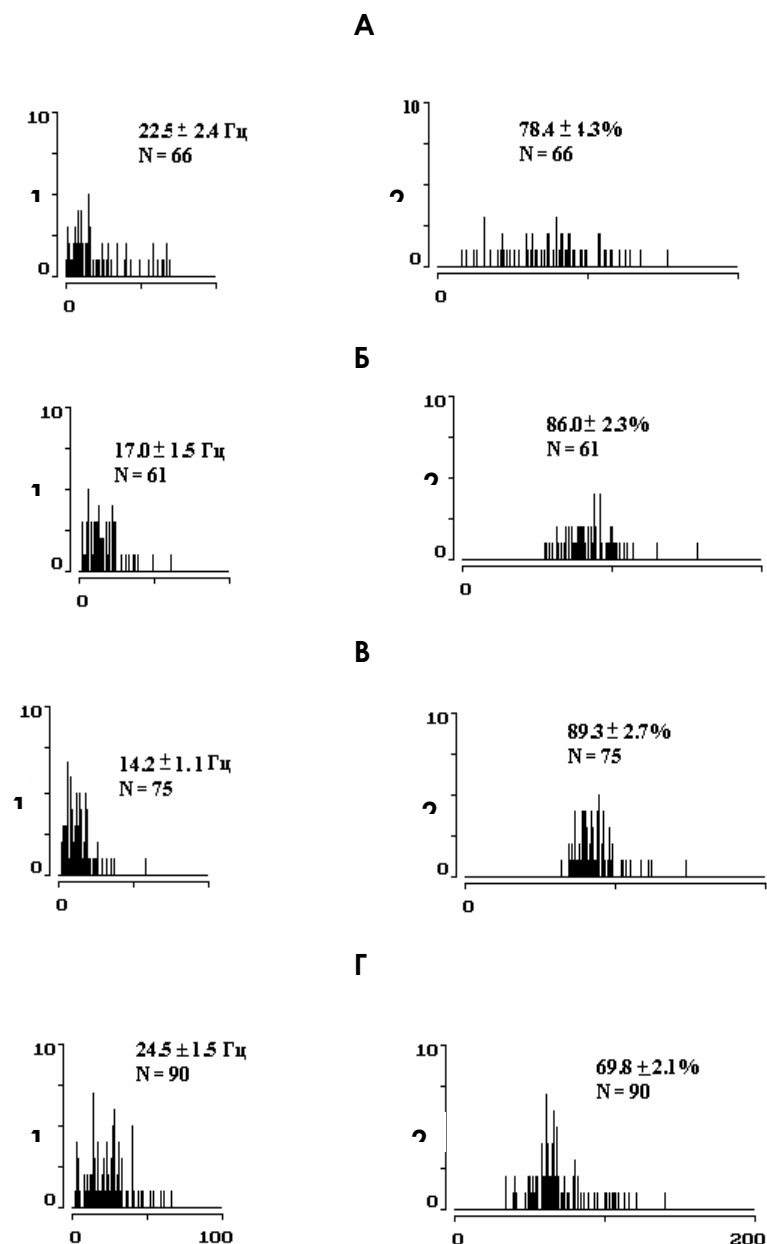


Рис. 3. Распределение средних значений частоты и коэффициентов вариации межимпульсных интервалов фоновой активности нейронов ядра солитарного тракта в группе контроля (А) и через 5, 10 и 15 дней с сеансами вибрационного воздействия (Б-Г соответственно).

Над гистограммами указаны среднегрупповые частоты (1, Гц), значения среднего коэффициента вариации (2, %) и количество исследованных нейронов (N).

Аутокорреляционный анализ показателей выявил в различных периодах исследований преимущественно нерегулярное распределение межимпульсных интервалов со среднечастотной фоновой импульсацией. Механизм формирования среднечастотного паттерна фоновой активности нейронов ядра солитарного тракта в настоящее время не известен. Возможно, что основную роль в его формировании играют особенности организации внутриядерных и межнейронных связей, а также афферентные входы, в частности от первичных афферентов блуждающего нерва [12].

Известно, что ядро солитарного тракта содержит в основном небольшие клетки ретикулярного типа [4]. Афферентные терминалы блуждающего нерва образуют, как правило, множественные аксо-дендритные синапсы на дендритах нейронов этого ядра [13], что создает эффективные условия для модуляции возбудимости нейрона, в то время как для инициации специфического разряда необходима пространственно-временная суммация постсинаптических потенциалов. По-видимому, они играют ведущую роль в генезе фоновой импульсации нейронов. Можно предположить, что эти же особенности внутренней организации и свойств афферентных входов в ядро являются определяющими в формировании паттернов ответов его нейронов после вибрационного воздействия.

После вибрационного воздействия наблюдались выраженные сдвиги в динамических характеристиках импульсации нейронов.

Особо следует подчеркнуть увеличение количества пачечно-групповых нейронов с малой длительностью и высокой внутripачечной частотой, которые чередовались с одиночной импульсной активностью, что свидетельствовало о возбуждающем влиянии вибрации на вестибуло-сенсорную систему. Увеличение числа импульсов в пачке, по-видимому, является следствием не только возбуждающего влияния вибрации, но и нарушения механизмов тормозного электрогенеза. Увеличение потоков афферентной импульсации от лабиринтов, мозжечка, спинного мозга и других структур к вестибулярным ядрам при вибрации приводит к изменению их возбудимости и функциональной активности [7, 8]. Продолжительность пачечных разрядов, вероятно, в значительной степени определяется существованием внутри исследуемой структуры механизма возвратного торможения, ограничивающего эту длительность. Согласно данным Балабана и Березкина [10], существуют прямые проекции вестибулярных ядер в область ствола мозга, которые связаны с вегетативными функциями. Антероградно маркированные аксоны из каудальной части медиального и нижнего вестибулярных ядер прослеживаются билатерально до ядра солитарного тракта.

Под воздействием вибрации происходят нарушения вестибуло-вегетативных реакций, которые осуществляются через мозжечок, тесно связанный с вегетативной нервной системой, а также через ретикулярную формацию, которая посылает импульсы к гипоталамо-гипофизарному комплексу, регулирующему сердечно-сосудистую, дыхательную системы, температуру тела, водно-солевой обмен, эндокринные функции и др. При длительном действии вестибулярных стимулов участие вегетативных компонентов в ответных реакциях организма резко возрастает и может привести к возникновению реакции напряжения.

При этом включается весь комплекс защитно-вестибулярных реакций организма. Следовательно, чрезмерное по длительности вестибулярное раздражение является типичным стрессовым фактором, вызывающим в организме характерные для этого фактора реакции. Снижение функциональной устойчивости вестибулярной сенсорной системы и ее чувствительности вызывает не только неадекватные вегетативные реакции, но и нарушение точности выполнения перемещений тела в пространстве [2, 5, 6].

Особого внимания заслуживает сложная динамика средней частоты фоновой активности в исследованных группах нейронов ядра солитарного тракта и относительного количества нейронов разной частоты после вибрационных воздействий различной длительности. Так, после 5-и и 10-и дней вибрационных воздействий существенно уменьшалась доля клеток с высокой частотой фоновой активности (свыше 31 Гц), что отражалось в понижении средней частоты нейронных разрядов. Одним из возможных объяснений подобного эффекта может служить предположение о существовании тормозных входов в области ядра солитарного тракта от части афферентных волокон блуждающего нерва. Повышение интенсивности потоков афферентной импульсации от лабиринтов, мозжечка, спинного мозга, желудочно-кишечного тракта и других структур к ядру солитарного тракта во время вибрации приводит к синаптической возбудимости нейронов и соответственной трансформации их функциональной активности. Именно в этот период в деятельности нейронов ядра солитарного тракта выявляются основные пластические перестройки. Известно, что расположение синапсов на дендритах нейрона более эффективно для модуляции его возбудимости, нежели для вызова специфического разряда. Подобная синаптическая организация афферентного входа в ядро солитарного тракта, преобладание в нем нейронов ретикулярного типа, обширные афферентные связи, а также собственные свойства нейронов [11] в значительной степени определяют характер и частоту фоновой активности нейронов данной структуры. Характер изменения активности отражает процесс переработки висцеральной афферентной импульсации в ядре солитарного тракта и, возможно, направлен на обеспечение оптимального для данного воздействия уровня функционального состояния бульбарных висцеральных нейронов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Альтова Л. С.* Организация межнейронных связей. Сб. работ. М. 1967.
2. *Баклаваджян О. Г.* Висцеросоматические афферентные системы гипоталамуса. Л., Наука, 1985.
3. *Грин З. А., Ибрагимов И. И., Вайнеровская А. И.* Гигиена труда и профзаболеваний, 12 (4): 26-28. 1983.
4. *Жукова Г. П.* Нейронное строение и межнейронные связи мозгового ствола и спинного мозга. М., Медицина. 1977.
5. *Кисляков В. А., Орлов И. В.* Физиология сенсорных систем. Л., Медицина, 1976.
6. *Крыжановская И. И., Клейко В. М.* Врачебное дело, 6: 113-114, 1988.
7. *Минасян С. М., Баклаваджян О. Г., Саакян С. Г., Саркисян С. Г., Адамян Ц. И., Геворкян Э. С. Ж.* ВНД. 47(4): 701-707, 1997.

8. Минасян С. М., Саакян С. Г., Саркисян С. Г. Сенсорные системы. 2002, 16(2):155-159.
9. Селицкий Г. Д., Федоров С. М., Кулагин В. И. Вестник дерматологии и венерологии. 2: 25-28. 1999.
10. Balaban C. D., Beryozkin G. Neuroscience. 62 (4): 1217-1236, 1994.
11. Chapagnat J., Denait-Saubie M., Grant K., Shen K. F. J. Physiology (London). 381: 551-573. 1986.
12. Cottle M. K., Calaresu F. R. J. Comp. Neurol. 161 (1): 143-152. 1975.
13. Gwyn D. G., Wilkinson P. H., Leslie R. A. Neuroscience Letter. 28 (2): 139-143. 1982.
14. Hlavacka F., Krizkova M., Horak F.B. Neuroscience Letter. 189 (1): 9-18. 1995.
15. Ivanenko Y., Grasso R., Lacquaniti F. J. of Physiology. 519 (1): 201-214. 1999.
16. Norgzen R. Neuroscience. 3 (2): 207-218. 1978.
17. Paxinos G., Watson Ch. The rat brain in stereotaxic coordinates. New-York: Acad.Press. 376p., 2005.
18. Petersen R., Andersen M., Mikkelsen S., Nielsen S. L. Occup and environ. medicine. 52 (2): 110-115. 1999.
19. Ricardo J. A., Koh E. T. Brain Res. 153 (1): 1-26. 1978.
20. Wierbricka M. M., Gilhodes J. C., Poll J. P. Experimental Brain Research. 125 (1): 1-13. 1999.

Поступила 11.12.2008



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
•Experimental and Theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1 (61), 2009

ԷԼԵԿՏՐԱԻՆԴՈՒԿՑՎԱԾ ԱԶԱՏ ՌԱԴԻԿԱԼՆԵՐԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄՈՂԵԼԱՑԻՆ ԵՎ ԲՆԱԿԱՆ ԹԱՂԱՆԹՆԵՐԻ ԼԻՊԻԴՆԵՐԻ ԳԵՐՕՔՍԻԴԱՅԻՆ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Թ.Ե. ՄԵՖԵՐՅԱՆ

Երևանի պետական համալսարան, կենսաֆիզիկայի ամբիոն

Ուսումնասիրվել է էլեկտրաինդուցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպիդային երկշերտ կառույցներ հանդիսացող լիպոսոմների, ինչպես նաև *Escherichia coli* բակտերիաների K12 (վայրի տիպ) շտամի վրա: Բացահայտվել է, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալներն ունեն բավական երկար կյանքի տևողություն և ակտիվորեն փոխազդում են լիպիդային երկշերտ կառույցների հետ, առաջացնելով լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում, որն արտահայտվում է քիմիումինեսցենսման ինտենսիվության մակարդակի և լիպիդների օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի կոնցենտրացիայի ավելացմամբ:

*Լիպոսոմ - ազատ ռադիկալներ - էլեկտրաքիմիումինեսցենսում -
Escherichia coli K12*

Исследовано влияние постэлектроиндуцированных свободных радикалов на липидные бислойные мембраны – липосомы, а также на бактерии *Escherichia coli* K12. Выявлено, что постэлектролизные свободные радикалы имеют довольно продолжительное время жизни и активно взаимодействуют с бислойными липидными структурами, вызывая перекисное окисление липидов, которое проявляется повышением интенсивности хемилюминесценции и концентрации конечного продукта перекисного окисления липидов - малонического диальдегида.

*Липосома - свободные радикалы - электрохемилюминесценция -
Escherichia coli K12*

The influence of electro-induced free radicals on lipid bilayer membranes – liposomes as well as on the bacterium *Escherichia coli* K12 is investigated. It is revealed that post-electrolyzed free radicals have a significantly long life time and actively interact to bilayer lipid structures causing lipid peroxidation, which is evidenced by an increase in the intensity of chemiluminescence and the concentration of the end-product of lipid peroxidation- malonic dialdehyde.

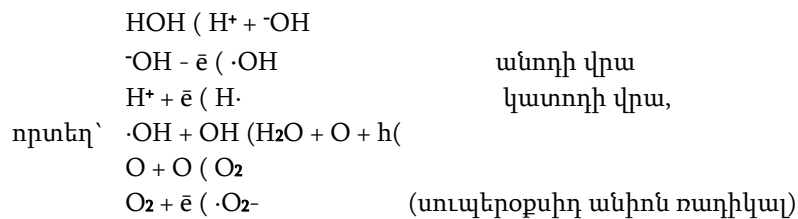
Liposome - free radicals – electrochemiluminescence - Escherichia coli K12

Ներկայումս բժշկության մեջ լայն տարածում են ստացել էլեկտրաբուժական միջոցները: Վերջիններս կիրառվում են կենտրոնական և պերիֆերիկ նյարդային, սրտանոթային, հենաշարժողական, աղեստամոքսային, տեսողական և այլ համակարգերի խանգարումների բուժման ժամանակ [3]:

Չնայած այն հանգամանքին, որ այս մեթոդները բավականին խորապես ուսումնասիրվել են ֆիզիկաքիմիական տեսակետից, այնուամենայնիվ բջջային տարբեր կառույցներում ընթացող որոշ պրոցեսներ դեռևս լիովին բացահայտված չեն՝ մասնավորապես էլեկտրական հոսանքի ազդեցության ժամանակ առաջացող ազատ ռադիկալների փոխազդեցությունը բջջի թաղանթային կառույցների հետ:

Ներկայացվող աշխատանքում դիտարկվել է էլեկտրաինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունը թաղանթային մոդել հանդիսացող լիպոսոմների և որպես մոդելային բջջային համակարգ ընտրված *Escherichia coli* բակտերիաների K12 շտամի վրա:

Հայտնի է, որ էլեկտրոլիզի ժամանակ էլեկտրոլիտում առաջանում են քիմիապես ակտիվ արգասիքներ՝ ազատ ռադիկալներ՝ $\text{HO}\cdot$, $\text{HOO}\cdot$, $\cdot\text{OO}\cdot$, H_2O_2 , $\text{H}\cdot$, որոնցից առավել մեծ ակտիվությամբ օժտված են թթվածնային ակտիվ արգասիքները: Վերջիններիս առաջացման հավանական մեխանիզմը բերվում է ստորև [1]:



Պարզ էլեկտրոլիտիկ համակարգերում, օրինակ KCl-ի ջրային լուծույթում, նույնպես առաջանում են հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալներ, որոնց առաջացրած շղթայական ռեակցիաներն ունեն բավական երկար հետէլեկտրոլիզային տևողություն: Վերջինիս հաստատուն ինտենսիվությամբ փոփոխվող տևողությունը կազմում է մոտ 40 ր [7]:

Նյութ և մեթոդ: Լիպոսոմների ստացման համար օգտագործվել է խոշոր եղջերավոր անասունի ուղեղից Մյուլլերի մեթոդով անջատված ընդհանուր ֆոսֆոլիպիդները [9]: Լիպոսոմները ստացվել են 0,1 Մ KCl լուծույթում 0,01 մգ/մլ կոնցենտրացիայով ֆոսֆոլիպիդների կախույթի գերձայնային մշակման եղանակով [4, 10, 6]:

Ազատ ռադիկալների ինդուկցման համար որպես միջավայր վերցվել է 3 մլ 0,1 Մ KCl լուծույթ, քանի որ այն հանդիսանում է բարձր էլեկտրաքիմիամիներսկային վերաբարձրողականություն ունեցող պարզ համակարգ և միաժամանակ հանդիսանում է հյուսվածքներում միջբջջային հեղուկ միջավայրի բաղադրամաս: Ինդուկցումը իրականացվել է օպտիկական բաժակում ընկղմված պլատինե կետային էլեկտրոդների վրա 15 Վ 250 մԱ հաստատուն հոսանքի ներդրմամբ: Էլեկտրոդների միջև հեռավորությունը կազմել է 20 մմ: Կիրառված հոսանքը համադրելի է էլեկտրաբուժական (օրինակ՝ ֆրանկլինիզացման, գալվանիզացման, դեղային էլեկտրոֆորեզի մեթոդները և դրանց բոլոր տարատեսակները) մեթոդներում կիրառվող հոսանքին, որը սովորաբար կազմում է 30-80 Վ 50 մԱ [3]:

Դիտարկվող ազատ ռադիկալային մեխանիզմով ընթացող գործընթացների ուսումնասիրման համար ընտրվել են քիմիամիներսկային (ՔԼ) անալիզի և մալոնալին երկալդեհիդի սպեկտրոֆոտոմետրիկ որոշման մեթոդները:

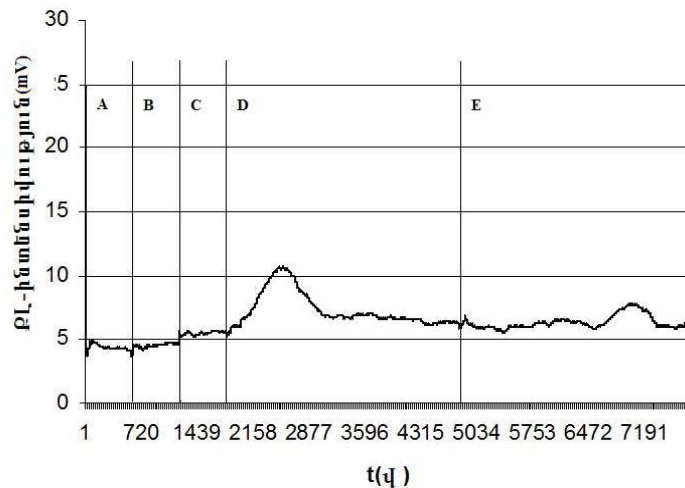
ՔԼ անալիզը իրականացվել է քվանտոմետրիկ սարքի միջոցով [1]: Ստացված տվյալների գրանցումը և մշակումը իրականացվել է NI LabVIEW գրաֆիկական ծրագրավորման միջավայրում գործող Archimedes ծրագրով [5, 2]: Գրանցված ՔԼ կինետիկական կորերում ստացված արժեքների միջին թվաբանականի շեղումները չեն գերազանցում 5%:

Լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման վերջնական արգասիքի՝ մալոնային երկալդեհիդի (ՄԵԱ) քանակական որոշումը իրականացվել է սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակով՝ 2-թիոբարբիտուրաթթվի թեստի միջոցով, CՓ-46-ի օգնությամբ, 532 նմ ալիքի երկարության տակ [6]:

E. coli K12 (վայրի տիպ) շտամը աճեցվել է անաերոբ պեպտոնային միջավայրում (pH 7,2-7,4), 0.2 % գլյուկոզի ավելացմամբ: Բակտերիաները աճեցվել են 18 ժ, 37° ջերմաստիճանում: Բակտերիաների զանգվածը ստացվել է աճման միջավայրը 20 ր 5000 պտ./ր արագությամբ կրկնակի ցենտրիֆուգմամբ, որտեղ միջանկյալ լուծիչ է հանդիսացել թորած ջուրը [8, 11]: Բակտերիաների փորձարարական կախույթը ստացվել է անջատված բակտերիաների զանգվածը 100 անգամ թորած ջրով նոսրացնելու միջոցով: Չափումներն կատարվել են 20° ջերմաստիճանում:

Արդյունքներ և քննարկում: Մինչ այժմ, էլեկտրաքիմիումինեսցենտային բնույթի անալիզներում փորձարկվող նմուշները, որոնք ներմուծվում էին ազատ ռադիկալային միջավայր, նույնպես ենթարկվում էին հոսանքի ազդեցությանը՝ առաջացնելով նոր տիպի ազատ ռադիկալներ և ռադիկալային գործընթացներ, խոչընդոտելով ստացված արդյունքների մեկնաբանմանը:

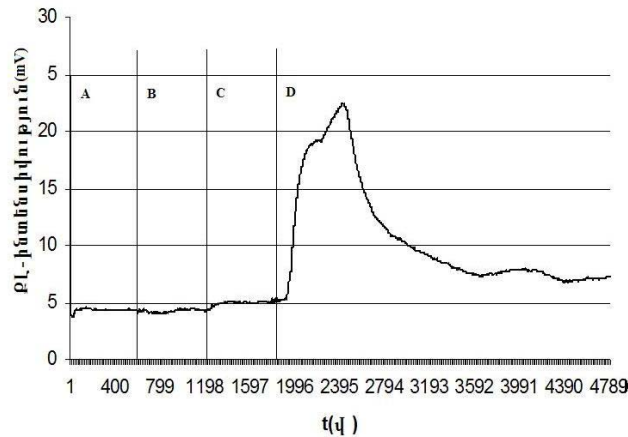
Մեր կողմից էլեկտրաքիմիումինեսցենտոման ստացիոնար փուլում, հոսանքն անջատելուց հետո, գրանցվել է հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոման փաստը: 0,1 Մ KCl համակարգում, ինչպես երևում է նկ.1-ում, հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոման ունի բավական տևական շարունակական ստացիոնար մակարդակ [7]: Վերջինս վկայում է միջավայրում ազատ ռադիկալների առկայության մասին՝ ներդրված լարման բացակայության պայմաններում:



Նկ.1. KCl-ի լուծույթի էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը և հետէլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը.

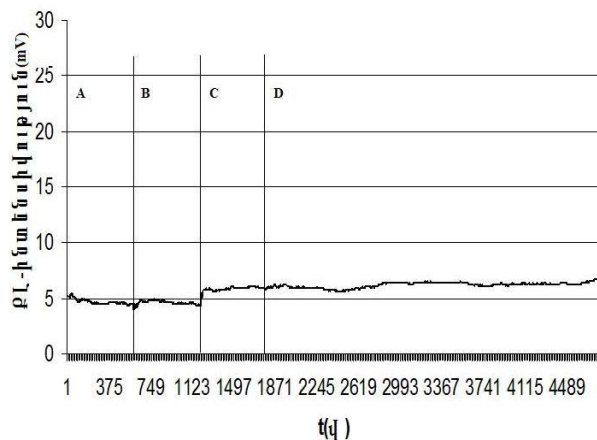
- A. Սարքի ներքին ֆոն,
- B. Սարքի բաց ֆոն (սարքի ներքին ֆոնը և խցիկի ու օպտիկական բաժակի լյումինեսցենտոմը միասին),
- C. KCl-ի լուծույթի սպոնտան ՔԼ,
- D. KCl-ի լուծույթի էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը,
- E. KCl-ի լուծույթի հետ էլեկտրաքիմիումինեսցենտոմը:

Հաշվի առնելով այս հանգամանքը հաջորդ շարք փորձերում դիտարկվել է հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալների ազդեցությունը լիպոսոմների վրա: Հետէլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ-ի ավելացումը 3 մլ լիպոսոմային կախույթի վրա առաջ է բերում ՔԼ ինտենսիվության կտրուկ բռնկումային աճ մինչև որոշակի մակարդակ, ապա կինետիկորեն մարում մինչև լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ մակարդակից բավականին բարձր ստացիոնար փուլ (նկ. 2, D):



Նկ. 2. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն կինետիկան
էլեկտրահաղորդական
ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ.
A. Սարքի ներքին ֆոն,
B. Սարքի բաց ֆոն,
C. Լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ,
D. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն էլեկտրահաղորդական
ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ:

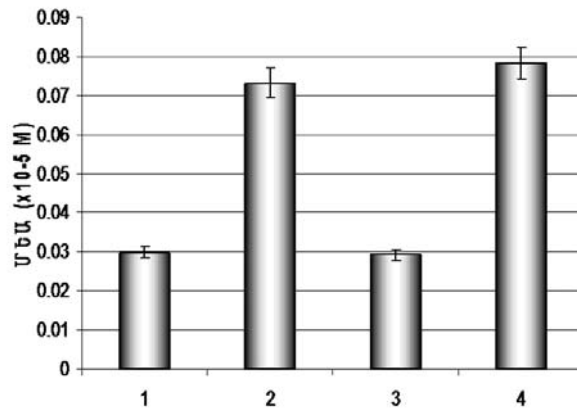
Ստուգիչ փորձերում, երբ 3 մլ լիպոսոմային կախույթի վրա ավելացվել է 0,5 մլ 0,1 Մ KCl լուծույթ, զերծ նախնական ներգործությունից, ՔԼ ինտենսիվության որևէ նկատելի փոփոխություն չի գրանցվել (նկ. 3):



Նկ. 3. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն KCl լուծույթի ավելացումից հետո.
A. Սարքի ներքին ֆոն,
B. Սարքի բաց ֆոն,
C. Լիպոսոմային կախույթի սպոնտան ՔԼ,
D. Լիպոսոմային կախույթի ՔԼ-ն KCl լուծույթի ավելացումից հետո:

Ինչպես հայտնի է, լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացման գնահատման ուղղակի եղանակներից է ՄԵԱ-ի որոշումը 2-թիոբարբիտուրաթթվի միջոցով [1]: Ի լրացում ՔԼ անալիզի մեթոդին կատարվել է էլեկտրահաղորդական ազատ ռադիկալների ազդեցությամբ պայմանավորված ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխության գնահատում լիպոսոմային կախույթում:

Չափումները ցույց տվեցին, որ էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության արդյունքում լիպոսոմային կախություն ՄԵԱ-ի քանակը գրեթե 160%-ով ավելացել է (նկ. 4. 1, 2):



Նկ. 4. ՄԵԱ-ի քանակական փոփոխությունը լիպոսոմային կախություն և *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն.

1. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախություն,
2. ՄԵԱ-ի քանակը լիպոսոմային կախություն էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունից հետո,
3. ՄԵԱ-ի քանակը *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն,
4. ՄԵԱ-ի քանակը *E. coli* K12 բակտերիաների կախություն էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցությունից հետո:

Լիպոսոմային կախություն գրանցված ՔԼ ինտենսիվության և ՄԵԱ-ի քանակական աճը վկայում է այն մասին, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալները փոխազդում են լիպոսոմներում լիպիդային երկշերտի հետ, առաջ բերելով ազատ ռադիկալային շղթայական մեխանիզմով ընթացող լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:

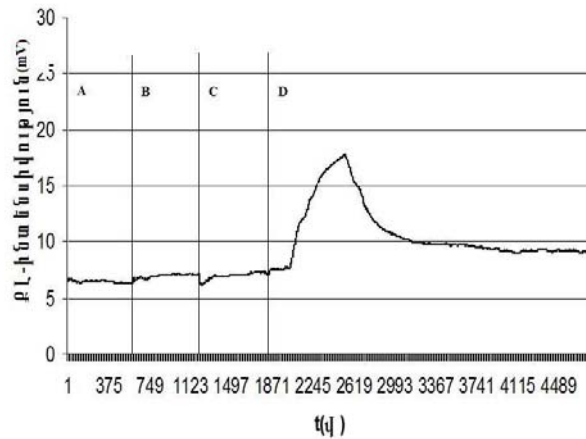
Պարզելու համար, թե արդյոք ստացված արդյունքները համադրելի են նատիվ բջջային լիպիդային կառույցների համար, փորձերը կրկնվեցին, որպես էլեկտրահնդուկցված ազատ ռադիկալների թիրախ ընտրելով *E. coli* K12 բակտերիաները:

Ինչպես երևում է նկ.5-ում, 3 մլ բակտերիաների կախությի վրա հետ էլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ-ի ավելացումը առաջ է բերում ՔԼ ինտենսիվության կտրուկ բռնկումային աճ հետագա մարմամբ: Վերջնական փուլում ՔԼ ինտենսիվությունը անցնում է, բակտերիաների կախությի սպոնտան ՔԼ մակարդակից բավականին բարձր ստացիոնար մակարդակ (նկ. 5, D):

Ինչպես լիպոսոմների կախություն, այնպես էլ բակտերիալ կախություն, հետէլեկտրոլիզային լուծույթի 0,5 մլ ավելացումը առաջ է բերում ՄԵԱ-ի քանակի զգալի աճ 160% (նկ. 4. 3,4):

Այսպիսով, կարելի է ենթադրել, որ էլեկտրաբուժման ժամանակ էլեկտրական ազդակի ներգործման մեխանիզմներից է հյուսվածքներում ազատ ռադիկալների ինդուկցումը և վերջիններիս միջոցով բջջի լիպիդային կառույցների գերօքսիդային օքսիդացումը, որը շարունակվում է նաև ազդակի ներգործությունից հետո:

Ստացված արդյունքները վկայում են այն մասին, որ հետէլեկտրոլիզային ազատ ռադիկալները ունեն կյանքի բավական երկար տևողություն և փոխազդում են բջջի լիպիդային կառույցների հետ, առաջ բերելով լիպիդների գերօքսիդային օքսիդացում:



Նկ. 5. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի ՔԼ-ն կինետիկան էլեկտրա-
ինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ.
A. Սարքի ներքին ֆոն, B. Սարքի բաց ֆոն,
C. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի սպոնտան ՔԼ,
D. *E. coli* K12 բակտերիաների կախույթի ՔԼ-ն էլեկտրա-
ինդուկցված ազատ ռադիկալների ազդեցության ժամանակ:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Ջաբարյան Ա. Ե., Ներկարարյան Ա. Վ., Պողոսյան Գ. Հ., Այվազյան Ն. Մ.* Ազատ ռա-
դիկալային գործընթացների և թաղանթային կառույցների կենսաաֆիզիկա: Երևան,
Նորք գրատուն, 2003.
2. *Թոչումյան Ա., Բաղդասարյան Կ., Փոլադյան Ա., Կենսաբանական թաղանթների կեն-
սաֆիզիկա և կենսաէներգետիկա:* Լաբորատոր աշխատանքների ձեռնարկ: Երևան,
Կրթական բարեփոխումների կենտրոն, 2003.
3. *Боголюбов Б.М., Пономаренко Г.Н.* Общая физиотерапия, С-Петербург,
СПИ, 1998.
4. *Кагава Я.* Биомембраны. М., Высш. шк., 1985.
5. *Пименова М.Н., Гречушкина Н.Н, Азова Л.Г., Семенова Е.В., Мыльникова
С.И.,* Руководство к практическим занятиям по микробиологии (под. ред.
Н.С. Егорова), М., Издательство Московского университета, 1983.
6. *Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г.* Современные методы в биохимии (под.
ред. Ореховича В. Н.), М., Медицина, 1977.
7. *Huang C.,* Biochemistry, 8, 344, 1969.
8. *Muller P., Rudin D., Tien H., Wescott W.,* J. Phys. Chem., 67, 534, 1963.
9. *Zakharyan A. E., Seferyan T. Ye., Zakharyan N. A., Toonyan Y. M., Trchounyan
A. H.,* Scientific-Medical Journal of INPH of Armenia, N 2, 87, 2007.
10. *Zakharyan A. E., Seferyan T. Ye.* “Influence of Post Electro-Induced Free
Radicals on Chemiluminescence of Liposomes” The Eighth International
Conference on Systems Biology 1-6 October, 2007, Long Beach , CA USA.
11. *Zakharian A.Ye., Elbakyan V.L., Ayvazian N.M., Pogosyan G.H., Zakharian
N.A., Sefe-ryan T.Ye.* “Basis of chemiluminescence analysis and program
equipment LabVIEW for automatic registration and mathematical elaboration
of datas” Educational, scientific and engineering additions in LabVIEW
surroundings and National Instruments technologies – International scientific-
practical conference: Red. RUFN, 429p. 17-18 November, Moscow, 2006.

Ստացվել է 15.01.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Biolog. Journal of Armenia, 1 (61), 2009

CLEAN DEVELOPMENT MECHANISM (CDM) POTENTIAL FOR PROMOTING SUSTAINABLE DEVELOPMENT IN ARMENIA

N.S. HARUTYUNYAN¹, N.S. AVETISYAN², K.L. MANUKYAN^{1,3}

¹NGO “Women for Green Way for Generations”, Armenia

²Yerevan State University, Dep. of Ecology and Nature Protection,

³Institute of Molecular Biology of National Academy of Sciences, Armenia

Armenia is actively engaged in processes of tackling global warming challenges, particularly, within the Kyoto Protocol's Clean Development Mechanism (CDM) framework. Besides being regional leader in number of registered CDM projects, Armenia was the first to have Executive Board's registered CDM project. Currently, there are a number of CDM projects in different status of development in Armenia. However, to avoid falling into the trap of “low hanging fruit” (projects which are cost-efficient, but have poor sustainable development co-benefits) there is a need to concentrate more efforts on designing projects with higher non-carbon benefits, such as renewable energy and energy efficiency, for which the country possesses considerable potential.

Climate change – CDM – sustainable development

Հայաստանը ակտիվորեն ներգրավված է գլոբալ տաքացման դեմ պայքարի գործընթացում, մասնավորապես Կիոտոյի արձանագրության մաքուր զարգացման մեխանիզմի (ՄՁՄ) շրջանակներում: Գրանցված ՄՁՄ ծրագրերի քանակով Հայաստանը հանդիսանալով տարածաշրջանային առաջատար՝ նույնպես եղել է ՄՁՄ ծրագիր գրանցող առաջին երկիրը: Ներկայումս Հայաստանը ունի զարգացման տարբեր փուլերում գտնվող մի քանի ՄՁՄ ծրագրեր: Սակայն խուսափելու համար “մատչելի պտուղներ”-ի (ծրագրերի, որոնք շահութաբեր են, բայց ունեն կայուն զարգացման արդյունավետության ցածր գործակից) ծուղակը ընկնելուց անհրաժեշտ է ջանքերը կենտրոնացնել մշակելու համար ծրագրեր՝ ոչ ածխաթթվային օգուտների ավելի բարձր գործակցով, ինչպես օրինակ վերականգնվող էներգիայի և էներգաարդյունավետության ծրագրերը, որոնց իրականացման համար երկիրը տիրապետում է զգալի կարողությունների:

Կլիմայի փոփոխում - ՄՁՄ - կայուն զարգացում

Армения активно вовлечена в процесс борьбы с глобальным потеплением, в частности, в рамках Механизма чистого развития (МЧР) Киотского Протокола. Являясь региональным лидером по количеству зарегистрированных МЧР проектов, Армения также была первой страной, зарегистрировавшей МЧР проект. В настоящее время Армения имеет несколько МЧР проектов на различных стадиях развития.

Однако, во избежание попадания в ловушку “легко доступных фруктов” (проектов, которые рентабельны, но имеют низкую эффективность по устойчивому развитию), необходимо сконцентрировать усилия на разработку проектов с более высоким уровнем некарбоновых выгод, таких как проекты по возобновляемой энергии и энергоэффективности, для осуществления которых страна обладает значительным потенциалом.

Изменение климата - МЧР - устойчивое развитие

Introduction

The global climate change regime has evolved under the United Nations Framework Convention on Climate Change (UNFCCC) since 1992. The Kyoto Protocol became a subsequent development of climate policy architecture. It stipulates binding targets for industrialized Annex B countries to reduce six greenhouse gases (GHGs) by an average of 5.2% compared with 1990 emissions baseline. The peculiarity of the Protocol is that it does not stipulate any emission restriction targets for developing countries. Nonetheless, it encourages voluntary participation of developing countries in the global effort of mitigating climate change through cooperating in clean development mechanism (CDM) project activities and benefiting from technology transfer and furthering their sustainable development goals.

CDM Market Trends

Among carbon markets, in terms of generated certified emission reductions (CERs), the CDM is the second largest market after European Emissions Trading Scheme. With the first project registered in September 2003, the CDM portfolio in mid 2008 contained 3498 CDM projects in pipeline with the amount of issued 152 million CERs [5].

At the time of writing, there are around 50 developing countries hosting CDM projects. Figure 1 shows the geographical distributional pattern of projects registered and in pipeline. The smallest portion fallen to Europe and Central Asia countries is divided between four countries: Armenia (4 registered projects), Cyprus (2 projects), Moldova (3 projects) and Georgia (1 project).

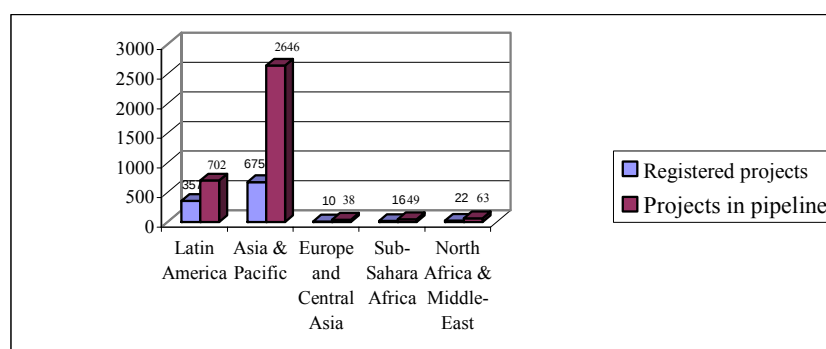


Fig 1. Regional distribution of CDM projects as of July 2008

CDM and sustainable development

Within the Kyoto framework currently there are no specific internationally recognized sustainable development standards. Developing countries need to define

specific country-related sustainable development criteria based on their development priorities. The common approach is based on three dimensions of sustainable development funneled to national level and framed in the CDM context.

Prevailing discussions and analysis suggested that energy sector orientted CDM projects (energy generation, renewable energy, transportation, energy efficiency) have the highest potential of abating GHG emissions together with creating multiple positive side impacts on sustainable development indicators. In particular, energy efficiency and renewable energy projects make valuable contribution to improving energy security supply, enhancing access to energy services, reducing local air pollution, creating local jobs and income, and, thus, alleviating the poverty. Specifically, solar CDM projects rank the highest on provision of development benefits. For example, solar PV (photo-voltaic) creates improved and increased access to electricity, employment, welfare and better learning possibilities [4]. On the contrary, large F-gas projects generate almost no development benefits. End-of-pipe projects, such as landfills or industrial processes, designed for capturing and decomposing N_2O and CH_4 gases are of same category projects – “low hanging fruit”, which are based purely on low cost emission reduction rationality without non-carbon contribution.

CDM framework in Armenia

Armenia ratified the UNFCCC in May 1993. For meeting its commitments under the Convention, Armenia implemented a number of activities and programmes, including development of national GHG inventory, capacity building, technology needs assessment, preparation of National Communications, Action Plans, etc. In December 2002, Armenia ratified Kyoto Protocol as a non-Annex B country, meaning no quantified GHG emission limitation and reduction commitment.

For participating in emission trading within Kyoto, as a foremost step, after Kyoto ratification, there was a need to establish the Designated National Authority (DNA). Already in September 2003, Armenia notified the UNFCCC Secretariat about assignment of the Ministry of Nature Protection as DNA for CDM operations in Armenia [6]. It should be noted, that institutional rigidities such delays in DNA establishment (sometimes due to inter-ministerial conflicts) and inefficiency of DNA performance became a serious impediment for many developing countries to participating in CDM for several years. In Armenia, with technical and financial assistance of different international institutions, the DNA succeeded in welltime organising effective capacity building activities for strengthening its technical expertise and institutional base. A number of CDM-related regulatory and procedural measures were also implemented for creating a favourable environment for CDM operation.

The Armenian DNA does not have official procedure for assessing sustainable development component of CDM projects. For evaluation, the Armenian DNA has developed a list of criteria reflecting environmental, economic, social and political aspects of sustainable development perspectives of the country. The Armenian DNA has identified energy efficiency improvement and development of renewable energy sources as Priority 1 areas for CDM project implementation (see Table 1). Also, projects that claim technology transfer are considered as favorable for achievement of sustainable development in the country [3]. Sustainable impacts of projects are assessed by different governmental institutions that are participating

in the process of CDM project evaluation. However, as practice shows, this kind of approach can cause inter-ministerial conflicts. Different ministries based on their own priorities may claim on completely opposite solutions for the CDM project which is passing assessment, as it was a case with one of the landfill gas capture CDM projects in Armenia. Therefore, development of more formal comprehensive set of sustainable development assessment procedures and rules for weighting and scoring the combination of quantifiable and nonquantifiable attributes of CDM project options is of urgent need. This would allow more balanced and effective decision-making based on the obtained overall values of assessed options with CDM projects that score a maximum score to be finally selected.

Analysis of CDM projects in Armenia

Thanks to prompt actions of the DNA, an effective national institutional structure was established that harnessed the CDM potential and attracted investors at an early stage of CDM market development. Thus, Armenia is a first country among former Soviet countries to have registered project by the CDM Executive Board (EB) in November 2005 [3]. Moreover, at the time of this writing, Armenia is a leader in number of registered CDM projects among non-Annex B countries of Europe and Central Asia region. Armenia accounts for 40% of all registered projects in the region. In addition to 4 registered projects, in the CDM pipeline there are 3 more projects at validation stage. In total, these 7 projects submitted from Armenia are expected to generate 1900 kCERs to 2012. Thus, Armenia's share in CDM market amounts to 0.2% of volumes (number of projects) and 0.1% of value (total 2012 CERs expected from all the CDM projects currently in the pipeline). At first sight, it may look like a small portion, but when considering the Armenia's share of 0.02% in total of non-Annex B GHG emissions, one can see how much the CDM "pie" share is larger than proportion of GHG emissions [2]. With this respect, Armenia is again among top countries (the second after Equatorial Guinea) that have a share of CDM market that is several times greater than its share of non-Annex B GHG emissions.

However, whether Armenia can be considered as a "successful" CDM country depends not only on the value of CER transactions, but also on the quality of CDM project portfolio that Armenia holds. Particularly, the assessment of technology transfer component of the CDM project, the amount of inward investment channeled to the country thanks to CDM projects, and the weight of non-carbon sustainable development co-benefits are also measures for the "CDM success".

Currently, the DNA in Armenia reports about 14 projects in different stages of development [6]. There are a number of different type projects: land-fill gas, methane capture, cement, small hydropower, energy efficiency improvement, and afforestation/deforestation. The analysis of these projects with respect to sectors prioritized by the Armenian DNA is presented in Table 1. More than half of projects (8) relates to Priority 1 projects – renewable energy and recently energy efficiency projects. However, in terms of CER generation, these projects yield in total only 4% per year basis. On the contrary, 1 cement production optimisation (Priority 2) and 3 landfill gas (Priority 3) projects together account for 81.5% of CERs.

The analysis of Priority 1 renewable energy projects shows that all of them are small-scale hydro projects in different regions of Armenia.

Table 1. Distribution of CDM projects by priority sectoral scope [3, 6, *author's calculations*]

Priority	Sector	Category	Number of CDM projects	CERs per year		Investment costs (mln \$US)
				tCO ₂ e	%	
1	Energy	Renewable	6	91 302	2.2	28.7
		Energy efficiency	2	74 899	1.8	40.0
2	Industry	Technological improvements	1	1 147 390	27.7	4.0
3	Waste	Waste-to-energy	3	2 229 700	53.8	14.4
4	Agriculture	Biogas capture	1	439 800	10.6	4.8
5	Forestry	Carbon sequestration	1	160 000	3.9	-
6	Transport	Fuel economy improvement	-	-	-	-
Total			14	4 143 091	100	

The concern here is that even though these projects are under renewable energy classification, there is a growing understanding worldwide that hydropower is the source of both significant and unavoidable adverse environmental impacts. Small-scale hydropower plants are not exceptions, since like large-scale plants they imply a threat to important stream ecosystems level and individual species [7]. Also, according to analysis of technology transfer in CDM projects, hydro projects together with cement projects have the lowest rates of technology transfer [8]. Moreover, according to expert estimations hydropower is already exploited to its most potential in Armenia and the hydro-energy projects are already in the list of plans with possibilities of attracting private capital [10]. Therefore, within the CDM framework, there is a need to shift the focus to non-hydro capacities of renewable options, as many CDM host countries are currently doing because of high sustainable development benefits that these projects generate, especially in the case of solar projects. Indeed, Armenia has a significant potential for solar, wind and geothermal which is practically not used. Currently, only 0.64% of technically feasible renewable energy is exploited in Armenia [10]. According to some expert estimation, in short-term perspective it is technically and economically feasible to generate annually 270 million kWh electricity from a solar energy plant with 100 MW power capacity [9]. Wind energy can be utilized for generation of 120 million kWh per year. In this context, CDM can be regarded as a perfect means for technology transfer and overcoming the barrier of financial resource. Moreover, for promoting renewables, the government guarantees to purchase of energy from renewable sources at a fixed price. This incentive could increase the attractiveness of CDM projects in this field.

With regard to technology transfer, according to some estimates CDM project types such as cement, coalmine methane, fossil fuel switching, and transport involve very little technology transfer, while almost all energy supply, household energy efficiency and solar projects claim technology transfer. According to the study conducted for the UNFCCC with data analysis based on

project characteristics and CDM host country variables, some of project types, including cement, hydro, and reforestation have low rates of technology transfer. Whereas, technology transfer is more likely for agriculture, HFCs, N₂O, and tidal projects [8]. The same study results for technology transfer to Armenia through CDM projects show though not statistically significant but positive trend of technology which can be compared with that of Indonesia and Egypt.

Encouraging fact to note here is the global investment increase in emerging renewable and energy efficiency technologies. There is an increase in share of all investment categories along the financing continuum, from research and development financing and venture capital for technology to asset financing for generating capacity projects. In 2007, the wind and solar sectors attracted respectively, the first and second largest investment volumes worldwide with increased share in almost every investment category [1]. Nascent technologies start to come and existing ones are refined. Investors are taking renewable energy and energy efficiency more seriously. This can become a promising message to take into account while framing policies and plans for energy infrastructure development, where CDM can play its role.

Proceeding with the theme of investment in the context of discussing how CDM “successful” Armenia is, as Table 1 illustrates, the investment costs are the highest with energy efficiency and renewable energy projects. Looking at this fact from the perspective of CDM host country, the point is that two small-scale energy efficiency projects attracted to the country 40 million USD inward investment, which is almost three times more than investment amount brought to the country by three landfill gas capture projects, one of which is the largest project in the Armenian CDM portfolio in terms of CERs. In this sense, energy efficiency projects are “gold” projects.

Indeed, in the climate change debate, there is a tendency of shifting focus on the energy saving potential, referred to as energy efficiency. International Energy Agency records that each dollar invested into improving energy efficiency energy produces more clean energy than a dollar invested in production of any other energy source [9]. Energy efficiency is one of most promising sectors for reducing GHG emissions. More than that, energy efficiency improvement is a powerful tool for achieving sustainable development by offering social benefits in the form of improved indoor and outdoor air quality, increased economic competitiveness, increased energy security and enhanced reliability of energy infrastructures through reduced reliance on fossil fuels, particularly when imported, and enhanced energy services. According to the World Energy Outlook, energy efficiency can provide 65% of energyrelated emission reductions. Data provided by the IPCC shows that currently the highest potential worldwide for emission reduction is from building sector, where energy efficiency is the largest and most costeffective mitigation option. Moreover, the IPCC experts emphasize that technologies for energy efficiency projects in building sector exist and have been successfully used [4].

High carbon intensity of gross domestic product (GDP), structure of energy consumption mix and sectoral distribution of GHG emission in Armenia indicates high potential for energy efficiency improvement. Power generation and transmission, transport, drinking and irrigation water supply, industry (mining, chemistry and food) and residential and commercial buildings are

priority sectors for energy efficiency improvement. According to expert estimation, potential for energy efficiency improvement in Armenia amounts to annul 1,008 thousand toe with expected CO₂ emission reduction of 1,279 thousand tons in case energy saving activities are implemented [9].

After all, Armenia is a landlocked country with no fossil fuel resources, thus highly depending on imports for energy, including fuel products which are strategically vital, for daily life, for commerce and for security reasons. With tendency of rapid economic growth with increasing demands for energy, current unstable regional geopolitical situation and oil price shocks, energy saving measures aimed at reducing energysupply demands and development of renewable energy sources are important pillars for enhancing energy security in the country. With this respect, CDM projects can be an appropriate tool for relieving financial and institutional constrains and promoting implementation in Armenia of energy efficiency and renewable energy projects which provide the most sustainable impacts.

Conclusion

Armenia is actively engaged in processes of tackling the challenges of global warming, in particular within the Kyoto Protocol's CDM frame-work - a new kind of global market tool, which strives to promote sustainable development in developing countries. With promptly established CDM institutional framework and actively operating DNA, Armenia succeed to be the first among Europe and Central Asia non-Annex B countries to have registered project by EB. The country is also a leader in the region, holding 40% of registered projects. Currently, Armenia's share of CDM market is much greater than its share emissions. Moreover, according to some assessments, there is a positive trend of technology transfer for Armenia through CDM projects. Also, Armenia CDM portfolio contains the majority of renewable energy and energy efficiency projects referring to Priority 1 project category based on economy structure and sustainable development potential of the country. However, for avoiding falling into the trap of "low hanging fruit" – projects which in terms of cost are efficient, but have poor sustainable development co-benefits, there is a need to concentrate more efforts on designing more projects with higher non-carbon sustainable development benefits, such as renewable energy (other than hydropower) and energy efficiency, for which the country posses considerable potential. In conclusion, Armenia is more likely to be considered as a "CDM successful" country, implying wider opportunities for better achievement of country's sustainable development goals.

REFERENCES

1. Boyle, R., C., Greenwood, A., Hohler et al., Analysis of Trends and Issues in the Financing of Renewable Energy and Energy Efficiency, UNEP and New Energy Finance Limited, 2008.
2. Ellis, J., Overcoming Barriers to Clean Development Mechanism Projects, OECD, International Energy Agency and UNEP RISO Centre, 2007.
3. Fichtner, Clean Development Mechanism Handbook for Armenia, EuropeAid and European Commission, 2006.

4. Intergovernmental Panel on Climate Change Synthesis Report, 2007.
5. *J. Fenhann et al.*, UNEP CDM/JI Pipeline Analysis and Database (July 18 2008), URL: <http://cdmpipeline.org/> , 2008.
6. Ministry of Nature Protection of Armenia, Overview: Implementation of Kyoto Protocol's Clean Development Mechanism in Armenia, URL: <http://www.nature-ic.am> , 2008.
7. *Näslund, I.*, Documentation from the International CCB Seminar, Latvia/Green Liberty, CCB Report No. 2002:1, 2001.
8. *Seres, S.*, Analysis of Technology Transfer in CDM Projects, Report for the UNFCCC Registration and Issuance Unit CDM/SDM, 2007.
9. Scientific Research Institute of Energy, National Program on Energy Saving and Renewable Energy of Republic of Armenia, USAID, Yerevan, 2007.
10. *Vermishev, M.*, Capacity Building in the Republic of Armenia for Technology Needs Assessment and Technology Transfer for Addressing Climate Change Problems, Ministry of Nature Protection of RA, UNDP, 2003.

Abbreviations

CDM	Clean Development Mechanism
CER	Certified Emission Reduction
DNA	Designated National Authority
EB	Executive Board
GDP	Gross Domestic Product
GHGs	Greenhouse Gases
PV	Photovoltaic
UNFCCC	United Nations Framework Convention on Climate Change

Received 02.02.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

КОМПЛЕМЕНТ КАК ПАТОГЕННЫЙ ФАКТОР ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

Л.П. ОГАНЕСЯН, Г.М. МКРТЧЯН, С.Г. СУКИАСЯН¹,
М.К. АМБАРЦУМЯН, Г.В. АВЕТИСЯН, А.С. БОЯДЖЯН

Институт молекулярной биологии НАН РА, E-mail: imb@sci.am
¹Стресс Центр МТЦВ РА, E-mail: samsu57@yahoo.com

Проведена оценка функционального состояния важнейшего медиатора иммунного ответа организма, системы комплемента при посттравматическом стрессе. Согласно полученным данным, патогенез ПТСР характеризуется гиперактивацией классического и терминального путей комплемента и гипоактивацией его альтернативного пути.

Система комплемента - посттравматический стресс

Դատարվել է իմունային համակարգի կարևորագույն միջնորդի՝ կոմպլեմենտի համակարգի, ֆունկցիոնալ վիճակի գնահատում հետվնասվածքային սթրեսի ժամանակ: Համաձայն ստացված արդյունքների, հետվնասվածքային սթրեսը բնութագրվում է կոմպլեմենտի դասական ու տերմինալ ուղիների գերակտիվացմամբ և այլընտրանքային ուղու հիպոակտիվացմամբ:

Կոմպլեմենտի համակարգ - հետվնասվածքային սթրես

The assessment of the functional state of the complement system in posttraumatic stress has been performed. According to the data obtained, posttraumatic stress is characterised by hyperactivation of the complement classical and terminal pathways and hypoactivation of the complement alternative pathway.

Complement system - posttraumatic stress

Посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР) относится к группе “тревно-депрессивных расстройств” (код DSM-IV-TR: 309.81; код МКБ-10: F43.1, F62.0). Заболевание возникает как затянувшийся ответ на событие исключительно угрожающего или катастрофического характера (стихийные бедствия, катастрофы, войны, террористические акты, жестокое физическое насилие и т.п.), вызывающее сильный страх, чувство ужаса и беспомощности по отношению к происходящему [6, 11, 12, 19, 20].

Для больных ПТСР характерны тяжелое эмоциональное состояние, депрессия, снижение сопротивляемости организма, способности к усвоению информации, повышенная склонность к алкоголю, наркотикам и суициду [6, 11, 12, 19, 20].

Вопросы, касающиеся молекулярных патомеханизмов генерации и развития ПТСР, до настоящего времени остаются открытыми, соответственно отсутствуют эффективные методы лечения этого заболевания. Результаты ряда клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют о том, что в этиопатогенез ПТСР вовлечены как факторы окружающей среды, так и генетические факторы [9], и что нарушения на уровне иммунного статуса организма могут в значительной степени быть ответственны за развитие этого заболевания [1, 23, 24].

Цель настоящей работы состояла в изучении роли системы комплемента - важнейшего медиатора иммунного ответа, связующего звена врожденного и приобретенного иммунитета в патогенезе ПТСР. Комплемент является ключевым звеном, медиатором и индуктором многих клеточных и гуморальных звеньев и механизмов, формирующих иммунный ответ организма. Активация комплемента по классическому, альтернативному и лектиновому путям приводит к генерации опсонинов, анафилатоксинов и хемотаксинов, медиаторов воспаления и апоптоза [5, 17, 21]. Нарушения функциональной активности системы комплемента наблюдаются при многих заболеваниях человека [15, 18, 22], включая психические заболевания [3, 10, 14, 25] и физиологический стресс [4, 13].

В настоящей работе мы изучали состояние функциональной активности системы комплемента при ПТСР по сравнению с нормой. Для этого в сыворотке крови больных ПТСР и здоровых лиц определена гемолитическая активность классического и альтернативного путей комплемента, а также его отдельных компонентов - C2, C3, C4, фактора В и фактора D. C2 и C4 являются основными компонентами классического пути, факторы В и D - основными компонентами альтернативного пути, а C3 представляет собой иницирующее звено альтернативного пути и одновременно является центром конвергации всех трех путей комплемента и начальным звеном его терминального пути [5, 17, 21].

Материал и методика. *Субъекты исследования.* В исследование были вовлечены больные ПТСР (ветераны Карабахской войны: n=31; 27 мужчин, 4 женщины; средний возраст ($M \pm m$) $42 \pm 4,6$ лет, давность заболевания – 13 лет). Все больные госпитализировались в Стресс центре МТСП РА. Забор крови у них проводили сразу по поступлении, до лечения и приема лекарственных средств. Больных диагностировали на основе “Structured clinical interview for diagnostic and statistical manual of mental disorders” (DSM-IV (SCID-I)) [8] и “Clinician administered PTSD scale” (CAPS) [2]. Контрольную группу составили соответствующие больным по возрасту и полу физически и психически здоровые добровольцы (n=31). Никто из субъектов исследования не страдал иммунными, сердечно-сосудистыми, церебрально-сосудистыми, метаболическими, онкологическими или почечными заболеваниями. В период взятия крови они не болели инфекционными заболеваниями и, как минимум, за 12 месяцев до взятия крови не использовали противовоспалительные, антигистаминовые или иммуносупрессорные препараты и не подвергались хирургическим вмешательствам. Все субъекты дали согласие на забор 5 мл венозной крови для проведения настоящего исследования. Исследование было одобрено Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА.

Забор крови и получение образцов сыворотки.

Забор крови проводили натошак пункцией из локтевой вены в 9:00-10:00 ч утра. Образцы крови помещали на лед и через 60 мин подвергали центрифугированию (3000g x 15мин, 4⁰) для отделения сыворотки от форменных элементов.

Определение гемолитической активности

Гемолитическую активность классического и альтернативного путей комплемента (CH50 и AH50 соответственно), а также его компонентов, C2 (C2H50), C3 (C3H50), C4 (C4H50), фактора В (FBH50) и фактора D (FDH50) в сыворотке крови больных и здоровых лиц определяли как описано ранее [7]. При измерении AH50, FDH50 и FBH50 в качестве клеток-мишеней использовали эритроциты кролика, а при измерении CH50, C2H50, C3H50 и C4H50 – бараньи эритроциты, сенсibilизированные специфичными к ним кроличьими антителами. Гемолитическую активность выражали в единицах на мл сыворотки. Одна единица гемолитической активности – это количество сыворотки, которое вызывает 50%-ный гемолиз эритроцитов в данной инкубационной среде. Бараньи эритроциты, сенсibilизированные специфичными к ним кроличьими антителами (5x10⁸ клеток/мл), и кроличьи эритроциты (1x10⁸ клеток/мл) готовили как описано ранее [7]. Приготовление истощенных по компонентам комплемента сывороток, используемых при определении гемолитической активности отдельных компонентов комплемента, проводили согласно ранее разработанным методам [16]; эффективность этих процедур, тестируемая твердофазным иммуноферментным анализом, составляла $\geq 95\%$.

Статистический анализ данных.

Данные анализировали непарным двухконцевым t-тестом Стьюдента и определением коэффициента корреляции Пирсона (r). Значения $p < 0,05$ принимались как статистически достоверные.

Результаты и обсуждение. Согласно полученным данным, средние величины CH50, C2H50 и C4H50 в сыворотке крови больных ПТСП в 2,1, 1,2 и 1,6 раза достоверно превышали таковые группы здоровых лиц. С другой стороны, средние значения C3H50, AH50, FBH50 и FDH50 в сыворотке крови больных ПТСП были в 1,7, 1,5, 1,6 и 2,3 раза ниже, чем в случае аналогичных параметров здоровых лиц. Результаты среднестатистического анализа полученных данных представлены в табл. 1.

Корреляционный анализ показал, что у больных ПТСП C3H50 достоверно коррелирует с C2H50 и C4H50 ($r=0.72$, $p<0.002$ и $r=0.5$, $p<0.05$ соответственно), а AH50 – с C3H50 ($r=0.57$, $p<0.027$). Других достоверных корреляций между определенными параметрами при ПТСП нами не было выявлено. В группе здоровых лиц не наблюдалась какая-либо корреляция между отмеченными параметрами.

Система комплемента, схематично представленная на рис. 1, занимает центральное место в звеньях врожденного и приобретенного иммунитета, являясь посредником разнообразных процессов, формирующих иммунный ответ. Она состоит из более чем 30 водорастворимых и мембранных белков, регуляторов и рецепторов и представляет каскад реакций, включающий протеолитическое расщепление (активацию) сывороточных гликопротеинов, активируемых клеточными рецепторами. Реакции в каскаде комплемента индуцируют продукцию антител, воспалительные реакции, хемотаксис фагоцитов и опсонизацию апоптотических и некротических клеток, облегчая распознавание, захват и лизис последних.

Таблица 1. Средние значения ($M \pm m$) CH50, C2H50, C3H50, C4H50, AH50, FBH50 и FDH50 в сыворотке крови больных ПТСР и здоровых лиц.

Параметр	Здоровые	Больные	P <
CH50	176 $\pm$ 24,56	375 $\pm$ 29,52	0,0002
C2H50	58,8 $\pm$ 3,1	67,6 $\pm$ 1,63	0,05
C3H50	55,92 $\pm$ 1,82	37,57 $\pm$ 4,198	0,0306
C4H50	36,64 $\pm$ 7,677	60,1 $\pm$ 7,337	0,0325
AH50	87,6 $\pm$ 2,13	52,3 $\pm$ 3,37	0,0001
FBH50	65,2 $\pm$ 12,9	40,8 $\pm$ 3,6	ns
FDH50	163,7 $\pm$ 24,95	71,7 $\pm$ 3,99	0,001

Комплемент может активироваться тремя путями – классическим, альтернативным и лектиновым, отличающимися составом компонентов и механизмами инициации. Общим для них является завершающий этап – терминальный путь комплемента, приводящий к формированию мембрано-атакующих комплексов (МАК) и лизису клеток [5, 17, 21].

За последнее десятилетие стало очевидным, что дисфункция комплемента характерна для ряда заболеваний человека [15, 18, 22], включая психические (шизофрению, болезнь Альцгеймера) [3, 10, 14, 25] и физиологический стресс [4, 13].

В настоящей работе дана оценка функциональной активности системы комплемента при ПТСР. Результаты исследования свидетельствуют о том, что патогенез ПТСР характеризуется дисфункцией комплемента - гиперактивацией его классического и терминального путей и гипоактивацией его альтернативного пути.

Альтернативный путь комплемента активируется в результате спонтанного гидролиза тиоэфирного мостика C3 компоненты комплемента, что индуцирует связывание с ней фактора В (FB), дальнейшее расщепление последнего фактором D (FD) и генерацией C3 конвертазы альтернативного пути - C3bBb. Многофункциональная компонента комплемента C3 является иницирующим звеном альтернативного пути и одновременно участком конвергации всех трех путей комплемента, иными словами, начальным компонентом его терминального пути [5, 17, 21].

Наблюдаемая нами пониженная активность альтернативного пути на фоне спада активности C3 компоненты комплемента в крови у больных ПТСР, скорее всего, отражает истощение C3 компоненты за счет ее сверх-утилизации в терминальном пути. Это предположение подтверждается данными корреляционного анализа, указывающими на наличие достоверной положительной корреляции между уровнями CH50 и C3H50 и отсутствие корреляции между уровнями AH50 и FBH50, а также AH50 и FDH50 у больных ПТСР.

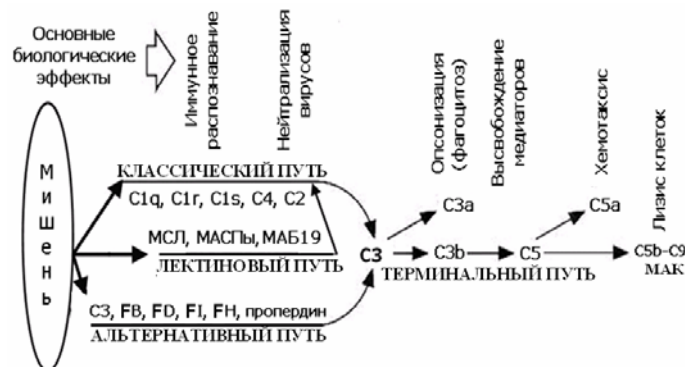


Рис. 1. Система комплемента и опосредованные ею биологические эффекты.

Таким образом, очевидно, что при ПТСР альтернативный путь подавляется на начальном этапе своей активации и что патогенез ПТСР характеризуется также гиперактивацией терминального пути комплемента.

С другой стороны, отсутствие корреляции между АН50 и СН50 свидетельствует, что нарушения на уровне активации классического и альтернативного путей комплемента при ПТСР не взаимосвязаны.

Заключение

Настоящая работа демонстрирует, что ПТСР ассоциирует с дисфункцией системы комплемента и выявляет нарушенные звенья в его каскаде. На основании полученных данных нами были сформулированы следующие выводы.

1. Патогенез ПТСР ассоциирует с дисфункцией системы комплемента, включая гиперактивацию ее классического и терминального путей и гипоактивацию ее альтернативного пути.
2. Изменения в уровнях функциональной активности классического и альтернативного путей комплемента при ПТСР не взаимосвязаны.
3. Активность альтернативного пути подавляется на начальной стадии его иницирования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Altemus M., Dhabhar F.S., Yang R. Ann. NY Acad. Sci. 1071,167–183, 2006.
2. Blake D.D., Weather F.W., Nagy L.M. et al. J. Trauma Stress, 8(1), 75–90, 1995.
3. Boyajyan A.S., Khoyetsyan A.G., Hakobyan S.S. et al. Dokl. Biochem. Biophys. (Moscow), 419, 56–57, 2008.
4. Burns V., Edwards K., Ring C. et al. Psychosomatic Medicine, 70, 387–396, 2008.
5. Cole D.S., Morgan B.P. Clin. Sci. 104(5), 455–466, 2003.
6. Connor M.D., Butterfield M.I. FOCUS, 1(3), 247–262, 2003.
7. Doods A.W., Sim R.B. Complement. A practical approach. Oxford: Oxford University Press, 1997.
8. First M.B., Spitzer R.L., Gibbon M., Williams J.B. Structured clinical interview for the DSM-IV axis I disorders (SCID PTSD Module). USA: National Center for PTSD, 1996.

9. *Gitlin J.M.* JAMA, 299(11), 1291-1305, 2008.
10. *Hakobyan S., Boyajyan A., Sim R.B.* Neurosci. Lett., 374(1), 35–37, 2005.
11. *Jacobs W.J., Dalenberg C.* Psychiatr. Clin. North Am., 21(4), 835-845, 1998.
12. *Kinchin D.* Post traumatic stress disorder: the invisible injury. UK: Success Unlimited, 2005.
13. *Maes M., Hendriks D., Gastel A.V. et al.* Psychoneuroendocrinology, 22, 397–409, 1997.
14. *Mayilyan K.R., Weinberger D.R., Sim R.B.* Drug News Perspect. 21(4), 200-210, 2008.
15. *Mollnes T.E., Song W.C., Lambris J.D.* Trends Immunol. Today, 23(2), 61-66, 2002.
16. *Morgan B.P.* Methods in molecular biology. Complement methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press, 2000.
17. *Nauta A.J., Roos A., Daha M.R.* Int. Arch. Allergy Immunol. 134(4), 310-323, 2004.
18. *Sakamoto M., Fujisawa Y., Nishioka K.* Nutrition, 14(4), 391-398, 1998.
19. *Schiraldi G.R.* Post-traumatic stress disorder sourcebook, Columbus: McGraw-Hill Companies, 2000.
20. *Shalev A.Y., Freedman S.* Am. J. Psychiatry, 162(6), 1188-1191.
21. *Sim R.B., Laich A.* Biochem. Soc. Trans. 28 (5), 545–550, 2000.
22. *Volankis J.E., Frank M.M.* The human complement system in health and disease. New York: Mircel Dekker, Inc., 1998.
23. *Von-Kanel R., Hepp U., Kraemer B. et al.* J. Psychiatr. Res. 41(9), 744-752, 2007.
24. *Wong C.M.* Psychiatr. Clin. North Am., 25(2), 369-83, 2002.
25. *Yasojima K., Schwab C., McGeer E.G., McGeer P.L.* Amer. J. Pathol., 154(3), 927-936, 1999.

Поступила 02.02.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ • Экспериментальные и теоретические статьи •
•Experimental and Theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1 (61), 2009

ԱԳՐՈՖԻԶԻԿԱԿԱՆ ՄԵԹՈՂՆԵՐԻ ԿԻՐԱՌՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՏԵԽՆԱԾԻՆ ԱՂՏՈՏՎԱԾ ՀՈՂԵՐԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Հ. Է. ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ

Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Հոդվածում բերված է վեգետացիոն և դաշտային փորձերի արդյունքները՝ բնական մելիորանտների (ցեոլիտ, դացիտային տուֆ) և օրգանական պարարտանյութերի (զոմաղբ, կենսահումուս) ազդեցությունը տեխնածին աղտոտված հողերի կենսաբանական ակտիվության վրա:

Պարզվել է, որ կիրառված մելիորանտները նպաստում են հողի շնչառության ինտենսիվության և ֆերմենտացիոն ակտիվության բարձրացմանը: Տեխնածին աղտոտված հողերի կենսաբանական ակտիվության բարձրացման համար առաջարկվում է համատեղ կիրառել բնական մելիորանտներ և օրգանական պարարտանյութեր:

Կենսաբանական ակտիվություն - օրգանական պարարտանյութեր - ցեոլիտ - դացիտային տուֆ - վերակուտիվացում

Приведены результаты вегетационных и полевых испытаний влияния природных мелиорантов (цеолит, дацитовый туф) и органических удобрений (навоз, биогумус) на биологическую активность техногенно загрязненных почв.

Установлено, что применяемые мелиоранты способствуют усилению активности ферментов и дыхания почвы.

С целью усиления биологической активности техногенно загрязненных почв рекомендуется применять совместно природные мелиоранты и органические удобрения.

Биологическая активность - рекультивация - органические удобрения - цеолит - дацитовый туф

The article is devoted to the results of vegetational and field experiments - the influence of joint application of natural meliorants (ceolite, dacitic tuff) and organical fertilizers (manure, biohumus) on the biological activity of technogen – polluted soil.

It's stated that the used meliorants increase the fermentative activity and the intensity of the production of carbon dioxide from the soil.

In order to increase the biological activity we suggest joint application of natural meliorants and organical fertilizers.

Biological activity - recultivation - organic fertilizers - ceolite - dacitic tuff

Հոդվածի կենսաբանական ակտիվությունը ուսումնասիրում են տարբեր նպատակներով: Դա կարող է լինել տարբեր ագրոքիմիական, ագրոտեխնիկական, մելիորատիվ և այլ միջոցառումների ազդեցությամբ տեղի ունեցած փոփոխությունների համեմատական ուսումնասիրություններ [4]:

Գալստյանի [2] բնորոշմամբ ֆերմենտացիոն պրոցեսների հետազոտությունը տարբեր գենետիկական հոդատիպերում տալիս է հնարավորություն օգտագործել դրանց ակտիվությունը որպես հոդերի բերրիության գնահատման լրացուցիչ դիագնոստիկ ցուցանիշ: Ֆերմենտացիոն ակտիվությունը ցույց է տալիս հոդում ընթացող կեսաքիմիական պրոցեսների ինտենսիվությունն ու ուղղությունը և կարող է հանդիսանալ զգայուն ինդիկատոր նրա կենսաբանական վիճակի:

Հետազոտությունների նպատակն է ուսումնասիրել ու պարզել բնական մելիորանտների (ցեոլիտ, դացիտային տուֆ) և օրգանական պարարտանյութերի (գոմաղբ, կենսահումուս) համատեղ կիրառման ազդեցությունը տեխնածին աղտոտված հոդերի կենսաբանական ակտիվության վրա:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունների օբյեկտ է հանդիսացել Արարատի մարզի ցեմենտի գործարանի փոշու ազդեցության առաջին գոտու տեխնածին աղտոտված հողատարածքները, որտեղ հոդերի կենսաբանական ակտիվության ուսումնասիրությունները տարվել են էկոլոգիական հիմնախնդիրների պրոբլեմային լաբորատորիայի կողմից դրված դաշտային փորձերում: Վերոհիշյալ հարցը ուսումնասիրելու նպատակով դրվել են նաև վեգետացիոն փորձեր՝ Հայաստանի պետական ագրարային համալսարանի ջերմատանը կից բաց գրունտում: Ինչպես դաշտային, այնպես էլ վեգետացիոն փորձերը դրվել են 7 տարբերակներով: Փորձադաշտի հոդերը ըստ Գրիգորյանի կողմից մշակված սանդղակի՝ թույլ աղտոտված են ցինկով (Zn), միջին՝ պղնձով (Cu) և ուժեղ՝ կապարով (Pb):

Փորձի սխեման՝ 1. ստուգիչ, 2. ցեոլիտ 70 տ/հա, 3. ցեոլիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա, 4. ցեոլիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա, 5. դացիտային տուֆ 70 տ/հա, 6. դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա, 7. դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա: Փորձերը դրվել են 3 կրկնողությամբ, փորձամարզերի մակերեսը եղել է 50 մ²: Փորձադաշտում աճեցվել է լոլիկ (սորսը՝ Լիա):

Արդյունքներ և քննարկում: Արարատի մարզի ցեմենտի գործարանի փոշու ազդեցության առաջին գոտում դրված դաշտային փորձերը կատարվել են նոր մելիորացված գորշ կիսաանապատային հողատիպում, որը բնութագրվում է հողաշերտի փոքր հզորությամբ, հումուսի ցածր պարունակությամբ (0,87 %), կարբոնատների մեծ պարունակությամբ, ունի հիմնային ռեակցիայով (pH=8,0): Այդ հոդերը թույլ են ապահովված ազոտով՝ (0,8 մգ 100 գ հողում), միջակ՝ ֆոսֆորով (5,1 մգ 100 գ հողում) և կալիումով՝ (30,3 մգ 100 գ հողում): Փորձադաշտի հոդն ունի ավազային մեխանիկական կազմ՝ ֆիզիկական կավը (< 0,01 մմ-ից մասնիկները) ամբողջ հողաշերտում կազմում է 10,72–17,16 %, իսկ տիղմի պարունակությունը (< 0,001 մմ մասնիկները) տատանվում է 4,16–6,92 %-ի սահմաններում:

Աղյուսակ 1. Փորձադաշտի միատարրության ցուցանիշները

Ցուցանիշներ	M (m	Վարիացիայի գործակիցը, V	Միավի տոկոսը, P	Դաշտի միատարրությունը, P < 7
որոշումների թիվը, n = 6				
Ինվերտազ	5,7 (0,22	9,5	3,86	միատարր

Ըստ Եղիազարյանի [3] կողմից մշակված սանդղակի, երբ ինվերտազ ֆերմենտի ակտիվության ցուցանիշների սխալի տոկոսը չի գերազանցում 5–7%-ը, ապա դաշտը համարվում է միատարր և կարող է օգտագործվել դաշտային փորձերի համար:

Վեգետացիոն փորձերը դրվել են 12 լ տարողությամբ պլաստմասե անոթներում, որոնց մակերեսը 0,0615 մ² է և մշակվել է աշնանացան ցորեն (սորսը՝ Նաիրի 68): Հողը (0–30 սմ շերտից) բերվել է այն փորձահողամասից, որտեղ դրված են դաշտային փորձերը: Անոթներում լցվել է 12 կգ հող, որը նախապես խառնվել է բնական մելիորանտների և օրգանական պարարտանյութերի հետ: Ըստ որում ցեղիտի ու դացիտային տուֆի քանակը վերցվել է 430 գ (70 տ/հա) հաշվարկով, գոմաղբինը՝ 246 գ (40 տ/հա) հաշվարկով, կենսահումուսինը՝ 31 գ (5 տ/հա) հաշվարկով:

Փորձի տարբերակներում հողի կենսաբանական ակտիվությունը բնորոշող՝ հողային ֆերմենտների (ինվերտազ, ֆոսֆատազ, ուրեազ, կատալազ) և հողի շնչառությունը՝ (հողից արտազատվող CO₂-ի քանակը) որոշելու համար, հողանմուշները ըստ սահմանված մեթոդիկայի վերցվել են բերքահավաքից անմիջապես հետո: Հողային ֆերմենտների և հողի շնչառության ինտենսիվության անալիզները կատարվել են Երևանի պետական համալսարանի էկոլոգիայի և բնության պահպանության ամբիոնի լաբորատորիայում:

Աղյուսակ 2. Բնական մելիորանտների և օրգանական պարարտանյութերի համատեղ կիրառման ազդեցությունը հողի կենսաբանական ակտիվության փոփոխության վրա (վեգետացիոն փորձ)

Փորձի տարբերակները	Ինվերտազ, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատազ, մգ P	Ուրեազ, մգ NH ₃	Կատալազ, մմ ³ O ₂	Հողի շնչառություն, մգ CO ₂	Ինվերտազ, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատազ, մգ P	Ուրեազ, մգ NH ₃	Կատալազ, մմ ³ O ₂	Հողի շնչառություն, մգ CO ₂
	2007					2008				
1. Ստուգիչ	5,7	2,5	0,61	3,4	13,1	5,3	2,8	0,53	3,7	13,9
2. Ցեղիտ 70 տ/հա	4,8	2,2	0,58	3,4	13,7	4,4	2,0	0,45	3,5	13,3
3. Ցեղիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	12,4	4,9	1,29	2,2	21,4	11,3	4,7	1,35	1,8	22,1
4. Ցեղիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	9,6	3,8	0,98	3,0	18,2	7,0	3,3	0,82	2,7	17,7
5. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա	8,8	3,2	0,82	3,2	17,6	7,5	3,2	0,87	3,6	17,3
6. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	14,1	5,5	1,94	2,5	22,6	14,3	5,1	1,78	2,2	21,4
7. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	10,3	4,3	1,10	2,9	19,4	8,6	3,7	0,92	3,0	17,5

Ինչպես երևում է աղյուսակ 2-ի թվային տվյալներից ինվերտազ, ֆոսֆատազ, ուրեազ ֆերմենտների ակտիվության և հողի շնչառության ինտենսիվության ամենաբարձր ցուցանիշները նկատվում են դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա և ցեղիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա տարբերակներում, որտեղ ստուգիչ տարբերակի համեմատությամբ այն երկու տարվա միջին տվյալներով ավելացել է համապատասխանաբար ինվերտազ՝ 8,7 մգ (159%) և 6,4 մգ (115%), ֆոսֆատազ՝ 2,7 մգ (101%) և 2,2 մգ (82%), ուրեազ՝ 1,29 մգ (227%) և 0,75 մգ (133%), հողի շնչառությունը՝ 9 մգ (64%)

և 8,3 մգ (61%): Կենսահումուս տրված տարբերակներում, հատկապես հետազոտության առաջին տարում նույնպես նկատվել է վերոհիշյալ ֆերմենտների ակտիվության և հողի շնչառության ինտենսիվության նշանակալի բարձրացում, ինչը հետազոտության երկրորդ տարում որոշակի նվազել է: Կատալազ ֆերմենտի ակտիվությունը, ճիշտ հակառակը, դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա և ցեոլիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա տարբերակներում որոշակի նվազել է: Վերջինս պայմանավորված է օրգանական պարարտանյութերում նշանակալի քանակությամբ նիտրատ, ֆոսֆատ, սուլֆատ, քլորիդ անիոնների և այլ միացությունների պարունակությամբ: Բացի դրանից օրգանական պարարտանյութերի հանքայնացման հետևանքով հողում անիոնների պարունակությունը մեծանում է, ինչը և նպաստում է կատալազ ֆերմենտի ինակտիվացմանը [2]:

Աղյուսակ 3. Բնական մեկորանտների և օրգանական պարարտանյութերի համատեղ կիրառման ազդեցությունը հողի կենսաբանական ակտիվության փոփոխության վրա (դաշտային փորձ)

Փորձի տարբերակները	Ինվերտազ, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատազ, մգ P	Ուրեազ, մգ NH ₃	Կատալազ, մգ O ₂	Հողի շնչառություն, մգ CO ₂	Ինվերտազ, մգ գլյուկոզ	Ֆոսֆատազ, մգ P	Ուրեազ, մգ NH ₃	Կատալազ, մգ O ₂	Հողի շնչառություն, մգ CO ₂
	2007					2008				
1. Ստուգիչ	5,6	2,6	0,58	3,7	12,8	5,9	2,2	0,55	3,3	14,1
2. Ցեոլիտ 70 տ/հա	5,0	2,1	0,51	3,9	12,3	4,8	1,6	0,47	3,2	13,7
3. Ցեոլիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	11,2	4,3	1,16	2,1	19,7	10,4	4,1	1,22	1,7	20,5
4. Ցեոլիտ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	8,3	3,5	0,82	3,1	16,2	7,2	2,9	0,70	2,5	15,7
5. Դացիտային տուֆ 70տ/հա	7,5	2,9	0,70	3,5	14,8	7,1	2,7	0,68	3,1	15,6
6. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա	12,8	4,8	1,68	1,8	20,1	11,8	4,5	1,63	2,0	20,2
7. Դացիտային տուֆ 70 տ/հա + կենսահումուս 5 տ/հա	9,4	3,8	0,94	3,0	17,3	7,5	3,0	0,79	3,2	16,0

Ինչ վերաբերվում է միայն ցեոլիտ 70 տ/հա տրված տարբերակին, ապա այստեղ ոչ մի դրական փոփոխություն չի նկատվել: Ընդհակառակը, այստեղ նկատվել է ինվերտազ, ֆոսֆատազ, ուրեազ ֆերմենտների ակտիվության որոշակի նվազման միտում, ինչը չի կարելի ասել դացիտային տուֆ 70 տ/հա տարբերակի համար: Այդ տարբերակում նկատվել է հիշյալ ֆերմենտների ակտիվության և հողի շնչառության ինտենսիվության բարձրացում: Առաջինի դեպքում այդ հանգամանքը բացատրվում է նրանով, որ ցեոլիտը ունենալով հիմնային ռեակցիա, նպաստում է միջավայրի հիմնային ռեակցիա ունեցող հողերի էլ ավելի հիմնայնացմանը, ինչը ոչ նպաստավոր պայմաններ է ստեղծում վերոհիշյալ ֆերմենտների կենսագործունեության համար: Դացիտային տուֆը, լինելով ծակոտկեն հանքատեսակ, բարելավվում է հողի օդային, ջրային և ջերմային ռեժիմները, ինչն էլ անշուշտ խթանում է հողում ընթացող կենսաբանական պրոցեսներին: [1]

Ինչպես երևում է աղյուսակ 3-ի թվային տվյալներից դաշտային փորձերում ստացվել է նույն օրինաչափությամբ, ինչպիսին նկատվել էր վեգե-տացիոն փորձերում: Դաջիտային տուֆ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա և ցեո-լիտ 70 տ/հա + գոմաղբ 40 տ/հա տարբերակներում, ստուգիչ տարբերակի համեմատությամբ երկու տարվա միջին տվյալ-ներով ավելացել է համա-պատասխանաբար ինվերտաց՝ 6,6 մգ (115%) և 5,1 մգ (88%), ֆոսֆատաց՝ 2,3 մգ (95%) և 1,8 մգ (76%), ուրեաց՝ 1,1 մգ (195%) և 0,63 մգ (111%), հողի շնչառություն՝ 6,7 մգ (47%) և 6,7 մգ (49%):

Եզրակացություններ և առաջարկություններ

Երկու տարվա վեգետացիոն և դաշտային փորձարարական աշ-խատանքների արդյունքները հնարավորություն են տվել հանգելու հետևյալ եզրակացությունների.

1. Արարատի մարզի ցեմենտի գործարանի փոշու ազդեցության առաջին գոտու տեխնածին աղտոտված գորշ կիսաանապատային հողերում բնական մելիորանտների և օրգանական պարարտանյութերի համատեղ կիրառման դեպքում նկատվում է կենսաբանական ակտիվության բարձրացում, ընդ որում ցեոլիտի և դաջիտային տուֆի ֆոնի վրա գոմաղբի արդյունավետությունը ավելի բարձր է, քան կենսահումուսինը:

2. Օրգանական պարարտանյութերի (գոմաղբ, կենսահումուս) կի-րառման դեպքում հողում թուլանում է կատալազ ֆերմենտի ակտիվությունը, որը պայմանավորված է դրանցում նիտրատ, ֆոսֆատ, սուլֆատ, քլորիդ անիոնների և այլ միացությունների պարունակությամբ:

Կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքները հիմք են տալիս առաջարկելու տեխնածին աղտոտված հողերի վերակուլտիվացման նպատակով համատեղ կիրառել բնական մելիորանտներ (ցեոլիտ, դաջի-տային տուֆ) և օրգանական պարարտանյութեր (գոմաղբ, կենսահումուս), ըստ որում միջավայրի հիմնային ռեակցիա ունեցող հողերում նպատակա-հարմար է կիրառել դաջիտային տուֆ, քան ցեոլիտ: Իսկ բնական մելիորանտի չափաքանակը կախված նրանից, թե տվյալ դաշտում ինչպիսի մշակաբույս է աճեցվելու և քանի տարի է դաշտն զբաղեցնելու, կարելի է փոփոխության ենթարկել:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Աչաгорцян З.А., Оганесян А.П., Оганесян М.Л.* Внесение в почву пористых горных пород для повышения урожайности, Ереван, 1971.
2. *Галстян А.Ш.* Ферментативная активность почв Армении, Ереван, 1974.
3. *Егизарян Л.Т.* Автореф. канд.дисс., Ереван, 1970.
4. *Звягинцев Д.Г.* Почвоведение, № 6. с. 48-54, 1978.

Ստացվել է 16.01.2009



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ НАПОЛНИТЕЛЕЙ И ПИТАТЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ *COLCHICUM SZOVITSII* FISCH. В УСЛОВИЯХ ОТКРЫТОЙ ГИДРОПОНИКИ

Х. Л. САРГСЯН

Институт проблем гидропоники НАН РА
E-mail xcho_s@yahoo.com

Исследовалось влияние различных питательных растворов и наполнителей на продуктивность луковиц *Colchicum szovitsii* Fisch. и содержание в них колхицина. Исследования показали, что беспочвенное выращивание *Colchicum szovitsii* Fisch. в условиях гидропоники возможно и достаточно эффективно. Наивысшие показатели по весу луковиц, концентрации и общему выходу колхицина обеспечивает питательный раствор Давтяна в красном вулканическом шлаке. Вышеперечисленные показатели превышают контрольный вариант в 2,7; 1,8 и 4,9 раза соответственно.

Безвременник Шовица - колхицин - гидропоника - питательный раствор - субстрат

Ուսումնասիրվել է տարբեր սննդարար լուծույթների և լցանյութերի ազդեցությունը *Colchicum szovitsii* Fisch.-ի սոխուկների բերքատվության և դրանցում կոլխիցինի կուտակման վրա: Հետազոտման արդյունքում պարզվել է, որ *Colchicum szovitsii* Fisch.-ի աճեցումը բացօթյա հիդրոպոնիկայի պայմաններում միանգամայն հնարավոր է: Սոխուկի քաշի, կոլխիցինի կոնցենտրացիայի և ընդհանուր ելունքի լավագույն ցուցանիշները ապահովել է Դավթյանի սննդարար լուծույթը՝ կարմիր հրաբխային խարամ լցանյութում, որոնք գերազանցել են հողային ստուգիչի տարբերակին 2,7; 1,8 և 4,9 անգամ համապատասխանաբար:

Շնդեղ Շովիցի - կոլխիցին - հիդրոպոնիկա - սննդալուծույթ - լցանյութ

For the first time corms of *Colchicum szovitsii* Fisch. were collected, identified and planted under open-air hydroponics conditions. The efficiency of Davtyan's, Knop's, Steiner's and Chesnokov-Bazirina's nutrient solutions under various substrates on colchicine accumulation was observed. Results show certain increase of colchicine concentration in hydroponics cultures compared with soil one. We report that the highest corm productivity, colchicine accumulation and overall output of colchicine were indicated for Davtyan's solution under red volcanic slag substrate, which prevail on soil culture 2,7; 1,8 and 4,9 times respectively.

Colchicum szovitsii Fisch. - colchicine - hydroponics - nutrient solution - substrate

Лекарственные свойства рода колхикумов (*Colchicum*), семейство лилейных (Liliaceae) известны с древних времен – 78 г.н.э. [12]. Медицинская ценность их, а точнее некоторых его представителей (*Colchicum speciosum* Stev. и *C. autumnale* L.) определяется наличием в их луковицах колхицидов (сильнодействующие алколоиды), в частности колхицина. В средиземноморской части Европы колхикумы издревне использовались для лечения подагры [12]. Колхицин является сильным ингибитором митоза клеток и в современной медицине используется при лечении некоторых видов злокачественных опухолей, лейкемии, а также является единственным медикаментом при лечении семейной средиземноморской лихорадки (FMF) [13,16].

Несмотря на промышленное синтезирование колхицина и его аналогов, есть необходимость в получении натуральных медицинских продуктов в больших количествах [13], так как по последним исследованиям Всемирной Организации Здравоохранения все большая часть населения земли, особенно в развитых странах, отдает предпочтение медикаментам растительного происхождения [18]. Для решения этого вопроса необходимы исследования факторов, влияющих на биосинтез интересующих нас активных веществ в лекарственных растениях. Следует отметить, что факторы, влияющие на биосинтез колхициновых алколоидов, мало изучены [10]. Известны низкий коэффициент размножения луковиц колхикума и их сильная подверженность климатическим изменениям.

В мире известны более 100 видов колхикума [17], из которых 3 в Армении и занесены в Красную книгу [15]: безвременник Шовица (*C. szovitsii* Fisch.), б. великолепный (*C. speciosum* Stev.), б. теневой (*C. umbrosium* Stev.). Учитывая вышеупомянутое и опыт выращивания луковичных растений в условиях открытой гидропоники [1,6,7,11,15], мы изучали возможность и эффективность выращивания луковиц безвременника Шовица (рис.1) в открытой гидропонике в условиях Араратской долины.

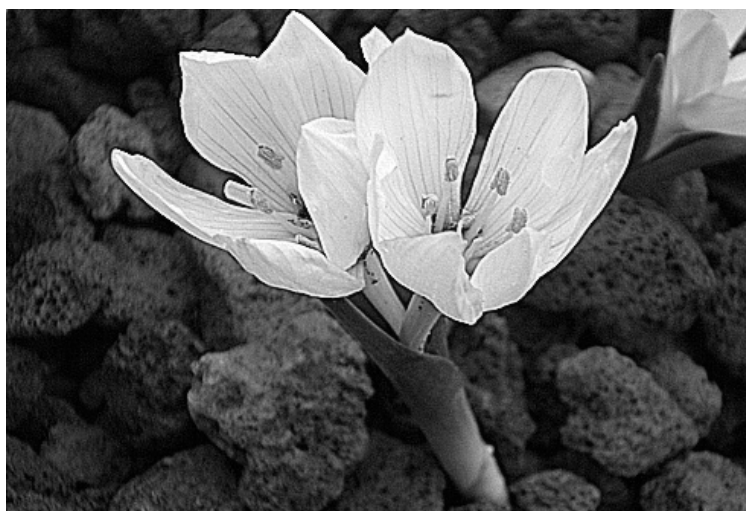


Рис. 1. *Colchicum szovitsii* Fisch. в условиях открытой гидропоники.

Материал и методика. Объектом исследования является б. Шовица (*Colchicum szovitsii* Fisch.). Исходный материал (луковицы) был привезен из Арагацотнской обл., с. Оргов, в апреле 2007 г.; 90% луковиц находились в начальной стадии цветения. Целью исследования является выявление наилучшего питательного раствора и наполнителя для обеспечения высокой продуктивности луковиц колхикума. Опыты проводили в ИПГ НАН РА в 2007-2008 гг. вегетационных сезонах. Луковицы были пересажены в гидропонические установки с площадью питания 1 м². Наполнителями служили: гравий, смесь красного вулканического шлака и гравия (1:1 по объему), красный вулканический шлак. Диаметр частиц 3-15мм. Плотность посадки 80 луковиц/м². Использовали питательные растворы Давтяна, Кнопа, Чеснокова - Базириной, Стейнера [3,4,8]. Контролем служили почвенные растения. Сбор луковиц был проведен в конце вегетации растения, 23 июня (2007г.) и 4 июня (2008г.). Средний вес луковиц был рассчитан по 20-ти луковицам из каждого варианта. Исследуемый материал (5-6 луковиц из каждого варианта) был измельчен и высушен при комнатной температуре в течение 24 ч. Экстракция, изоляция и количественное определение колхицина произведена по методу Гринкевича [2,14]. При анализах использовали УФ-спектрофотометр марки SPECOL 11. Математическую обработку полученных данных проводили программой Graph Pad Prism 5 [4].

Результаты и обсуждение. Независимо от вариантов питательных растворов сухой вес луковиц в наполнителях гравий и гравий + вулк. шлак существенно не различается. Максимальное значение сухого веса сырья получается в наполнителе вулк. шлак и в питательном растворе Давтяна, который превышает контрольный образец в 2,7 раза (табл.1). Концентрации колхицина в наполнителе гравий существенно ниже по сравнению с вариантами гравий + вулк. шлак и вулк. шлак, и за исключением варианта Кнопа, существенно не различаются. Подобная картина значений данных получается в варианте гравий + вулк. шлак. Данные во всех питательных растворах, за исключением варианта Давтяна, равны. Наибольшая концентрация колхицина соответствует наполнителю вулк. шлак в питательном растворе Давтяна. По результатам статистической обработки, при перерасчете выхода колхицина на единицу луковицы абсолютное количество колхицина в наполнителях гравий и смесь гравий и вулк. шлак существенно не различаются, при этом максимальный выход колхицина соответствует наполнителю вулк. шлак (табл.1, 2).

Сравнение данных о питательных растворах показывает, что относительно высокую эффективность по сравнению с остальными вариантами имеет питательный раствор Давтяна. Наивысшие значения сухого веса сырья, концентрации и общего выхода колхицина получаются в этом варианте.

Обобщая все вышеупомянутое, можно утверждать, что из изученных питательных растворов и наполнителей наиболее эффективными являются питательный раствор Давтяна и красный вулканический шлак. Как показано в табл. 2, концентрация колхицина в варианте питательного раствора Давтяна в красном вулк. шлаке превышает контроль в 1,8 раза, а общий выход колхицина из одной луковицы в 4,9 раза. В питательных растворах Стейнера, Чеснокова-Базириной и Кнопа получается похожая, но гораздо менее выраженная картина значений. Значения для весов, концентрации и общего выхода колхицина, как видно из табл. 1 и 2, ниже варианта с раствором Давтяна.

Таблица 1. Продуктивность луковиц колхикума при различных питательных растворах и наполнителях (средние значения опытов 2007-2008 гг.)

Питательный раствор	Физическое состояние сырья	Вес луковиц, г			Прирост веса луковиц, %			Выход луковиц, г/м ²		
		гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак	гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак	гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак
Дав-тяна	све-жее	1,03	1,24	1,58	-6,4	12,7	43,6	82,4	99,2	126,4
	сухое	_a 0,29 ^f	_b 0,39 ^g	_d 0,54 ^h	-17,1	11,4	54,3	23,2	31,2	43,2
Стей-нера	све-жее	0,88	1,07	1,21	-20	-2,7	10	70,4	85,6	96,8
	сухое	_a 0,29 ⁱ	_b 0,36 ^j	_e 0,44 ^j	-17,1	2,9	25,7	23,2	28,8	35,2
Чес-ноко-ва-Базы-риной	све-жее	0,77	1,24	1,14	-30	12,7	3,6	61,6	99,2	91,2

Разность между данными в столбцах и рядах, обозначенные одинаковыми буквами (_aX и _aY, или X^a и Y^a), не достоверна ($p > 0.05$).

Таблица 2. Приживаемость и концентрация колхицина в луковицах колхикума при различных питательных растворах и наполнителях (средние значения опытов 2007-2008 гг.)

Питательный раствор	Физическое состояние сырья	Приживаемость, штук (в каждом варианте высажено 26 шт.)			Приживаемость, %			Концентрация колхицина в сухом сырье, %		
		гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак	гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак	гра-вий	гра-вий + вулк. шлак	вулк. шлак
Дав-тяна	све-жее	24	26	26	92.3	100	100	_a 0,90 ^g ±0,04	_b 1,50 ⁱ ±0,06	_d 1,93 ^j ±0,06
	сухое									
Стей-нера	све-жее	23	25	26	88.5	96.2	100	_a 0,84 ^k ±0,03	_c 1,16 ^l ±0,05	_f 1,22 ^l ±0,05
	сухое									
Чес-ноко-ва-Базы-риной	све-жее	23	26	25	88.5	100	96.2	_a 0,90 ^m ±0,04	_c 1,08 ^m ±0,04	_f 1,38 ⁿ ±0,06

Разность между данными в столбцах и рядах, обозначенные одинаковыми буквами (_aX и _aY, или X^a и Y^a), не достоверна ($p > 0.05$).

Несмотря на низкие показатели, более высокие значения исследуемых параметров получаются в наполнителе вулк. шлак. Это, по всей вероятности, объясняется тем, что именно этот наполнитель обеспечивает оптимальный температурный режим и влажность в ризосфере, которые играют ключевую роль в усваивании минеральных элементов. Нужно также отметить, что вне зависимости от применения различных питательных растворов тенденция распределения весов сырья, соотношения сухого

и свежего весов и концентрации колхицина во всех вариантах в основном схожи, что свидетельствует об однозначном влиянии наполнителя на рост луковиц (рис. 2, табл. 1, 2 и 3).

Таблица 3. Влияние различных питательных растворов и наполнителей на соотношение сухого и свежего весов луковиц

Питательный раствор	Соотношение сухого и свежего весов сырья, %		
	гравий	гравий + вулк. шлак	вулк. шлак
Давтяна	28	31	34
Стейнера	33	34	36
Чеснокова-Базыриной	31	31	37
Кнопа	26	33	36
Почва (контроль)	30		

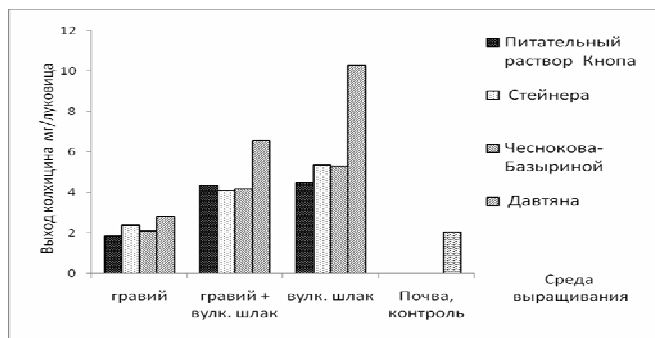


Рис.2. Влияние различных питательных растворов и наполнителей на выход колхицина, мг/луковица.

Таким образом, исследования показали, что беспочвенное выращивание *Colchicum szovitsii* Fish. в условиях Араратской долины возможно и достаточно эффективно. В условиях открытой гидропоники наивысшие показатели по выходу колхицина и весу луковиц обеспечивает питательный раствор Давтяна в красном вулк. шлаке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Վարդանյան Ա., Մանվածյան Ն.: «Գիտություն և տեխնիկա», 8, էջ 38-40, 1978.
2. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н.. Химический анализ лекарственных растений, М., с. 160-161, 1983.
3. Давтян Г.С. Справочная книга по химизации сельского хозяйства. М., Колос, с. 382-385, 1980.
4. Доспехов Б.А.. Методика полевого опыта, М. "Колос", с. 170-172, 1985.
5. Красная Книга Армянской ССР, Айастан, с. 148, 1988.

6. Саруханян Н.Г., Вартанян А.К. Сообщение 14, Институт агрохимических проблем и гидропоники, Размножение деток гладиолуса в условиях открытой гидропоники и почвы., с. 144-147, 1974.
7. Саркисян Э.Д. Институт агрохимических проблем и гидропоники, Сообщение 24, Прорастание деток гладиолуса в условиях гидропоники и почвы., с. 49-53, 1984.
8. Стейнер А. Сообщения ИАПиг, №26, О составе питательного раствора.- издательство НАН РА, Ереван, с 3-19, 1995.
9. Чесноков В. А., Базырина Е.Н., др. Выращивание растений без почвы, Л.: ЛГУ, с. 59-63, 1960.
10. Al-Fayyad M., etc. National Product Letters, 16(6), pp. 395-400, 2002.
11. Mairapetyan S.Kh., Sargsyan Kh.L. Lectures and Abstracts of the IV Conference on 'Modern Problems of Plants Soilless Cultivation', Communications, N31, IHP NAS RA, Gitutyun, Yerevan, p.74-77, 2007.
12. Perumal Samy R. and Gopalakrishnakone P. Venom and Toxin Research Programme, Department of Anatomy Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, 2007.
13. Poutaraud A. and Champay N. Revue Suisse - D'Agriculture, Meadow Saffron (*Colchicum Autumnale* L) a medical plant to domesticate, 27(2), pp. 93-100, 1995.
14. Roight H. and Leblanc R.M. Can J Chem, Photophysical reactions of the colchicine molecule, 51, pp. 2821-2827, 1973.
15. Sargsyan Kh. L. International conference "Biotechnology and Health-2" & DAAD alumni seminar, Yerevan, Armenia, p. 36-40, 2008.
16. Trease S.E., Evans D. 12th edn. Balliere Tindall *Colchicum* seeds and corm in Pharmacognosy, London, pp. 593-597, 1983.
17. Wendelbo P. and Stuart D. Agriculture and Agrarian Reform *Colchicum* L In: C.C. Townsend and Guest (Eds.), pp. 44-53, 1985.
18. WHO. Traditional medicine. Fact sheet N°134, May 2003.

Поступила 02.02.2009.



(Համառոտ հաղորդումներ (Краткие сообщения) (Short communications))

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1 (61), 2009

ԼԵՌՆԱՅԻՆ ՂԱՐԱՔԱՂԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԺԱՆԳԱՄՆԿԵՐԻ ԽՄԲԱՎՈՐՈՒՄՆ ԸՍՏ ՏԵՐ-ԲՈՒՅՄԵՐԻ

Ս.Գ. ՆԱՆԱԳՅՈՒԼՅԱՆ¹, Գ.Գ. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ²

¹ Երևանի պետական համալսարան

² Արցախի պետական համալսարան

Բերված են տվյալներ Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության տարածքում հայտնաբերված 63 տեսակի ժանգասնկերի մասին, որոնք բաշխված են միատեր կամ տարատեր հատկանիշներով: Հայտնաբերված 63 տեսակի ժանգասնկերից 38-ը համարվում են միատեր, իսկ 25-ը՝ տարատեր:

*Տեր-բույս - միատեր ժանգասնկեր - տարատեր ժանգասնկեր -
Լեռնային Ղարաբաղ*

Приводятся данные о 63 видах ржавчинных грибов, обнаруженных на территории Нагорно-Карабахской Республики, которые распределены по признаку одно- или разнохозяйности. Среди них 38 видов являются однохозяйными, а 25 – разнохозяйными.

*Растение-хозяин - однохозяйные ржавчинные грибы - разнохозяйные
ржавчинные грибы - Нагорный Карабах*

The data on 63 species of the rust fungi recorded within the territory of the Nagorno-Karabakh Republic, and allocated on the basis of autoecious or heteroecious, are presented. Among them 38 species are autoecious, and 25 - heteroecious.

Plant-host - autoecious rust fungi - heteroecious rust fungi - Nagorny Karabakh

Ժանգասնկերը մշակովի և վայրի բույսերի հիվանդությունների հարուցիչներ են: Տեր-բույսերի հյուսվածքներում այս կամ այն մակաբույծ օրգանիզմների վարակման պահից սկսվում է բույսի ֆիզիոլոգիական ֆունկցիաների խանգարումները: Ըստ մի շարք գիտնականների, ժանգասնկերով վարակված բույսերի մոտ նվազում է քլորոֆիլի քանակությունը, ինչն անդրադառնում է բույսերի արտաքին տեսքի վրա. ի հայտ են գալիս դեղին գունավորված հյուսվածքներ, քանի որ մեծանում է դեղին պիգմենտների՝ քսանթոֆիլների և կարոտինի քանակությունը, նվազում է ֆոտոսինթեզի էներգիան, ինտենսիվանում շնչառությունը, նվազում է կուտակված ածխաջրերի ընդհանուր քանակը: Վարակված բույսերի ածխաջրային փոխանակության խախտման հետևանքով նվազում է բույսերի ընդհանուր օրգանական զանգվածը, ինչպես նաև խանգարվում է ազոտային փոխանակությունը [7]:

Ժանգասնկերը զգալի վնաս են հասցնում նաև դեկորատիվ ծաղկավոր բույսերին՝ վարակելով նրանց: Բույսերի վարակը ժանգասնկերով ուղեկցվում է տերևների, իսկ երբեմն այլ օրգանների վրա սնկի բշտիկների առաջացմամբ, որոնց շրջապատող հյուսվածքները քլորոֆիլ չեն պարունակում: Դա հանգեցնում է մակերեսային ասիմիլյացիայի նվազման և հետևաբար բույսի թուլացման, երբեմն նաև դեֆորմացման և տերևների ինտենսիվ թափման:

Վարակված բույսերի դեկորատիվ հատկությունն արագ ընկնում է և հողի վրա բուսածածկը հաճախ մահանում է [4]:

Լրիվ ցիկլով զարգացող ժանգասնկերը բնութագրվում են զարգացման հապլոիդ և դիպլոիդ փուլերի (ստադիաների) հաջորդականությամբ: Դրանց մոտ հայտնի է սպորատվության 5 տիպ. սպերմոգոնիումներ՝ սպերմացիումներով, էցիդիումներ՝ էցիդիոսպորներով, ուրեդիումներ՝ ուրեդոսպորներով, տելիումներ՝ տելիոսպորներով և բազիդիումներ՝ բազիդիոսպորներով: Որոշ տեսակների զարգացման լրիվ ցիկլում առկա են սպորատվության բոլոր փուլերը: Օրինակ՝ ցորենի գծային ժանգասունկը (*Puccinia graminis* Pers.): Կան ձևեր, որոնց մոտ այս կամ այն փուլը բացակայում է: Նրանք պատկանում են ոչ լրիվ ցիկլով զարգացող ժանգասնկերին, օրինակ՝ կոկոռչենու ժանգա-սունկը (*Puccinia caricina* DC.), տերեփուկի ժանգասունկը (*Puccinia jaceae* G.H.Otth) և այլն [5]:

Ժանգասնկերի բնութագրիչ առանձնահատկությունը տարատիպությունը կամ տարատուն լինելն է: Որոշների մոտ զարգացման բոլոր փուլերը անցնում են մեկ տեր-բույսի վրա, այդպիսի ժանգասնկերին անվանում են միատեր կամ միատուն և նշանակում Auto- նախածանցով, որը գրվում է ցեղանվան սկզբից, օրինակ՝ փիփերթի ժանգասունկը (*Auto-Puccinia malva-cearum* Mont.), մոշենու ժանգասունկը (*Auto-Phragmidium rubi idaei* (DC.) P.Karst.) և այլն, վեր-ջիններիս վարակը համատարած բնույթ է կրում: Մյուսների մոտ 0 և I փուլերը զարգանում են մեկ բույսի վրա, իսկ 2-րդ և 3-րդ փուլերը՝ մեկ այլ բույսի վրա: Նման ձևով զարգացող ժանգասնկերին անվանում են տարատեր կամ տարա-տուն և նշանակում են Hetero- նախածանցով, որը գրվում է ժանգասնկի ցեղ-անվան սկզբից, օրինակ՝ սալորենու ժանգասունկը (*Hetero-Tranzschelia pruni-spinosae* (Pers.) P.Karst.): Նշենք, որ տարատիպության ժամանակ երկարաձգվում է սնկի զարգացման ժամանակաշրջանը, ինչը կարևոր է այն դեպքերում, երբ տեր-բույսերից որևէ մեկն արագ ավարտում է վեգետացիան, և սունկը չի հասցնում նրա վրա անցկացնել զարգացման ողջ փուլը: Այն բույսերը, որոնց վրա զարգանում են էցիդիումները, կոչվում են միջանկյալ տեր-բույսեր, իսկ բույսերը, որոնց վրա զարգանում են II և III սպորատվության ստադիաները՝ անվանում են գլխավոր կամ հիմնական տեր-բույսեր: *Puccinia graminis* սունկը պատկանում է լրիվ ցիկլով զարգացող, տարբեր տեր ունեցող ժանգասնկերին [3]:

Ժանգասնկերի ժամանակակից ուսումնասիրության էտապում հիմնական ուշադրությունը պետք է սևեռվի սնկերի պոպուլյացիայի կառուցվածքին, ռասային կազմին, գեների վիրուլենտությանը, սորտափոխության նշանակությանը, ժանգասնկերի նկատմամբ ավելի կայուն սորտերի ստեղծման համար նոր մեթոդների կիրառմանը, ինչպես նաև պաթոգեն սնկերի և տեր-բույսերի գենետիկական, ֆիզիոլոգա-կենսաքիմիական փոխհարաբերությունների բացահայտմանը [2]:

Ժանգասնկերի դեմ պայքարի համար խիստ կարևոր է նաև ժանգասնկերով վարակված միջանկյալ տեր-բույսերի ոչնչացումը: Օրինակ՝ ծորենին միջանկյալ տեր է ցորենի ցողունային ժանգասնկի համար, և չպետք է թույլ տալ հացահատիկային կուլտուրաների ցանքն այն շրջաններում, որտեղ տարածված են ծորենու թփերը: Ագրոտեխնիկական միջոցառումները, որոնք սահմանափակում են բույսերի ժանգասնկային հիվանդությունների զարգացումը, նպաստում են հացահատիկային բույսերի բարելավմանը: Պայքարի քիմիական եղանակը (ցանքի մշակում թունաքիմիկատներով) արդյունավետ է միայն բազմամյա կուլտուրաների ժանգասնկերի ոչնչացման, կամ արժեքավոր սելեկցիոն նյութի մշակման համար: Ժանգասնկերի տարածվածությունը կապված է այն բույսերի տարածվածության հետ, որոնց վրա նրանք զարգանում են, և բույսերի երկրագնդով մեկ տարածվածությունը նպաստում է մակաբույծ ցեղերի զարգացմանը [2, 7]:

Վերջին տարիներին աշխարհում ցորենի ցողունային ժանգասնկի (*Puccinia graminis* Pers. f. *tritici*) զանգվածային զարգացում հազվադեպ է դիտվել: Վարակի համեմատաբար թույլ արտահայտվածությունը պայմանավորված է արտադրությունում ցորենի ցողունային ժանգասնկի նկատմամբ կայուն սորտերի ստացմամբ և հիմնականում վեգետացիոն շրջանի բնակլիմայական պայմաններով, որը դանդաղեցնում է ցորենի վրա սնկի զարգացումը միջանկյալ տեր-բույսի՝ ծորենու վրա սնկի սեռական պրոցեսի ավարտից հետո: Համեմատաբար բարենպաստ պայմանների ժամանակ վարակը ցորենի ցանքերում դիտվել է առանձին օջախների ձևով [6]:

Սկսած 2005 թվականից Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության (ԼՂՀ) տարածքում կատարվում են հետազոտական աշխատանքներ, որոնց արդյունքում հայտնաբերվել են 63 տեսակի ժանգասնկերով վարակված 72 բուսատեսակներ [1]: ԼՂՀ տարածքում հայտնաբերված ժանգասնկերն ըստ զարգացման առանձնահատկությունների (միատեր և տարատեր) խմբավորված և ներկայացված են աղյուսակ 1-ում:

Աղյուսակ 1. ԼՂՀ ժանգասնկերի խմբավորումն ըստ տեր-բույսերի մասնագիտացվածության

Ժանգասնկերի ցեղերը	Տարատեր	Միատեր
<i>Puccinia</i>	13	23
<i>Uromyces</i>	2	9
<i>Phragmidium</i>	-	5
<i>Gymnosporangium</i>	3	-
<i>Melampsora</i>	3	-
<i>Coleosporium</i>	2	-
<i>Aecidium</i>	-	1
<i>Pucciniastrum</i>	1	-
<i>Tranzschelia</i>	1	-
<i>Ընդամենը</i>	25	38

ԼՂՀ-ում հայտնաբերված սնկերի մեծամասնությունը պատկանում է միատեր ժանգասնկերին, այսինքն՝ իրենց զարգացման ողջ ցիկլն անց են կացնում միայն մեկ տեր-բույսի վրա: Համեմատության համար նշենք, որ Հայաստանում նույնպես գերակշռում են միատեր ժանգասնկերը՝ միատեր 167 տեսակ, տարատեր՝ 88 [6]:

2005-2007 թթ. կատարված ուսումնասիրությունների արդյունքում հայտնաբերվել են 38 միատեր և 25 տարատեր ժանգասնկեր: Միատեր ժանգասնկերից 23-ը պատկանում են *Puccinia*, 9-ը՝ *Uromyces*, 5-ը՝ *Phragmidium* և 1-ը՝ *Aecidium* ցեղերին: *Puccinia* ցեղին պատկանող միատեր ժանգասնկերից 11-ը մակաբուծում են բարդաձաղկավորների, 3-ը՝ խուլեղինջազգիների, 3-ը՝ նեխուրազգիների, 2-ը՝ տորոնազգիների և մեկական՝ տուլոտազգիների, մանուշակազգիների, հացազգիների, շուշանազգիների ընտանիքներին պատկանող բույսերի վրա: *Puccinia* ցեղի տարատեր ժանգասնկերը թվով 13-ն են, որոնցից 3-ը մակաբուծում են հացազգիների, երկուական՝ խուլեղինջազգիների, քարբեկազգիների, մատիտեղազգիների և մեկական՝ գաղտրիկազգի-

ների, իշակաթնուկազգիների, եղինջազգիների, դժնիկազգիների, ծորենազգիների ընտանիքներին պատկանող բույսերի վրա: *Uromyces* ցեղին պատկանող միատեր ժանգասնկերը թվով 9-ն են, որոնցից 7-ը զարգանում են բակլազգիների և մեկական՝ խլածաղկազգիների, մատիտեղազգիների ընտանիքներին պատկանող բույսերի վրա: *Phragmidium* ցեղի բոլոր ժանգասնկերը միատեր են և մակաբուծում են վարդազգիների վրա: *Aecidium* ցեղի մեկ ժանգասնկ հայտնաբերվել է իշակաթնուկի վրա:

ԼՂՀ-ում հայտնաբերված տարատեր ժանգասնկերը թվով 25-ն են, որոնցից 13-ը պատկանում են *Puccinia*, 3-ը՝ *Gymnosporangium*, 3-ը՝ *Melampsora*, 2-ը՝ *Uromyces*, 2-ը՝ *Coleosporium* և մեկական՝ *Tranzschelia*, *Pucciniastrum* ցեղերին: *Puccinia* ցեղին պատկանող ժանգասնկերից 3-ը մակաբուծում են հացազգիների, 2-ը՝ մատիտեղազգիների և մեկական՝ գորտնուկազգիների, գաղտրիկազգիների, ծորենազգիների, քարբեկազգիների, շրթնածաղկավորների, դժնիկազգիների, եղինջազգիների և մանուշակազգիների ընտանիքների բույսերի վրա: *Melampsora* ցեղի ժանգասնկերից 2-ը հայտնաբերվել են ուռազգիների և 1-ը՝ քարբեկազգիների վրա: Հայտնաբերվել են *Gymnosporangium* ցեղի 3 տեսակ, որոնք բոլորն էլ մակաբուծում են վարդազգիների վրա: Հայտնաբերվել են *Coleosporium* ցեղի 2 ներկայացուցիչ՝ բարդածաղկավորների և զանգակազգիների ընտանիքների բույսերի վրա, ինչպես նաև *Uromyces* ցեղի 2 տեսակ, որոնք մակաբուծում են մատիտեղազգիների և մեխակազգիների վրա: Մեկական ներկայացուցիչ նշվել են *Tranzschelia* և *Pucciniastrum* ցեղերից, որոնք համապատասխանաբար մակաբուծում են վարդազգիների և իշակաթնուկազգիների վրա:

Այսպիսով, Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության տարածքում կատարված աշխատանքների արդյունքում հայտնաբերված 63 տեսակի ժանգասնկերից 38-ը համարվում են միատեր, իսկ 25-ը՝ տարատեր: Ե՛վ միատեր, և՛ տարատեր սնկերի թվում գերակշիռ մասը կազմում են *Puccinia* ցեղի ներկայացուցիչները:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Նանազյույյան Ս.Գ., Մարգարյան Գ.Գ. ԵՊՀ-ի գիտական տեղեկագիր, բնական գիտություններ, 3, с.131-136, 2008:
2. Азбукина З.М. Ржавчинные грибы (Низшие растения, грибы и мохообразные). Владивосток, с.616, 2005.
3. Бенуа К.А., Карпова-Бенуа Е.И. Паразитные грибы Якутии. Новосибирск, с.336, 1973.
4. Карпенко Т.В., Русанов В.А. Современная микология в России, М., 2, с.180, 2008.
5. Купревич В.Ф., Ульянищев В.И. Определитель ржавчинных грибов СССР. Минск, 1, с.336, 1975.
6. Лекомцева С.Н., Волкова В.Т., Зайцева Л.Г., Чайка М.Н. Микология и фитопатология, 38, 5, с.68-73, 2004.
7. Тетеревникова-Бабаян Д.Н. Микофлора Армянской ССР, Ржавчинные грибы, Ереван, изд-во ЕГУ, 4, с.484, 1977.

Ստացվել է 15.01.2009



Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ИНСЕКТИЦИДА МОСПИЛАН С ПОМОЩЬЮ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В.С. МИРЗОЯН, Л.А. АДЖЕМЯН, Т.Д. КАРАПЕТЯН, Р.М. АНИСЯН

Научный центр земледелия и защиты растений, 1101, Эчмиадзин

Разработан тонкослойный хроматографический метод определения инсектицида моспилан в воде, в плодах томата и огурцов. Чувствительность метода составляет в воде 0,0025 мг/л, в плодах томата и огурцов 0,05 мг/кг, воспроизводимость метода - 87,5-97,7 %.

Тонкослойная хроматография – инсектицид моспилан – остаточные количества -чувствительность метода

Մշակվել է նրբաշերտ քրոմատոգրաֆիկ մեթոդ ջրում, լոլիկի և վարունգի պտուղներում մոսպիլան ինսեկտիցիդի մնացորդային քանակների որոշման համար: Հայտնաբերվող նվազագույն քանակությունը ջրում կազմում է 0,0025 մգ/լ, լոլիկի և վարունգի պտուղներում 0,05 մգ/կգ: Կորզման միջին գործակիցն է 87,5-97,7 %:

Նրբաշերտ քրոմատոգրություն - ինսեկտիցիդ մոսպիլան - մնացորդային քանակներ - մեթոդի զգայունություն

An easy, fast and reliable thin chromatographic method for residue analytical determination of Mospilan in water, cucumber and tomato samples has been developed. The sensitiveness of the method is 0,0025 mg/l in water samples, 0,05 mg/kg – in tomato and cucumber. The recovery is 87,5-97,7%.

Thin layer chromatography - insecticide Mospilan – residues - sensitiveness of the method

Обработка сельскохозяйственных культур пестицидами может приводить к их накоплению в растениях, поэтому наличие остатков препаратов в урожае является критерием, характеризующим качество продукции. Данные токсикологических исследований необходимы для уточнения доз и сроков обработки препаратов против основных вредителей растений.

Разумеется для осуществления этой задачи необходимо иметь доступные методы определения остатков пестицидов. В настоящее время для оценки остаточных количеств инсектицида моспилан применяется жидкостная хроматография при высоком давлении (HPLC), что требует дорогостоящего оборудования [2, 3]. В связи с этим нами разработан сравнительно доступный метод для оценки остаточных количеств инсектицида моспилан в воде и в ряде сельскохозяйственных продуктов при применении хроматографии в тонком слое.

Материал и методика. Моспилан - системный инсектицид контактно-желудочного действия, эффективный в борьбе с представителями семейства чешуйчатокрылых - *Lepidoptera*, полутвердокрылых *Hemiptera*, трипсов - *Thysanoptera*, твердокрылых - *Coleoptera* и равнокрылых - *Homoptera* и т.д. Действует на центральную нервную систему насекомых. Принадлежит к классу неоникотиноидов [4].

Производитель: "Ниппон Сода Ко., Лтд." Япония.

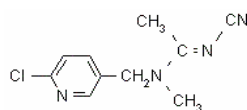
В Армении применяется в закрытом грунте для борьбы с тепличной белокрылкой томата и огурцов.

Действующее вещество моспилана ацетамиприд (200 г/кг) - (E)-N-[(6-хлоро-3-пиридинил) метил]-N2-циано-N1-метилацетамидин. Белое кристаллическое вещество. Точка кипения 101,0–103,3°. Растворяется в ацетоне, метаноле, этаноле, хлороформе, ацетонитриле, тетрагидрофуране. Растворимость в воде при 25° 4200 мл/л. Т. пл. 101,0-103,3°. Эмпирическая формула - C₁₀H₁₁ClN₄. Молекулярная масса 222, 68 г/мол. Стабилен при pH=7. При pH=9 и температуре 45° подвержен гидролизу и разложению.

Специфика: 97% тех, 20% SP, 20% SL, 40%WDG, 70% WP, 70% SP.

Токсикология: LD₅₀: 217 мг/кг (самец крыса), 146 мг/кг (самка крыса).

Химическая структура:



Другие коммерческие названия: "Assail" (Aventis), "Rescate" (Nippon Soda, Aventis), "Saurus" (Nippon Soda, Aventis).

Экстракция препарата из анализируемой пробы. Вода. 200 мл воды наливают в делительную воронку, прибавляют химически чистый хлористый натрий до образования насыщенного раствора и экстрагируют препарат хлороформом (30 мл) трижды по 15 мин. Хлороформный слой сливают, фильтруют через воронку с безводным сульфатом (б/в) натрия в колбу для отгонки растворителя и отгоняют хлороформ до объема 0,2-0,5 мл, после чего наносят на хроматографическую пластинку.

Плоды и вегетативные органы томата, огурцов.

Экстракция хлороформом. 20-25 г мезги помещают в колбу с притертой пробкой, заливают хлороформом до покрытия пробы. Смесь перемешивают на аппарате для встряхивания в течение 1 ч, затем фильтруют. Экстракцию повторяют 2 раза по 15 мин. Объединенные экстракты выпаривают.

Экстракция ацетоном. 25 г растертой в ступке мезги заливают 50%-ным водным раствором ацетона (30-50 мл) и ставят на качалку на 1 час. Пробу отфильтровывают через бумажный фильтр, снова заливают растворителем и ставят на качалку на 15 мин, повторяя эту манипуляцию дважды. Объединенные экстракты выпаривают. Остается 25-30 мл воды, из которой препарат дважды извлекают хлороформом (30 мл) как описано выше.

Очистка экстрактов. С целью освобождения от воска применяется очистка ацетонитрилом: сухой остаток растворяют в 3-5 мл ацетонитрила, прибавляют 50 мл дистиллированной воды и 2 г поваренной соли. Смесь вымораживают в течение ночи. Холодный раствор фильтруют в колбу, куда заранее вливают 30 мл хлороформа. По окончании фильтрации экстракт помещают в делительную воронку и отделяют нижний хлороформный слой. Экстракцию повторяют дважды. Объединенные экстракты пропускают через б/в сернокислый натрий и выпаривают до объема 0,1-0,2 мл.

Сильноокрашенные растворы обесцвечивают с помощью добавления активированного угля (марки БАУ), который добавляют в количестве 5-10 г. Колбу держат в водяной бане или термостате при 65-70° в течение 30 мин, после чего экстракт фильтруют через складчатый фильтр с б/в сернокислым натрием. Колбочку и фильтр дважды промывают хлороформом. Экстракт выпаривают до 0,1-0,2 мл и наносят на пластинку.

Хроматографирование. На стартовую линию пластинки чешского производства "Silufol-254" микропипеткой количественно переносится остаток упаренного экстракта. Рядом с пробой наносят стандартные растворы с различным содержанием препарата (2-5-10 мкг). После этого пластинку помещают в камеру для хроматографирования, куда за 10 мин до разгонки наливают растворитель - гексан-ацетон (1:1).

После поднятия линии фронта на 10 см, пластинку вынимают из камеры, отмечают линию фронта и оставляют несколько мин на воздухе.

Пластинку сначала обрабатывают смесью бромфенолового синего и нитрата серебра (1 мл ацетона растворяют в 50 мг бромфенолового синего и доводят до 10 мл 1%-ным раствором нитрата серебра в 30 %-ном водном ацетоне. Через 5 мин после опрыскивания хроматограмму обрабатывают 1%-ным раствором лимонной кислоты или 10%-ным раствором уксусной кислоты. Моспилан проявляется в виде голубых пятен на желтом фоне. Коэффициент распределения (R_f) препарата на пластинке "Silufol-254" составляет 0,34.

Количественное определение проводят путем визуального сравнения окраски и размера пятен пробы и стандартных растворов по формуле, предложенной Клисенко и др. [1]:

$$X = A/B,$$

где X - содержание препарата в пробе, в мг/кг или мг/л;

A – количество препарата, найденное путем визуального сравнения со стандартным раствором в мкг;

B – навеска или объем анализируемой пробы в мг или мл.

Метрологическая характеристика метода представлена в табл. 1.

Таблица 1. Метрологическая характеристика метода

Анализируемый объект	Среднее значение определения, %	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, %	Доверительный интервал при $p=0,05$	Предел обнаружения, мг/л, мг/кг
Вода	97,7	2,5	2,5	6,2	0,0025
Огурцы	87,5	10,9	12,5	12,1	0,05
Томаты	92,0	10,1	11,0	14,0	0,05

Результаты исследований показывают, что метод обладает высокой чувствительностью, что дает возможность применения его при определении микроколичеств моспилана в воде, плодах огурцов и томата.

Таким образом, разработана доступная методика определения остаточных количеств инсектицида моспилан, основанная на тонкослойной хроматографии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клисенко М.А., Лебедева Т.А., Юркова З.Ф. Химический анализ микроколичеств ядохимикатов. М., Медицина, 1972.
2. Agüera A., Almansa E., Malato S., Maldonado M.I., Fernandez-Alba A.R. *Analisis*, 26, 245-25, 1998.
3. Obana H, Okihashi M, Akutsu K, Kitagawa Y, Hori S. J. *Agric Food Chem.* Jul 31; 50, 16, 4464-7, 2002
4. Tomlin C (ed). *The Pesticide Manual*, 10th Ed. British Crop Protection Council. Blackwell Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, 1994.

Поступила 27.10.2008



Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1 (61), 2009

**ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՂ
ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐՈՒՄ
ՖՈՍՖՈՐԻ ՄԻԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՓՈԽԱԿԵՐՊՈՂ
ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԻԶՄՆԵՐԻ ԱՌԿԱՅՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ**

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ, Ի.Բ. ԲԱՂԴԱՍԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Մանրէաբանության և մանրէների ավանդադրման կենտրոն, 2201, ք. Արմավիր

Բացահայտվել է ազոտֆիքսող միկրոօրգանիզմների համակեցությունների և այնտեղ առկա դիազոտրոֆների ու դրանց ուղեկցող մանրէների ֆոսֆորի օրգանական և անօրգանական միացությունների փոխակերպման ունակությունը:

Համակեցություն - դիազոտրոֆներ - ազոտֆիքսացիա - ազոտոբակտեր - բացիլներ

Выявлена способность трансформации органических и неорганических соединений фосфора в сообществах азотфиксирующих микроорганизмов, присутствующих в них диазотрофов и сопутствующих им бактерий.

Сообщество - диазотрофы - азотфиксация - азотобактер - бациллы

The ability of communities of nitrogen-fixing microorganisms and diazotrophs existing there as well as accompanying microbes to transform organic and non-organic compounds of phosphorus is established.

Community - diazotrops - nitrogen fixation - azotbacter - bacilla

Հայտնի է, որ, մի շարք միկրոօրգանիզմներ ունակ են հանքային-նացնելու ինչպես ֆոսֆորի օրգանական միացությունները, այնպես էլ անլուծելի հանքային միացությունները վերածելու լուծելի ձևերի: Այդ միկրոօրգանիզմները կարևոր նշանակություն ունեն բույսերի ֆոսֆորային սննդառության կարգավորման ու բերքատվության բարձրացման գործում: Ցույց է տրված, որ ֆոսֆորը տարալուծող միկրոօրգանիզմները՝ այդ թվում նաև *Bacillus polymyxa* տեսակը, ունակ են առաջացնելու աուքսինանման և գիբբերելինանման նյութեր (6): Բերվածից ելնելով պատահական չէ, որ վերջերս *B. polymyxa* -ն օգտագործվում է որպես բակտերիալ պարարտանյութ շաքարի ճակնդեղի աճը խթանելու համար (4):

Վերջին երկու տասնամյակներում մեր կողմից ուսումնասիրվել են տարբեր բույսերի արմատային զոնայում զարգացող ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունների (ԱՄՀ) կազմը, կենսաբանական առանձնահատկությունները, միկրոօրգանիզմների փոխհարաբերության յուրահատուկ բնույթն ու ազոտֆիքսացիայի հարցերը (1, 2): Մակայն, ընդհանուր առմամբ առայժմ սակավ են տեղեկություններն այն մասին, թե ԱՄՀ-ների կազմում առկա են ֆոսֆորի միացությունները փոխակերպող միկրոօրգանիզմներ: Ներկայացված աշխատանքը նվիրված է այդ ուղղությամբ մեր կատարած ուսումնասիրություններին:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունների նյութ են հանդիսացել Հայաստանի տարբեր հողերից, ջրերից ու հացազգի բույսերի արմատային զոնայից նախկինում մեր կողմից մեկուսացված 140 ԱՄՀ-ները, դրանցում զարգացող դիազոտրոֆներն ու ուղեկցող այլ մանրէները:

Փորձարկված համակեցությունների ու կուլտուրաների ֆոսֆորի օրգանական և անօրգանական միացությունների հանքայնացման ու փոխակերպման ունակությունը որոշվել է Մենկինայի (զլ. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,5, NaCl - 0,3, KCl - 0,3, MgSO_4 - 0,3, FeSO_4 - հետ., գլյուկոզա - 10, CaCO_3 - 5, նուկլեինաթթու - 5, ազար - 20) և Պիկովսկայայի (NaCl - 0,2, MgSO_4 - 0,1, MnSO_4 - հետ., FeSO_4 - հետ., գլյուկոզա - 20, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 5, ազար - 20) սննդամիջավայրերում, դրանց զարգացման ու CaCO_3 -ի և $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ի տարալուծման զոնայի առաջացման հատկության հիման վրա (3):

ԱՄՀ-ներում զարգացող կուլտուրաների ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը երեք կրկնողությամբ որոշվել է ագեսիլենային եղանակով Վինոգրադսկու 3 մլ հեղուկ սննդամիջավայր պարունակող պենիցիլինի սրվակներում (5):

Արդյունքներ և քննարկում: Աղ. 1-ում զետեղված տվյալներից պարզորոշ նկատվում է, որ ուսումնասիրված ԱՄՀ-ները և այնտեղ առկա առանձին կուլտուրաները հիմնականում օժտված են օրգանական ֆոսֆորը հանքայնացնելու հատկությամբ: Այդ առանձնահատկությամբ օժտված են նաև դիագոտրոֆները, չնայած ֆոսֆորի անօրգանական միացությունների փոխակերպման հատկությունը փորձարկված 42 ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսատորներից միայն երկուսի մոտ է հայտնաբերվել: Անօրգանական ֆոսֆորի տարալուծման ունակությունը, ինչպես և սպասվում էր, հիմնականում ի հայտ է եկել ԱՄՀ-ների և դրանցում զարգացող դիագոտրոֆներին ուղեկցող որոշ բակտերիաների մոտ:

Աղյուսակ 1. Օրգանական և անօրգանական ֆոսֆորը փոխակերպող ԱՄՀ-ների և նրանց կոմպոնենտների թիվը

ԱՄՀ – ներ, կուլտուրաներ	Ուսումնասիրված ԱՄՀ –ների և կուլտուրաների թիվը	Օրգանական ֆոսֆորը հանքայնացնողներ	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ – ը փոխակերպողներ
ԱՄՀ –ներ	31	19	16
Դիագոտրոֆներ	42	34	2
Դիագոտրոֆներին ուղեկցող այլ բակտերիաներ	67	55	26

Առանձնապես ուշագրավ է այն փաստը, որ Հայաստանի հողերում մեծ տարածում ունեցող ազոտոբակտերը օժտված չէ ֆոսֆորի ինչպես օրգանական, այնպես էլ անօրգանական միացությունների փոխակերպման հատկությամբ (աղ. 2): Օրգանական ֆոսֆորի թույլ տարալուծում նկատվել է միայն *A. armeniacus*-ի մոտ, չնայած այդ հատկությամբ օժտված են փորձարկված այլ ցեղերի պատկանող դիագոտրոֆները: Ինչ վերաբերում է անօրգանական ֆոսֆորի փոխակերպմանը, ապա պետք է նշել, որ ուսումնասիրված դիագոտրոֆներից այդ հատկությունը ի հայտ է եկել միայն *Clostridium sp.*-ի (աղ. 2) և Սևանի ավազանի ջրից նախկինում մեր կողմից մեկուսացված *Klebsiella sp.* 56 -ի մոտ:

Աղ. 2-ում ներկայացված տվյալներից պարզորոշ նկատվում է նաև, որ ֆոսֆորի անօրգանական միացությունների փոխակերպման հատկությամբ առանձնապես աչքի են ընկել ԱՄՀ-ներում դիագոտրոֆներին ուղեկցող այն բակտերիաները, որոնք ունակ չեն ֆիքսել ազոտ: Ստացված տվյալները կարևոր են ԱՄՀ-ներում զարգացող տարբեր միկրոօրգանիզմների կենսաբանական առանձնահատկությունների և դրանց միջև գոյություն ունեցող տրոֆիկական կապերի բացահայտման առումով:

Աղյուսակ 2. ԱՄՀ-ների և նրանց կոմպոնենտների ֆոսֆորի միացությունների փոխակերպման ակտիվությունը (CaCO_3 -ի և $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -ի լուծման զոնայի տրամագիծը մմ-ով)

ԱՄՀ-ներ	Դիագնոստիկներ և նրանց ուղեկցող այլ բակտերիաներ	Ազոտի ֆիքսման ունակությունը	Մենկինայի սննդա-միջավայր	Պիկովա-կայայի սննդա-միջավայր
A42	համակեցություն	-	10	14
	<i>A. armeniacus</i>	-	7	0
	<i>Klebsiella sp.</i>	-	8	0
	<i>Bacillus sp.</i>	-	8	0
	<i>Erwinia sp.</i>	-	8	12
U(97(32	համակեցություն	-	12	14
	<i>A. chroococcum</i>	-	0	0
	<i>Clostridium sp.</i>	-	12	14
	<i>Pseudomonas sp. 1</i>	-	8	16
	<i>Pseudomonas sp. 2</i>	-	8	12
	<i>Klebsiella sp.</i>	-	8	12
98 - 45	համակեցություն	-	10	18
	<i>A. chroococcum</i>	-	0	0
	<i>Mycobacterium sp.</i>	-	0	0
	<i>Klebsiella sp.</i>	-	10	12
	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	0	0
99 (96	համակեցություն	-	8	16
	<i>A. chroococcum</i>	-	0	0
	<i>Klebsiella sp. 1</i>	-	8	12
	<i>Klebsiella sp. 2</i>	-	10	10
	<i>Pseudomonas sp.</i>	-	8	0

Հաշվի առնելով ներկայացվածը կարելի է եզրակացնել, որ բնական պայմաններում փորձարկված ԱՄՀ-ները, զարգանալով հացազգիների արմատային զոնայում, կարող են զգալիորեն նպաստել բույսերի ինչպես ազոտային, այնպես էլ ֆոսֆորային սննդառությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Նիկողոսյան Վ.Գ. Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 51, 3, 166-171, 1988.
2. Նիկողոսյան Վ.Գ. Դոկտորական ատենախոսության սեղմագիր, Արմվյան 1998.
3. Бабаян Г.С. Автореф. канд. дис., Ереван, 1967.
4. Токмакова Л.Н. Микробиол. ж., 596, 4, 131-138, 1994.
5. Hardi R.W., Holsten R.D., Jochson E.K., Burns R.C. Plant Physiol. 43, 1185-1207, 1968.
6. Satter M.A., Gaur A.C. Zbl. Microbiol. 142, 393-395, 1987.

Ստացվել է 15.12.2008.



• Համառոտ հաղորդումներ • Краткие сообщения • Short communications •

Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

БИОАКУСТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА АМФИБИЙ АРМЕНИИ

Ջ. Մ. ԵԳԻԱԶԱՐՅԱՆ

Երևանский государственный университет, кафедра зоологии

Исследованы брачные крики различных представителей класса амфибий, обитающих на территории Армении. Установлено, что многие параметры звуков амфибий являются видоспецифическими и могут выполнять роль основного изолирующего фактора.

Амфибии – биоакустика – брачные крики – изолирующие механизмы

Հետազոտված են երկկենցաղների դասի տարբեր ներկայացուցիչների զուգավորման ձայները: Հաստատված է, որ երկկենցաղների ձայների մի շարք չափանիշներն ունեն տեսակային նշանակություն և կարող են կատարել հիմնական մեկուսացնող գործոնի դեր:

*Երկկենցաղներ - կենսաակուստիկա - զուգավորման ձայներ -
մեկուսացնող մեխանիզմներ*

The mating calls of different representatives of Armenian Amphibians are investigated. It was revealed that most of parameters of amphibians' calls are species-specific and may realize an isolating factor role.

Amphibians, bioacoustic, mating calls, isolating mechanisms

Amphibian - bioacoustic - mating calls - isolating mechanisms

В последние годы особое место в ряду методов исследования фауны в целом, и батрахофауны в частности, занимает биоакустика, возникшая как область зоологии очень давно. Предметом биоакустики является изучение биологических сигналов, способы кодирования в них биологической информации, механизм их воспроизведения, приема и анализа, их роль в поведении, а также звуковое общение животных в популяции и биоценозе. В наиболее развитой форме звуковая сигнализация встречается у бесхвостых амфибий.

В силу высокой специализации большинства видов и приуроченности отдельных популяций к небольшим участкам, пространственно изолированным друг от друга, у амфибий часто наблюдаются географические различия в разных аспектах брачного поведения, в том числе и в брачных криках. У видов с широким ареалом географическая изменчивость брачного крика может выражаться в различиях по доминирующей частоте, частоте импульсов в песне, продолжительности крика и скорости его повторения. Такие же различия наблюдаются и в брачных криках симпатрических популяций близких видов.

Несомненно, что во многих случаях видоспецифические черты брачного крика способствуют правильному выбору партнера и страхуют вид от гибридизации или напрасной траты репродуктивной энергии. Однако если бы брачный крик различных видов всегда служил надежным изолирующим механизмом, то у амфибий, вероятно, не было бы столь большого разнообразия в сроках и способах размножения. Обычно в качестве дополнительных видоспецифических критериев у амфибий выступают еще и тактильные раздражители, визуальные и обонятельные стимулы, физиологические и этологические особенности, различия в размещении покоющих самцов и, наконец, различия в местах и сроках размножения. Тем не менее, среди разнообразных звуковых сигналов, издаваемых амфибиями, брачный крик – единственный сигнал, выполняющий роль блокирующего гибридизацию механизма.

Нами были исследованы брачные крики различных представителей класса амфибий, обитающих на территории Армении.

При исследовании звуковых сигналов, издаваемых обыкновенной чесночницей, нами было установлено, что зона повышенной чувствительности к звуковым сигналам у обыкновенной чесночницы составляет примерно 500-1500 Гц, при этом отчетливо выражен участок наивысшей чувствительности в 800 Гц [1].

Наличие двух групп древесных лягушек (*H. savignyi* и *H. a. schelkownikowi*) в Армении очень примечательно и поднимает вопрос их экологических потребностей. Картина распространения этих двух видов древесных лягушек позволяет предположить, что они предъявляют различные требования к экологическим параметрам местообитаний.

Диапазон частот, на которых зарегистрированы крики *H. savignyi*, лежит в промежутке от 0,15 до 2,2 кГц, наибольшее их значение – 0,5 – соответствует частоте 1 кГц. Спектр сигналов *H. a. schelkownikowi* расположен в пределах от 0,12 до 1,3 кГц с максимумом на частоте 0,8 кГц [3]. Спектр сигналов *H. a. arborea* наиболее высокочастотен из 3-х исследованных групп квакш, нижняя и верхняя граничные частоты его больше, чем таковые для 2-х других подвигов обыкновенной квакши, диапазон занимаемых частот в этом случае также наибольший. Граничные частоты брачных криков *H. a. schelkownikowi* имеют наименьшее значение, область частот, на которых излучают эти животные, также занимает наименьший диапазон. Спектр звуковых сигналов *H. savignyi* по всем этим параметрам занимает промежуточное положение.

Таким образом, крики *H. savignyi* сильно отличаются от криков *H. a. schelkownikowi*, несмотря на то, что два этих подвида довольно близки географически. При этом брачные крики *H. a. schelkownikowi* из Армении имеют большее сходство между с криками *H. a. arborea* из Центральной Европы.

Брачные крики озерных лягушек состоят из групп импульсов. Амплитуда импульсов в начале каждой группы является небольшой, затем быстро увеличивается и около середины достигает максимума, звуковая энергия распределяется в основном в диапазоне частот 1500-2500 Гц. Установлено также, что многие параметры криков озерных лягушек коррелируют с температурой воды [5]. При повышении температуры сокращается как длительность криков, так и перерывы между ними. Эти изменения отражаются и на периоде крика, что основывается на отрицательной корреляции трех параметров крика с температурой воды: длительности группы импульсов, интервала между ними и числа импульсов на группу.

Как показывают многочисленные исследования, параметры брачных криков крайне эффективны в интерпретации систематических взаимоотношений, поскольку они кодируют различные типы информации [6]. В репродуктивный период именно брачный крик выполняет роль основного изолирующего фактора для представителей разных видов и сближающего фактора для особей одного вида. И именно это делает его видоспецифическим признаком.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами установлено, что многие параметры звуков амфибий являются видоспецифическими. Это – длительность крика, амплитудно-временные характеристики одиночного импульса, наличие или отсутствие межимпульсного интервала, зависимость этих параметров от температуры воздуха и тела животного и т. д., что согласуется с данными, имеющимися в литературе [8]. В связи с этим, применение методических подходов биоакустических исследований для выявления филогенетических связей, а также систематического статуса представителей аллопатрических видов и в особенности видов, образующих комплексы, вполне оправданно [2,8]. Более того, такой подход позволяет выделять внутри комплексов самостоятельные виды, четко различающиеся по биоакустическим параметрам, в частности по характеристическим признакам брачных криков, а значит – возможности внутрикомплексных спариваний и существовании механизмов изоляции [4,7,9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Егуазарян Э. М. Видовая дифференциация амфибий, распространенных на территории Армении. Известия аграрной науки (Грузия, Тбилиси), 2007.
2. Borkin L. J. Distribution of Amphibians in North Africa, Europe, Western Asia, and the former Soviet Union. In: W. E. Duellman (ed.), Patterns of Distribution of Amphibians. A Global Perspective, John Hopkins Univ. Press, 1999: 329-420.
3. Egiasarjan E. M., Schneider H.. The mating calls of tree frogs in Armenia. Zoologisc.Anzeigep. 225, 1990, Gustav Fischer Verlag Jons.
4. Gerhardt H. C. The evolution of vocalization in frogs and toads. Ann. Rev. Ecol. Syst., 1994, 25, 293-324.
5. Schneider H., Egiasarjan E. M., The structure of the calls of lake frogs (*Rana ridibunda*: Amphibia) in the Terra typica Restricts. Zoologisc.Anzeigep. 227, 1991, Gustav Fischer Verlag Jons: 121-135.
6. Schneider H., Yegiasaryan E. M. The mating calls of the green toad (*Anura*, Amphibia) in Kazakhstan. Russian J. of Herpetol., 1995, 2: 1-4.
7. Stöck M. Mating call differences between diploid and tetraploid green toads (*Bufo viridis* complex) in Middle Asia. Amphibia-Reptilia, 1998, 19: 29-42.
8. Stöck M., Bretschneider P., Grosse W.-R. The mating call and male release call of *Bufo raddei* Strauch, 1876 with some phylogenetic implications. Russian Journal of Herpetology, 2000, 7, (3): 215-226.
9. Stöck M., Schmidt M., Steinlein C., Grosse W.-R. Mosaicism in somatic triploid specimens of the *Bufo viridis* complex in the Karakoram with examination of calls, morphology and taxonomic conclusions. Ital. J. Zool., 1999, 66 (3): 215-232.

Поступила 02.02.2009