

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

3

Издаётся с 1946 года
Айастані кенсабанақан андес,
выходит 12 раз в год
на армянском и русском языках

Խմբագրական կոլեգիա՝ Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Կ. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Հ. Գ. Բակլավադյան, Հ. Գ. Բատիկյան, Ա. Շ. Գալստյան (գլխխմբագրի տեղակալ), Ժ. Ի. Հակոբյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Կ. Ս. Մարթանյան (պատ. քարտուղար), Ս. Հ. Մովսիսյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Շ. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Է. Գ. Աֆրիկյան (խորհրդի նախագահ), Գ. Ն. Բարսեղյան, Ս. Ա. Բակունց, Ա. Լ. Քախտաջյան, Պ. Ա. Խորշուդյան, Ս. Կ. Կարապետյան, Ե. Հ. Հասրաթյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Լ. Լ. Հովսեփյան, Լ. Ս. Ղամբարյան, Ա. Ա. Մաթևոսյան, Մ. Կ. Չալիախյան, Ս. Հ. Պողոսյան, Մ. Կ. Տեր-Մինասյան:

Редакционная коллегия: Ц. М. Авакян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Аконян, Э. К. Африкян (главный редактор), О. Г. Баклаваджян, Г. Г. Батикян, А. Ш. Галстян (зам главного редактора), В. О. Казарян, К. С. Марджанян (ответ. секретарь), С. О. Мовсисян.

Редакционный совет: А. С. Аветян, В. Ш. Агабабян, Н. Н. Акрамовский, Э. А. Асратян, Э. К. Африкян (пред. совета), Д. Н. Бабалян, С. А. Бакунц, Л. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осипян, С. А. Погосян, А. Л. Тахтаджян, М. Е. Тер-Минасян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлахян.

Բ Ո Վ Ա Ն Դ Ա Կ Ո Ւ Թ Յ Ո Ւ Ն

Փորձառական

Ղազարյանց Մ. Գ., Հակոբյան Ժ. Ի. Ֆերմենտների տրանսֆորմացիայի ակտուալ հարցերը 221

Կազանչյան Ա. Ֆ., Վարդանյան Մ. Կ., Ամիրխանովա Լ. Մ., Գևորգյան Մ. Կ., Աղաբալյան Ա. Ս., Զախարյան Ռ. Ա. Salmonella derby-ի բակտերիանների պայդաբիոցային ԴնԹ-ի ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները 229

Շանեթարյան Ս. Տ., Սարուխանյան Ս. Գ. Ղափանի և Քաջարանի հանքավայրերում միկրոօրգանիզմների մասնակցությունը մետաղների լվացազերծման պրոցեսներում 234

Կիսլյուխինա Ս. Վ., Կալունյանց Կ. Ա., Մարգարյան Բ. Ա., Կուզնեցովա Տ. Ա. Լիտիկ ֆերմենտների բիոսինթեզը Bacillus subtilis կուլտուրայում 240

Ստեփանյան Կ. Ռ., Կավրյան Մ. Ա. Candida guilliermondii BKM-V-42 խմորասնկերի ասպարագինազային բիոսինթեզը 247

Ավագյան Զ. Կ., Աֆրիկյան Է. Գ. B₁₂ վիտամինի պարունակությունը հողում 253

Գոլյուրև Վ. Ի., Մանուկյան Ա. Ռ., Շիխոչենկո Ա. Ն. Աճման պայմանների ազդեցությունը կասուլյավորման վրա խմորասնկերի մոտ 259

Աբգունյան Ե. Ն. Լուծված թթվածնի պարցիալ ճնշման ազդեցությունը Bacillus thuringiensis-ի կուլտիվացման վրա 265

Նիկողոսյան Վ. Գ. Ացետիլենային եղանակով ազոտաբակտերի նիտրոզենազային ակտիվության որոշման մասին 269

Հակոբյան Զ. Մ., Շախարյան Գ. Ա. Մեղրի, շաքարաշրի և պաստերիկացիայի ազդեցությունը կիսասինթետիկ անտիբիոտիկների ակտիվության վրա 274

Մրզնկյան Լ. Հ., Ակպովա Ս. Բ., Իրանիմովա Ա. Զ., Շամբաև Ն. Գ. Յուզդրդի կաթնաթթվային բակտերիանների բուրմունքաառաջացումը 279

Պարսեղիով Բ. Պ., Չախմախյան Ա. Գ., Հովհաննիսյան Մ. Դ. Բիոքիմիական որոշ հատկությունների տարազնություն Bacillus thuringiensis v. gallertae-ի մոտ 284

Սիմոնյան Ս. Ա., Մամիկոնյան Թ. Հ. Զորագիմացկուն ծառաթփայլի տեսակների պտուղներից ու սերմերից տուանձնացված որոշ ֆիտոպատոգեն սնկերի ուսումնասիրությունը 289

Պետրոսյան Ռ. Ա., Ստեփանյան Է. Գ. Մակրոֆագերի կլանողակառուցվածքի ֆունկցիոնալ և բջջաբանական ուսումնասիրության մասին 295

Սովորովա Ա. Ն., Մեացակունյան Ա. Գ., Վարդանյան Ա. Ա., Շեյսիկյան Մ. Տ., Հովհաննիսյան Վ. Վ. Սովորական դաշտամկների մոտ հակամարմինների առաջացումը մանտախտի հարուցիչով կրկնակի վարակման դեպքում 301

Ղարիբյան Ս. Ե., Հարությունյան Ս. Ա., Ասմանզովյան Ա. Ա. Նոր ֆունգիցիդային պրեպարատ ոռոգիչի ազդեցության ուսումնասիրությունը սպիտակ առնետների բարձրագույն նյարդային համակարգի գործունեության վրա 306

Համատու հայտնություններ

Մալխասյան Ա. Մ. Bac. subtilis-mesentericus խմբի բակտերիաներին յուրահատուկ ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական հատկանիշները 310

Ուձերաճներ

Նիկողոսյան Վ. Գ. Ազոտաբակտերի անտիբիոտիկադիմացկուն մուտանտների ազոտի ֆիքսման ունակությունը 313



Մալխասյան Ա. Մ. <i>Bac. mycoides</i> բակտերիալ կուլտուրաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական հատկանիշները	314
Օստրովսկի Ի. Ս. <i>Chironomus plumosus</i> L. (Chironomidae, Diptera) զարգացման փուլերի տևողությունը և ձևաչափական բնութագրերի փոփոխությունները աճման ընթացքում	315
Պետրոսյան Ա. Կ. Կերաբաժիններում տարբեր մակարդակով պրոտեին պարունակող կերերի ընտրողական օգտագործումը ածանցների կողմից	317

Քննադատություն և գրախոսություն

Մուրզուկա Ն. Բ. Э. Н. Мирзоян. «Развитие основных концепций эволюционной гистологии». М., Наука, 1980, 271 стр.	319
---	-----

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Газарянц М. Г., Акопян Ж. И.</i> Актуальные вопросы трансформации ферментов	221
<i>Казанчян А. Ф., Варганян М. К., Амирханова Л. М., Геворкян М. Г., Агабалян А. С., Захарян Р. А.</i> Физико-химические свойства плазмидных ДНК <i>Salmonella derby</i>	229
<i>Шахнубарян С. Т., Саруханян С. Г.</i> Участие микроорганизмов в процессах выщелачивания металлов на Кафанском и Каджаранском месторождениях	234
<i>Кислухина О. В., Калунянц К. А., Маргарян Б. А., Кузнецова Т. А.</i> Биосинтез литических ферментов в культуре <i>Bacillus subtilis</i>	240
<i>Степанян К. Р., Давтян М. А.</i> Биосинтез аспарагиназы у дрожжей <i>Candida guilliermondii</i> ВКМ У-42	247
<i>Авакян З. Г., Африкян Э. К.</i> Витамин В ₁₂ в почве	253
<i>Голубев В. И., Манукян А. Р., Шкидченко А. Н.</i> Влияние условий выращивания на капсулообразование у дрожжей	259
<i>Арзуманов Е. Н.</i> Влияние парциального давления растворенного кислорода на культивирование <i>Bacillus thuringiensis</i>	265
<i>Никогосян В. Г.</i> О некоторых особенностях определения нитрогеназной активности азотобактера ацетиленовым методом	269
<i>Акопян З. М., Шакарян Г. А.</i> Влияние меда, сахарного сиропа и пастеризации на активность полусинтетических антибиотиков	274
<i>Ерзинкян Л. А., Акопова А. Б., Ибрагимова А. З., Шамраева Н. Д.</i> Ароматообразование молочнокислых бактерий йогурта	279
<i>Жарабеков Б. П., Чахмакчян А. Г., Оганесян М. Г.</i> Различия в биохимических свойствах штаммов <i>Bac. thuringiensis var. galleriae</i>	284
<i>Симонян С. А., Мамиконян Т. О.</i> О фитопатогенности грибов, выделенных из плодов и семян древесно-кустарниковых пород	289
<i>Петросян Р. А., Степанян Э. Д.</i> О функциональном и цитологическом изучении поглотительной способности макрофагов	295
<i>Суворова А. Е., Мнацаканян А. Г., Варганян А. А., Шехикян М. Т., Оганесян В. В.</i> Антителообразование у обыкновенных полевок при повторном заражении возбудителем чумы	301
<i>Гарибян С. Е., Арутюнян С. А., Асмангулян А. А.</i> Действие нового фунгицидного препарата ровраль на высшую нервную деятельность белых крыс	306

Краткие сообщения

<i>Малхасян А. М.</i> Специфические физиолого-биохимические признаки культур группы <i>Bac. subtilis-mesentericus</i>	310
---	-----

Рефераты

<i>Никогосян В. Г.</i> Азотофиксирующая способность антибиотикоустойчивых мутантов азотобактера	313
---	-----

<i>Малхасян А. М.</i> Физиолого-биохимические признаки культур бактерий <i>Vas. thycoides</i>	314
<i>Островский И. С.</i> Продолжительность стадий развития и изменения морфометрических характеристик <i>Chironomus plumosus</i> L. (Chironomidae, Diptera) в процессе роста	315
<i>Петросян А. К.</i> Влияние различной температуры и уровня протеина в рационе на продуктивность и потребление корма несущками.	317

Критика и библиография

<i>Музрукова Е. Б.</i> Э. Н. Мирзоян. «Развитие основных концепций эволюционной гистологии». М., Наука, 1980, 271 стр.	319
--	-----

ACADEMY OF SCIENCES OF THE ARMENIAN SSR
BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

Founded in 1946

12 issues per year

Vol. XXXIV, № 3

YEREVAN

March, 1981

C O N T E N T S

E x p e r i m e n t a l

<i>Gazaryanc M. G., Acopyan Zh. I.</i> Actual problems of enzyme transformation	221
<i>Kazanchian A. F., Vartanian M. K., Amirkhanova I. M., Gevorgian M. G., Agabalian A. S., Zakhirtun R. A.</i> Physico-chemical properties of <i>Salmonella derby</i> plasmid DNA	232
<i>Shakhubarian S. T., Sarukhyan S. G.</i> Participation of microorganisms in metal leaching processes at Kaphan and Kadjaran deposits	242
<i>Kislukhina O. V., Kalunians K. A., Markarian B. A., Kuznetsova T. A.</i> Study of biosynthesis of lytic enzymes in <i>Bacillus subtilis</i> culture	258
<i>Stepanian K. R., Davtian M. A.</i> Some aspects of asparaginase biosynthesis of <i>Candida guilliermondii</i> yeast	263
<i>Avakian Z. G., Afrikian E. G.</i> Vitamin B ₁₂ in Soils	253
<i>Golubev W. I., Manukian A. R., Shkldchenko A. N.</i> Effect of growth conditions on capsule formation of yeast	262
<i>Arzumanov F. N.</i> Influence of partial pressure of dissolved oxygen on the cultivation of <i>Bacillus thuringiensis</i>	262
<i>Nikoghossian V. G.</i> On some peculiarities of determination of nitrogenase activity of azotobacter by acetylenous method	268
<i>Akopian Z. M., Shakarian G. A.</i> Effect of honey, sugar syrup and pasteurization on semi-synthetic antibiotic activity	271
<i>Erzinkian L. A., Acopyan A. B., Ibragimova A. S., Shamraeva N. D.</i> Aromaformation of yogurt lactobacillus	263
<i>Karabecov B. P., Tchakhmahchyan A. G., Oganessian M. G.</i> Variations of biochemical properties of <i>Bacillus thuringiensis var. galleriae</i> strains	280
<i>Simonian S. A., Mamiconian T. H.</i> On phytopathogenicity of some fungi isolated from fruits and seed of xerophilous trees and shrubs	280
<i>Petrosian R. A., Stepanian E. D.</i> On the functional and cellular study of macrophage absorption	286
<i>Suvorova A. E., Mnatsakanian A. G., Vartanian A. A., Shekhtikyan M. T., Hovhannissian V. V.</i> The formation of antibody in ordinary field-voles under repeated infection by plague stimulus	293
<i>Garibian S. E., Haroutjunian S. A., Asmangulian A. A.</i> The effect of a new fungicide Rovral on higher nervous activity of albino rats	290

Short Communications

<i>Malkhasian A. M.</i> Specific physiological and biochemical properties of cultures <i>Bac. subtilis-mesentericus</i>	300
---	-----

A b s t r a c t

- Nikoghossian V. G.* Nitrogen fixation ability of antibiotic resistant mutants of azotobacter 30
- Malchhasian A. M.* Physiological and bio-chemical properties of *Bac. mycoides* cultures 30
- Ostrovsky I. S.* Duration of development stages and changes in morphometrical characteristics under the growth of *Chironomus plumosus L.* 30
- Petrosian A. K.* Effect of various temperature and protein level in ration on productivity and consumption of fodder by hens 30

Critique and Bibliography

- Muzrukova E. B.* E. N. Mirzoyan "Development of basic conceptions of evolutionary histology". M., Science, 1980, 271 p. 31

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ФЕРМЕНТОВ

М. Г. ГАЗАРЯНЦ, Ж. И. АКОПЯН

Представлены данные о трансформации ферментов. Показаны различные механизмы этого феномена на примере некоторых ферментов.

Ключевые слова: ферменты, трансформация.

В настоящее время термин «трансформация ферментов» не вызывает у энзимологов возражений, если им пользоваться в тех случаях, когда дается характеристика свойств того или иного фермента, подвергнутого воздействию (вне зависимости от его природы) модифицирующего фактора, вызывающего качественные обратимые изменения его каталитических свойств. Накопившийся за последние годы экспериментальный материал позволяет четко характеризовать трансформацию ферментов, что создает возможность обобщенного рассмотрения этих свойств у более широкого круга ферментов. По-видимому, многие исследователи, исходя из классических концепций о ферментах (трудно было представить, как может, например, оксидоредуктаза приобрести свойства трансферазы, эстеразы или фосфатазы), и не допускали возможности о подобном изменении их свойств. Однако еще в 1967 г. на седьмом Международном конгрессе в Токио Сингер с сотрудниками представили доклад под названием «Трансформация НАД·Н—дегидрогеназы в НАД·Н—коэнзим-редуктазу», где было показано, что высокоочищенные препараты НАД·Н—дегидрогеназы при контролируемом нагревании в кислой среде приобретают новое свойство—способность восстанавливать коэнзим Q.

Ксантинооксидаза (ксантин: O₂—оксидоредуктаза, КФ 1.2.3.2.) катализирует окисление ксантина до мочево́й кислоты, гипоксантина до ксантина, некоторые пурины, птерины, ряд альдегидов кислородом, феррицианидом и метиленовым синим до соответствующих карбонильных кислот. Фермент получен в высокоочищенном виде из печени цыпленка, молока. *Micrococcus lactilicus* [30], показано наличие на 1 моль фермента 2 г-атомов молибдена, 2 молей ФАД и 8 г-атомов железа [11, 29]. Фермент может находиться в активной и неактивной формах, которые могут подвергаться взаимопревращениям при помощи различных химических агентов [25]. Возможность трансформации этого фермента была продемонстрирована на примере препаратов, полу-

ченных из печени крыс в опытах при исследовании ферментативного окисления ксантина.

В этой реакции усматриваются две ферментативные активности: дегидрогеназная, при которой акцептором электронов служит НАД, и оксидазная, при которой акцептором электронов служит молекулярный кислород [29]. Только что полученный препарат фермента со значительной скоростью катализирует дегидрогеназную реакцию и очень медленно—оксидазную. Однако хранение экстрактов печени крыс в оптимальных условиях в течение 5—6 ч приводит к постепенному снижению акцептирования электронов никотинамиддинуклеотида и заметному возрастанию оксидазной активности [33]. Оказалось, что этот переход можно стабилизировать органическими растворителями, ультразвуковыми волнами и т. д. Любопытно, что сильным катализатором этой реакции служат и кусочки свежей печени крыс, что позволяет допустить участие и других ферментативных наборов в трансформации ксантиноксидазы. Стоило, однако, внести в инкубационную среду избыточную концентрацию мягкого восстановителя, как вновь наблюдалась картина, свойственная свежеприготовленным препаратам фермента, т. е. имела место обратная трансформация [15]. В настоящее время мы не располагаем прямыми экспериментальными данными, позволяющими однозначно трактовать молекулярные механизмы этого любопытного явления на примере ксантиноксидазы, ясно одно, что в эти молекулярные взаимопревращения активностей фермента вовлечены тиоловые группы, окисление и восстановление которых, по-видимому, и обуславливает дегидрогеназный или оксидазный статус фермента [15,33]. Способность катализировать реакции иного типа приобретает флавиносодержащий фермент ксантиноксидаза при отделении в определенных, щадящих условиях кофермента от апофермента. При этом он изменяет частично кинетическую характеристику ввиду частичной денатурации, однако эти изменения практически не затрагивают каталитически активную площадку, не изменяют молекулярный вес и, что очень важно, не нарушают пути передачи электронов от окисленного ксантина к акцепторам электронов [19]. Интересно, что аналогичная картина наблюдается и в случае выключения флавинового компонента от ксантиндегидрогенезы [10]. Можно также выключить флавиновый компонент из каталитического акта с помощью алкилирующих и бензилирующих реагентов [20]. Сопоставление некоторых физико-химических параметров, в частности, спектров поглощения фермента, обработанного алкилирующим реагентом, и ксантиноксидазы, у которой флавинадениндинуклеотид отделен от апофермента, показало практическое их совпадение. Эти данные, полученные при исследовании ксантиноксидазы, указывают на то важное обстоятельство, что при изучении феномена трансформации ферментов выявляются однозначные или близкие изменения каталитических свойств фермента. Важно также, что при правильном отборе субстратов можно обнаружить определенную, изменившуюся каталитическую активность апофермента.

На примере других ферментных препаратов мы продемонстрируем трансформацию каталитической активности иного типа, что еще раз подчеркивает важность адекватного набора субстратов при исследовании обратимого качественного изменения субстратной специфичности.

Липоамиддегидрогеназа (восстановленный НАД: липоамид-оксидоредуктаза, КФ 1. 6. 4. 3) катализирует окисление восстановленного липоамида (физиологическая активность), а также окисление НАД·Н за счет дихлорфенолиндофенола (диафоразная активность). Препарат фермента выделен из различных биологических объектов, однако хорошо изучен фермент, полученный из сердца свиньи [32]. Показано, в частности, что последний является димером, содержит две идентичные субъединицы, каждая из которых несет по 1 моль ФАД. Реактивом Элмана /5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота/ в каждой субъединице титруется по четыре тиоловых группы. Обработка фермента 6,5 М мочевиной выявляет еще две восстановленные дисульфидные группы [32]. Обработка ферментных препаратов 2 молями дитионита полностью восстанавливает фермент, при этом происходит присоединение четырех электронов, тогда как сам флаavin может акцептировать только два электрона. Месси и сотр. открыли интересную закономерность в ферментативной активности липоамиддегидрогеназы, обработанной меркаптитидирующими реагентами парахлормеркурибензоатом или фенилмеркуриацетатом. Физиологическая активность фермента при этом снижается примерно в два раза, в то время как диафоразная активность возрастает в четыре и более раз. При выдерживании фермента на химическом столе в течение 30—60 мин происходит снижение диафоразной активности, однако обработка выдержанного фермента алкилирующим реагентом способствует почти полному восстановлению диафоразной активности [13]. Добавление в систему ионов меди в каталитических количествах и последующая инкубация в аэробных условиях приводят к значительному снижению липоамиддегидрогеназной (физиологической) активности, тогда как диафоразная активность значительно возрастает. Было высказано предположение о возможном раздельном существовании липоамиддегидрогеназы и диафоразы. Однако последующие опыты, проведенные с высокоочищенными препаратами липоамиддегидрогеназы, показали, что в данном случае речь идет о превращении липоамиддегидрогеназы в фермент с измененной субстратной специфичностью [12]. Было показано также, что после обработки фермента каталитическими количествами ионов меди содержание тиоловых групп в препаратах фермента заметно снижается. После длительного диализа и добавления ЭДТА ферментные препараты не содержат меди. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что снижение содержания тиоловых групп в ферментных препаратах, обработанных медью, обусловлено их окислением, а не образованием меркаптидов. Добавление к окисленному медью препарату липоамиддегидрогеназы восстановителей—сульфита или цистеина—приводит к возвращению содержания тиоловых групп к исходному уровню, снижению диафоразной активности и восста-

новлению физиологической липоамиддегидрогеназной активности до уровня, свойственного нативному ферменту [27].

Способность этого фермента изменять субстратную специфичность под воздействием различных физических и химических факторов была исследована и другими авторами [36]. Показано, что изменения субстратной специфичности, очень сходные с теми, которые вызываются путем обработки медью, можно получить замораживанием и оттаиванием раствора ферментных препаратов, отделением флавинового компонента от апофермента с последующей диссоциацией апофермента на мономеры и обработкой мономера ФАД при температуре 5°, обработкой комплексобразующими реагентами. Диссоциированная на мономеры молекула фермента, как известно, обладает только диафоразной активностью [35] и отличается от димерной формы лишь небольшим изменением в структуре вблизи ФАД [27]. Это позволяет сделать вывод о том, что структура ферментного препарата, имеющего лишь диафоразную активность (мономерная форма), отличается от структуры фермента, обладающего обеими активностями (димерная форма) только в ограниченной области вокруг ФАД.

Процесс восстановления димерной формы, т. е. ассоциация голофермента, включает в себя различные конформационные формы перехода. Любопытно, что при реконструкции голофермента, т. е. сразу после присоединения кофермента, диафоразная активность резко возрастает, затем происходит медленное снижение ее при одновременном повышении липоамиддегидрогеназной активности до уровня, свойственного нативному ферментному препарату [27].

Кроме того, показано, что различные формы липоамиддегидрогеназы при одинаковой физиологической активности обладают различными диафоразными активностями в отношении классических модуляторов [31], однако трактовка этих экспериментальных данных затруднена ввиду их неоднозначности [9].

На примере трансформации липоамиддегидрогеназы мы пытались показать, как могут влиять молекулярные изменения конформации ферментного белка на ее субстратную специфичность

Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (Д—глицеральдегид-3-фосфат: НАД—оксидоредуктаза (фосфорилирующая), КФ 1.2.1.12) легко может быть получена в высокоочищенном виде из мышц животных различных видов, из дрожжей.

Основная реакция, катализируемая дегидрогеназой, начинается с нуклеофильной атаки атома серы тиоловой группы остатка цистеина-149, расположенного в каталитически активном центре фермента, на электрофильный атом карбонильной группы субстрата [6, 17, 24]. Эта атака завершается образованием тиополуацетала, в котором субстрат ковалентно связан с ферментом, затем основная группа фермента (возможно, ею является имидазольное кольцо остатка гистидина) способствует переносу гидрид-иона, который связан с атомом углерода карбо-

нильной группы, к углероду, находящемуся в положении 4 никотинамидного кольца НАД [7]. Молекулы дегидрогеназы, выделенной из скелетных мышц млекопитающих, состоят из четырех субъединиц с молекулярным весом по 35000 каждая [18]. В каждой субъединице содержится по одной тиоловой группе, входящей в активный центр и участвующей в образовании ацилфермента. Молекулы фермента содержат прочно связанный с белком НАД, который бесспорно участвует в катализируемой этим ферментом реакции [7, 39]. Реакция, катализируемая дегидрогеназой, представляет собой окисление 3-фосфоглицеринового альдегида в присутствии НАД⁺ и фосфата с образованием 1,3-дифосфоглицериновой кислоты [16, 22, 23].

В лаборатории Коловика было показано, что высокоочищенный препарат дегидрогеназы после обработки специфическим мягким окислителем тиоловых групп о-йодозобензоатом приобретает в определенных условиях (концентрация окислителя, рН среды, молярность и природа буфера) отсутствующую в норме фосфатазную активность, максимальная скорость которой составляет величину, примерно равную максимальной скорости реакции, катализуемой нативным ферментом [17]. Содержание тиоловых групп при этом значительно снижается. Авторы предполагают, что тиоловые группы под воздействием о-йодозобензоата окисляются до стабилизированных остатков цистеинсульфеновой кислоты. Фосфатазная активность не тормозится тиоловыми реагентами. Таким образом, фермент, катализирующий окислительную реакцию, после обработки окислителем приобретает способность к гидролитическому расщеплению ацетилфосфата [17].

Трансформация дегидрогеназы, достигаемая окислением тиоловых групп в активном центре фермента и выявляемая по ацилфосфатазной активности, обратима. Добавление к окисленному ферменту таких восстановителей, как 2-меркаптоэтанол, дитиотрейтол, аскорбиновая кислота, полностью устраняло ацилфосфатазную активность и способствовало возвращению к исходным величинам дегидрогеназной активности [39]. Были разработаны методы прямого доказательства наличия остатков сульфеновой кислоты в активном центре дегидрогеназы, обработанной окислителем в условиях, способствующих трансформации фермента, с появлением ацилфосфатазной активности. Они основаны на способности производных сульфеновых кислот реагировать с содержащими активные метиленовые группы соединениями (димедоном) с образованием тиоэфиров либо вступать в реакции присоединения по двойной связи олефинов [8, 21]. Обработка димедоном или олефином препаратов дегидрогеназы, подвергнутых действию окислителя и обладающих не обычной дегидрогеназной активностью, а лишь ацилфосфатазной, приводила к ее подавлению, причем в этих условиях дегидрогеназная активность не восстанавливалась. Установлено также, что после обработки активированным углем, удаляющим НАД из молекулы фермента, препараты фермента утрачивают дегидрогеназную активность, приобретая при этом свойственную обычно химотрипсину

способность гидролизировать паранитрофенилацетат [14]. Фосфатазная активность, появляющаяся после обработки дегидрогеназы *o*-йодозобензоатом, эстеразная активность, наблюдаемая при обработке фермента активированным углем, не идентичны активности ни одного из известных нам встречающихся в природе ферментов [14, 17].

Таким образом, нами рассмотрены примеры трансформации, когда конформационные изменения, влияющие на связи кофермента с апоферментом, приводят к существенному изменению субстратной специфичности (на примере лилоамиддегидрогеназы) или когда окислители химического происхождения приводили к качественно обратимому изменению каталитических свойств фермента (на примере триозофосфатдегидрогеназы).

Иной механизм изменения специфичности характерен для *лизинмонооксигеназы* (КФ 1.13.12.2), также относящейся к классу оксидоредуктаз. Фермент был выделен в высокоочищенном виде из бактериальной клетки, кристаллизован, изучены его каталитические, физико-химические и другие свойства. Показано, в частности, что субстратами его могут служить некоторые аминокислоты (в том числе лизин). Фермент катализирует две реакции: окислительное декарбоксилирование—оксидазная реакция фермента—и окислительное дезаминирование—оксигеназная реакция [37]. Он содержит два моля ФАД и 13 молей тиоловых групп на моль фермента, молекулярный вес порядка 190000 [34]. Блокирование восьми из тринадцати тиоловых групп приводит к трансформации оксигеназной активности в окислительную с изменением механизма реакции [3]. При оксигенировании один атом кислорода входит в молекулу субстрата, а другой восстанавливается полувосстановленным флавином до H_2O . При этом фермент приобретает новое свойство—способность катализировать окислительное дезаминирование лизина с образованием α -кетокислоты, аммиака и перекиси водорода [4]. Трансформация лизинмонооксигеназы с помощью меркаптидообразующих реагентов легко обратима: добавление к такому ферменту, например, дитиотрейтола восстанавливало каталитические свойства его, при этом способность катализировать окислительное дезаминирование лизина утрачивалась.

Диаминоксидаза [диамин: O_2 -оксидоредуктаза (дезаминирующая), КФ 1. 4. 3. 6] катализирует дезаминирование диаминов. Исследование воздействия восстановителей на ферментативные свойства высокоочищенных препаратов диаминоксидазы почек свиньи показало, что подобная обработка приводит к снижению скорости дезаминирования путресцина (типичный субстрат диаминоксидазы), одновременно фермент приобретает способность дезаминировать не только субстраты моноаминоксидазы (тирамин, триптамин), но и адениловую кислоту [1, 5]. Исследование природы и некоторых свойств аденилатдезаминазной активности, которая появлялась в наших опытах после обработки восстановителями высокоочищенных препаратов диаминоксидазы, позволило допустить, что, по всей вероятности, эта реакция осуществляется путем гидролитического расщепления субстрата [1, 2].

Стехиометрия реакции дезаминирования адениловой кислоты при ее инкубации с препаратом диаминооксидазы, обработанным сероводородом

Исследуемый показатель	нмоль/пробу
Освобождение аммиака	120 [5]
Освобождение инозиновой кислоты	101 [3]
Образование перекиси водорода	0 [5]

Пробы объемом 1,7 мл [0,2 М фосфатный буфер, рН 8,0] содержали 0,21 мг белка, очищенного в 1800 раз [удельная активность до обработки сероводородом—410 нмоль аммиака/мг белка/мин], по сравнению с исходным гомогенатом. Конечная концентрация адениловой кислоты в пробах—0,1 мМ. Длительность инкубации 60 мин. В скобках—количество опытов.

Из приведенных выше примеров трансформации ферментов явствует, что при изучении феномена трансформации необходимы высокоочищенные ферментные препараты, методы и приборы, используемые при повседневных энзимологических исследованиях. Однако расшифровка молекулярных механизмов этого фермента требует привлечения всего арсенала современных физико-химических и других методов молекулярной энзимологии.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 10.VII 1980 г.

ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ՏՐԱՆՏՈՐՄԱՑԻԱՅԻ ԱԿՏՈՒԱԿ ԶԱՐՅԵՐԸ

Մ. Գ. ԳԱԶԱՐՅԱՆՑ, Ժ. Ի. ԶԱՍՈՐՅԱՆ

Տվյալ աշխատանքում մեջբերված տվյալները վերաբերում են ֆերմենտների տրանսֆորմացիայի հարցին:

Քսանտինօքսիդազի, լիպոամինօզինհիդրոզենազի և որոշ այլ ֆերմենտների օրինակների վրա ցույց են տրված այդ հրևույթի տարբեր մեխանիզմները:

ACTUAL PROBLEMS OF ENZYME TRANSFORMATION

M. G. GAZARYANTS, Zh. I. ACOPYAN

Data on enzyme transformation are presented. Different mechanism of this phenomenon on the examples of some enzymes have been shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акопян Ж. И., Горкин В. З. Успехи совр. биол., 76, 54, 1973.
2. Акопян Ж. И. Биолог. ж. Армении, 10, 49, 1977.

3. Горкин В. З. Мал. биология, 10, 717, 1976.
4. Москвитина Т. А. Успехи совр. биологии, 81, 68, 1976.
5. Akopyan Zh. I., Stesina L. N., Gorkin V. Z. FEBS Letters, 16, 349, 1971.
6. Allison W. S. and Connors M. J. Arch. Biochem. Biophys., 135, 333, 1970.
7. Allison W. W., Benitez L. V., Johnson C. L. Biochem. Biophys. Res. Commun 52, 1403, 1973.
8. Benitez L. V., Allison W. S. J. Biol. Chem., 249, 6234, 1974.
9. Brady A. H., Beychok S. J. Biol. Chem., 244, 4634, 1969.
10. Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler P. Flavins and flavoproteins. Baltimore, Univ. Park Press, 1971.
11. Bordaas J., Bray P., Garner C., Hasnain S. S. J. Inorg. Biochem., 11, 181, 1979.
12. Casola L., Brumby P. E., Massey V. J. Biol. Chem., 241, 4977, 1966.
13. Casola L., Massey V. J. Biol. Chem., 241, 4985, 1966.
14. Colowick S. P., Eys J., Park J. H. In: Comprehensive Biochemistry M. Florkin E. Stotz, eds, 14, 1, 1969.
15. Della Corte E., Stirpe F. Biochem. J., 126, 739, 1972.
16. Eby D., Kirtley M. Arch. Biochem. Biophys., 198, 1979.
17. Ehring R., Colowick S. P. J. Biol. Chem., 244, 4589, 1969.
18. Kanchuger M. S., Leon P—M., Byers L. Biochemistry, 18, 4373, 1979.
19. Kanda M., Brady F. O., Rajagopalan K. V., Handler P. J. Biol. Chem., 247, 765-1972.
20. Komai H., Massey V. Flavins and flavoproteins. Baltimore, Univ. Park Press, 1971.
21. Kühle E. The Chemistry of the Sulfenic Acids, 116, 1973, Georg. Thieme Publ., Stuttgart, BRD.
22. Lien L. V., Keleti T. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 14, 1, 1979.
23. Lien L. V., Keleti T. Acta biochim. et biophys. Acad. sci. hung., 14, 12, 1979.
24. Little C., O'Brien P. J. Europ. J. Biochem., 10, 533, 1969.
25. Massey V., Edmondson D. J. Biol. Chem., 245, 6595, 1970.
26. Mertz J. E., Davis R. W. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69, 3370, 1972.
27. Mulswinkel-Voetberg H., Veeger C. Europ. J. Biochem., 33, 271, 1973.
28. Palmer G., Bray R. C., Beinert H. J. Biol. Chem., 239, 2657, 1964.
29. Putterman G. J., Shaikh B., Hallmark M., Sawyer C., Hixson C., Perini F. Anal. Biochem., 98, 1, 1980.
30. Rajagopalan K. V., Handler P. Biological oxidations. N. Y. Intersci. Publ. Co., 1968.
31. Sacurai V., Fukuyoshi V., Hamado M., Hajakava T., Kolke M. J. Biol. Chem., 245, 4453, 1970.
32. Schmidt U., Grafen R., Allland K., Goedde H. W. Advances, Enzymol., 32, 423, 1969.
33. Stirpe F., Della Corte E. J. Biol. Chem., 244, 3855, 1969.
34. Takeda H., Yamamoto S., Kojima Y., Hayaishi O. J. Biol. Chem., 244, 2935, 1969.
35. Visser J., Veeger C. Biochim. Biophys. Acta, 159, 265, 1968.
36. Visser J., Veeger C. Biochim. Biophys. Acta, 206, 244, 1970.
37. Williams C. H., Arscott L. D. Z. Naturforsch. b., 27, 1078, 1972.
38. Yamamoto S., Hirata F., Yamauchi T., Nozaki M., Hayaishi O., Hiromi K. Z. Naturforsch, 27 b, 1056, 1972.
39. You K-S., Benitez L. V., McCouachic W. A., Allison W. S. Biochim. Biophys. Acta, 384, 317, 1975.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМИДНЫХ ДНК
 SALMONELLA DERBY

А. Ф. КАЗАНЧЯН, М. К. ВАРТАНЯН, Л. М. АМИРХАНОВА,
 М. Г. ГЕВОРКЯН, А. С. АГАБАЛЯН, Р. А. ЗАХАРЯН

Исследован ряд физико-химических характеристик некоторых структурно-функциональных форм внехромосомных плазмидных ДНК бактериального штамма K89 *Salmonella derby*. Показано, что исследуемый штамм содержит по крайней мере три типа плазмидных ДНК с молекулярными весами 40, 12, 8 мД. В ряде случаев имеет место сегрегация крупной плазмиды (40 мД) на плазмиды с относительно малыми молекулярными весами. Выяснено также, что резистентность культуры K89 *Salmonella derby* к пенициллину и хлорамфениколу обусловлена присутствием в бактериальной популяции плазмид, в то же время устойчивость к стрептомицину имеет, по-видимому, хромосомную природу.

Предполагается, что в сухом мясном концентрате присутствует фактор неизвестной пока природы, способный вызывать элиминацию плазмид.

Ключевые слова: ДНК, плазмиды, антибиотики, салмонелла.

За последние годы в изучении молекулярной природы резистентности бактерий к различным лекарствам достигнуты значительные успехи. Установлено, что у большинства бактерий ответственность за лекарственную устойчивость несут экстрахромосомные элементы, плазмиды, локализованные в основном в цитоплазме бактерий и способные реплицироваться самостоятельно [3].

Природа антибиотико-резистентности у бактерий рода *Salmonella* наиболее полно изучена у штаммов *S. typhi*, *S. typhimurium* [11], в то же время эти свойства практически не изучены у часто встречающегося в природе штамма *Salmonella derby* [6, 9].

Исследование структурно-функциональных форм плазмидных ДНК штамма K89 *S. derby* представляет определенный интерес в смысле структурно-генетической характеристики плазмид бактерий рода *Salmonella*.

В этой связи нам представлялось интересным изучить некоторые физико-химические параметры структурно-функциональных форм плазмидных ДНК *S. derby*.

Материал и методика. В качестве биологической модели использовали бактерии K89 *S. derby*, первоначально выделенные из клинических изолятов больных детей. Свежая ночная культура K89 *S. derby* в рыбном бульоне (концентрированный рыбный гидролизат (50 г) на литр дистиллированной воды, рН 7,2—7,4, разводилась в отно-

шении 1:20 и выращивалась при 37° до плотности $2-5 \times 10^8$ клеток/мл. Культуры в изотоническом растворе хлористого натрия тестировались на устойчивость к антибиотикам разведениями.

В качестве твердой питательной среды использовали среду следующего состава: гидролизат кильки—17,9, агар—11,2, NaCl—5,9, на литр дистиллированной воды. Определение устойчивости к антибиотикам проводили методом посева бульонной культуры на чашки с увеличивающимися концентрациями антибиотиков, от 1 до 30 мкг/мл, в варианте со стрептомицином—от 1 до 700 мкг/мл. Необходимым условием при этом является определенное количество колоний (200—500) на контрольных чашках. Учет результатов проводили после инкубации при 37° в течение 18—20 ч. За минимальную ингибирующую концентрацию принимали ту концентрацию антибиотика, которая подавляла рост бактерий на 50%.

Плазмидные ДНК K89 S. derby выделяли по способу, описанному для плазмид с преимущественной цитоплазматической локализацией [4]. После получения осветленных лизатов последние депротенизировали смесью фенолхлороформ (1:1). ДНК из водной фазы осаждали свежеперегнанным этанолом и хранили при -20°.

Количественный и качественный анализ полученных препаратов плазмидных ДНК проводили спектрофотометрически. Проводили также электрофоретическую идентификацию плазмидных ДНК в 0,6%-ном геле агарозы [1], элюцию окрашенных полосок ДНК с гелей [2], электронномикроскопическую визуализацию препаратов плазмидных ДНК на электронном микроскопе BS 613 [5].

Результаты и обсуждение. Культура K89 S. derby была тестирована на чувствительность к ряду антибиотиков: гентамицину, стрептомицину, пенициллину, хлорамфениколу и тетрациклину. Как видно из рис. 1А, тестируемый штамм бактерии чувствителен к крайне низким концентрациям гентамицина и тетрациклина (1 мкг/мл) и имеет высокий уровень резистентности к стрептомицину (0,5—0,7 мг/мл). Минимальная ингибирующая концентрация для пенициллина соответствует 14

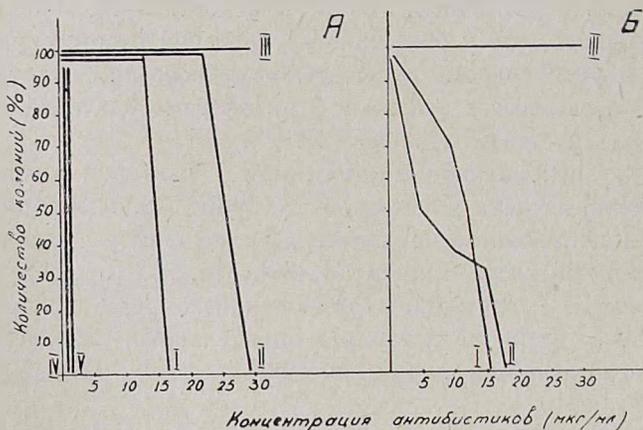


Рис. 1. Чувствительность штамма K89 S. derby к антибиотикам: А—штамм, выращенный в рыбном бульоне; Б.—штамм, выращенный в бульоне из сухого мясного концентрата; I—пенициллин, II—хлорамфеникол, III—стрептомицин, IV—гентамицин, V—тетрациклин.

мкг/мл, для хлорамфеникола—23 мкг/мл. Кривые выживания бактерий, выращенных в условиях увеличивающихся концентраций пенициллина

и хлорамфеникола, свидетельствуют о некоторой гетерогенности этой популяции бактерий по чувствительности к указанным антибиотикам.

Анализ выделенных плазмидных ДНК путем электрофореза в 0,6% - ном агарозном геле позволил установить, что исследуемый штамм содержит 3 типа плазмидных ДНК (рис. 2Б), обозначенных нами как рZV1, рZV2, рZV3, по общепринятой номенклатуре [8].

Первая плазида, рZV1, соответствует молекуле ДНК с ориентировочным молекулярным весом в пределах 40 мД, вторая окрашенная полоса соответствует хромосомной ДНК, в нижней же части геля обнаружены менее интенсивные по окраске еще две полосы ДНК с молекулярными весами 12 и 8 мД (ориентировочные молекулярные веса плазмидных ДНК определяли по электрофоретической подвижности маркерных ДНК фага λ -30 мД и вируса SV40—3 мД).

Необходимо отметить, что при выращивании бактерий K89 *S. derby* в бульоне, приготовленном из сухого мясного концентрата, культура K89 *S. derby* практически становилась чувствительной ко всем использованным антибиотикам, за исключением стрептомицина (рис. 1Б). По немногочисленным литературным данным известно, что при выращивании бактерий в бульоне, приготовленном из сухого мясного концентрата, наблюдаются делеции, мутации, реверсии [10]. В наших экспериментах,

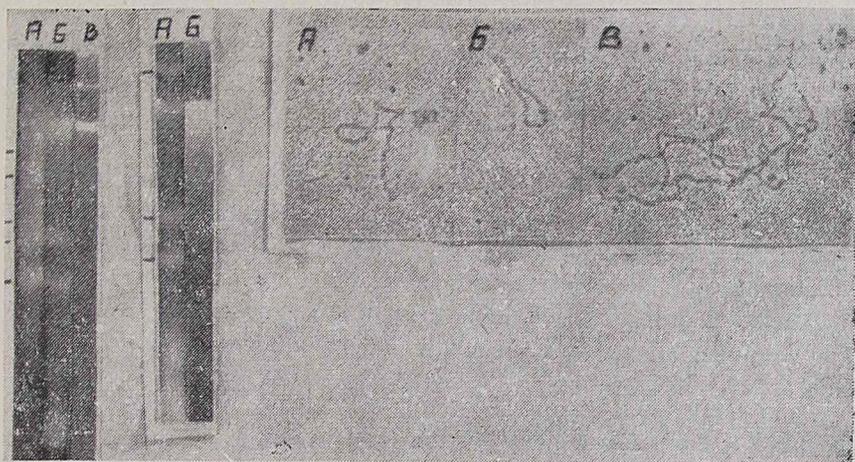


Рис. 2. Рис. 3.

Рис. 4.

Рис. 2. Электрофорез плазмидных ДНК *S. derby* в 0,6%-ном агарозном геле: А.—электрофоретическая подвижность плазмид-сегрегантов; Б —электрофоретическая подвижность плазмидных ДНК; В —электрофоретическая подвижность коинтеграта.

Рис. 3. Электрофорез плазмидных ДНК *S. derby*, выращенной на различных питательных средах: А—электрофорез плазмидных ДНК *S. derby*, выращенной на рыбном бульоне; Б— электрофорез плазмидных ДНК *S. derby*, выращенной в бульоне из сухого мясного концентрата.

Рис. 4. Электронные микрофотографии плазмидных ДНК *S. derby*. Увеличение: $\times 45000$.

по-видимому, имеет место элиминация плазмид под воздействием фактора «X», присутствующего в сухом мясном концентрате в концентрированном состоянии. Эти данные были подтверждены при электрофорезе ДНК, выделенных из бактерий, выращенных в бульоне из сухого мясного концентрата. На рис. 3Б отчетливо видна только одна окрашенная полоса ДНК, соответствующая хромосомной. Однако во всех экспериментах у бактерий, выращенных на концентрированном мясном бульоне, резистентность к стрептомицину сохранялась в той же высокой степени. Неэлиминируемая резистентность к стрептомицину описана также у других бактерий рода *Salmonella* [7], что позволяет предположить хромосомную природу резистентности к этому антибиотику у штамма K89 *S. derby*.

В ряде экспериментов, при сохранении описанного спектра антибиотико-резистентности, отмечались формирование преимущественно коинтеграта или преимущественная сегрегация крупной плазмиды pZVI на плазмиды с относительно малыми молекулярными весами, с проявлением трех четких интенсивных полосок ДНК с молекулярными весами 20, 12 и 8 мД (рис. 2, А и Б).

Электронномикроскопическая визуализация препаратов позволила идентифицировать описанные формы ДНК коинтеграта и составляющих его репликонов в виде циркулярных, ковалентно-замкнутых молекул ДНК (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствует о том, что плазида pZVI состоит по крайней мере из трех независимых репликонов и что в популяции бактерии существует определенное соотношение между коинтегратом и составляющими его репликонами, способными к самостоятельной репликации, которое при определенных условиях может меняться как в сторону формирования преимущественно коинтегративной формы pZVI, так и в сторону составляющих ее независимых репликонов. Это говорит об обратимости описанного явления, отборе наиболее рациональной структуры плазмидных генов, в основе которого лежат молекулярные механизмы, в целом обеспечивающие процесс эволюции плазмид.

Институт экспериментальной биологии
АН Армянской ССР

Поступило 5.I 1981 г.

SALMONELLA DERBY-ի ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՊԼԱԶՄԻԴԱՅԻՆ ԴԵՐ-ի ՖԻԶԻԿԱ-ՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ

Ա. Ֆ. ԿԱԶԱՆՉՅԱՆ, Մ. Կ. ՎԱՐԳԱՆՅԱՆ, Լ. Մ. ԱՄԻՐԵԱՆՈՎԱ,
Մ. Գ. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Ա. Ս. ԱՂԱԲԱՎՅԱՆ, Ռ. Ա. ԶԱՔԱՐՅԱՆ

Հայտնաբերվել են *S. derby* K 89 շտամի պլազմիդային ԴԵՐ-ների արտաբրոմոսոմային օղակաձև մոլեկուլներ էլեկտրոնային միկրոսկոպիայի և էլեկտրոֆորեզի մեթոդներով:

Ուսումնասիրվող շտամը պարունակում է առնվազն 3 տեսակի պլազմիդային ԴՆԹ-ներ, որոնց մոլեկուլյար կշիռներն են 40, 12 և 8 մդ: Հայտնաբերված է, որ որոշ դեպքերում տեղի է ունենում խոշոր պլազմիդայի (40 մդ) սեղրեգացիա համեմատաբար փոքր մոլեկուլյար կշիռ ունեցող պլազմիդների:

Որոշ անտիբիոտիկների նկատմամբ *S. derby* K 89 կուլտուրայի զգայունականությունը ուսումնասիրելու ժամանակ հայտնաբերվել է, որ պենիցիլինի և քլորամֆենիկոլի կայունությունը պայմանավորված է բակտերիալ պոպուլյացիայում պլազմիդների ներկայությամբ, միևնույն ժամանակ ստրեպտոմիցինի նկատմամբ կայունությունը հավանաբար ունի քրոմոսոմային բնույթ:

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF *SALMONELLA* *DERBY* PLASMID DNA

A. F. KAZANCHIAN, M. K. VARTANIAN, I. M. AMIRKHANOVA,
M. G. GEVORKIAN, A. S. AGABALIAN, R. A. ZAKHARIAN

Physico-chemical properties of some structural-functionous forms of extrachromosomal plasmid DNA of K89 *S. derby* bacterial strain have been studied. It has been shown that studied strain contains at least 3 types of plasmid DNA with molecular weights 40, 12, 8 md. In some cases a segregation of large plasmid on plasmids with comparatively small molecular weights takes place. It has been also revealed that the resistance of *S. derby* culture to penicillin and chloramphenicol is conditioned by the presence of plasmids in bacterial population, at the same time the resistance to streptomycin has apparently chromosomal nature.

It has been supposed that in dry meat concentrate a factor of unknown nature is present, which is capable of causing plasmid elimination.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Агабальян А. С., Захарян Р. А., Акопян С. М., Бакунц К. А., Израелян Ю. А., Азарян Н. Г. Микробиология, 1, 97, 1978.
2. Захарян Р. А., Израелян Ю. А., Агабальян А. С., Татевосян П. Е., Акопян С. М., Африкян Э. К. Микробиология, 2, 226, 1979.
3. Мейнелл Г. Г. В кн. Бактериальные плазмиды, 23, М., 1976.
4. Clewell D., Helinski D. Proc. Nat. Acad. Sci USA, 62, 1159, 1969.
5. Davis R., Simon M., Davidson N. In Methods of Enzymology, 21, Part D, 413, 1971.
6. Fox Y., Beacage C. J. Infect. Diseases, 133, 362, 1979.
7. Hahn F., Ciak J. Antimicrob. agents chemoter, 9, 77, 1976.
8. Novick R., Clowes R., Cohen S., Curtiss III R., Datta N., Falkow S. Bacteriol. Rew, 40, 168, 1976.
9. Rudnai O., Szentgline C., Lanybela A., Mileh H. Egeszsegtudomány, 23, 105, 1979.
0. Vithaythil A., Commonen B., Naiz S., Madyastha P. J. Toxicol. and Environ. Health, 4, 189, 1978.
1. Willshaw G., Smith H., Anderson E. Mol. and Gen. Genet, 159, 111, 1978.

УЧАСТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРОЦЕССАХ
ВЫЩЕЛАЧИВАНИЯ МЕТАЛЛОВ НА КАФАНСКОМ
И КАДЖАРАНСКОМ МЕСТОРОЖДЕНИЯХ

С. Т. ШАХНУБАРЯН. С. Г. САРУХАНИЯН

Установлено, что на Кафанском медно-колчеданном месторождении железooksисляющие тионовые бактерии группы *Thiobacillus ferrooxidans* активно выщелачивают медь и железо. На Каджаранском медно-молибденовом месторождении выявлено медленное, но постоянное биогенно-химическое выщелачивание молибдена. Повсеместное и преобладающее присутствие здесь серуокисляющих бактерий группы *Thiobacillus thio-parus* дает основание предполагать участие этих бактерий в выщелачивании молибдена.

Ключевые слова: выщелачивание молибдена, меди, тионовые бактерии.

Тионовая бактерия *Th. ferrooxidans* окисляет практически все известные сульфидные минералы, способствуя выщелачиванию металлов в природе [5, 7, 10, 11]. Однако микрофлора различных рудных месторождений, в том числе и многие другие тионовые бактерии, изучена слабо.

С целью выделения культур, активно выщелачивающих медь и молибден, нами в 1977—1978 гг. обследовались Кафанское и Каджаранское рудные месторождения Армении. По некоторым рудным месторождениям Армянской ССР ранее уже были проведены микробиологические исследования [2, 3, 8]. Каджаранское медно-молибденовое месторождение в микробиологическом аспекте изучается впервые.

Материал и методика. Кафанское и Каджаранское рудные месторождения расположены недалеко друг от друга в юго-восточной части Армянской ССР, в гористой местности и имеют почти одинаковые климатические условия: для них характерен сухой, жаркий климат и слабая обводненность. Тем не менее геологически Каджаранское медно-молибденовое месторождение отличается от Кафанского медно-колчеданного, особенно присутствием значительного количества глинистых шламов и карбонатов, которые обуславливают слабощелочную кислотность (рН 7,4—7,9). Кафанское месторождение разрабатывается шахтным способом, Каджаранское—открытым.

При микробиологических анализах руд и рудничных вод Кафанского и Каджаранского месторождений основывались на методах выделения и учета микроорганизмов, приведенных в руководствах [4, 6, 9]. Для учета микроорганизмов, главным образом тионовых бактерий, применяли метод предельных десятикратных разведений на жидких питательных средах Сильвермана и Люндгрена, Ваксмана и Бейеринка. Кроме того, на указанных агаризованных средах, а также на полноценных средах агара из каждой анализируемой пробы производили высевы, что подтверждало присутствие микроорганизмов и служило способом получения культур для дальнейших исследований.

Содержание металлов в рудничных водах определялось в центральной аналитической лаборатории Армнипроцветмета: медь—объемным методом или полярографически, молибден—фотоколориметрически, железо—объемным или фотоколориметрическим методом.

Реакцию анализируемых проб измеряли прецизионным рН-метром типа ОР-205.

Результаты и обсуждение. В табл. 1 и 2 приводятся выборочные результаты микробиологических анализов некоторых проб из указанных месторождений.

Таблица 1

Микрофлора образцов руды и рудничной воды Кафанского месторождения, число микробов на г и мл (время обследования—март 1977 г.)

№№ проб	Происхождение и характеристика образцов	рН	Бактерии группы		Грибы микроскопические—пенициллы, аспергиллы и др.
			<i>Th. ferrooxidans</i>	<i>Th. thio-parus</i>	
1	Образец руды отвала Шаумяна (нижний гор., глубина: по вертикали—60, по горизонтали—30 см)	2,6	10 ⁶	0	1—10
4	Образец руды отвала Старый (у бывш. кап. штольни, средн. гор., глубина та же)	3,1	10 ⁴	0	0
5	Образец руды рудника (юж. участок, гор. 805, жила 52, внизу рудоспуска)	2,0	10 ⁶	0	0
6	Рудничная вода рудника (рядом с пробой 5, капез)	2,4	10 ⁵	0	1—10
7	Образец руды и воды рудника (юж. участок, гор. 805, жила 1, место старых работ; сильно-окисленная влажная руда)	2,5	10 ⁷	0	1—10
10	Рудничная вода рудника (на выходе старой кап. штольни, сильный родник)	2,8	10 ³	0	0
11	Образец руды рудника (юж. участок, гор 862, жила 1—11, свежееотбитая руда)	7,1	10	10 ³	0

Как показали результаты анализов, Кафанское месторождение в достаточно большом количестве обсеменено основной культурой, участвующей в окислении сульфидных минералов—*Th. ferrooxidans*. В отвалах и в самом руднике имеются участки, где плотность бактерий группы *Th. ferrooxidans* достигает 1—10 млн клеток в 1г руды. В рудничных водах они присутствуют в сравнительно меньшем количестве, до 100 тыс. клеток в 1 мл. Это во многом зависит от характера рудного тела, через которое просачиваются воды, обводненности участка, скорости течения и т. д.

Эти микроорганизмы выявляются и достаточно активны даже в старом отвале—50—70-летней давности; лишь в поверхностном слое его, на глубине 20—30 см, превратившемся в каолинизированную массу, они встречаются единично, либо вовсе отсутствуют. В пробах с низкими значениями рН бактерии из группы *Th. thio-parus* отсутствовали, но в свежееотбитой руде и в самом рудном теле со слабощелочным рН

Микрофлора образцов руды и рудничной воды Каджаранского месторождения,
число микробов на г и мл (анализы в течение 1977—1978 гг.)

№ № проб	Происхождение и характеристика образцов	рН	Температура воздуха	Бактерии группы		Грибы микроскопические — пенициллы, аспергиллы и др.
				<i>Th. ferrooxidans</i>	<i>Th. thloparus</i>	
1	Рудничная вода карьера (сев. рудоспуск, гор. 2070, очень слабый родник)	7,7	0—5	10	5×10^4	0
7	Рудничная вода карьера (сев. рудоспуск, гор. 2070, слабый родник)	7,5	20—25	0	10^5	0
8	Образец руды карьера (сев. рудоспуск, гор. 2070, из поверх. окисл. влажной рудной массы)	7,4—7,9	20—25	10^2	10^6	10—100
6	Образец руды карьера (свежеотбитая руда попутной добычи)	7,4—7,9	0—5	0	10^6	1—10
15	Образец руды карьера (свежеотбитая руда попутной добычи)	7,4—7,9	—4+3	0	10^5	1—10
11	Рудничная вода карьера (транс. штольня 36, капек)	7,2	12—15	0	5×10^6	10—100
12	Рудничная вода карьера (выход старой кап. штольни, сильный сток)	6,8	—4+3	0	10^4	10—100
5	Образец руды отвала (№ 2, средний гор., глубина: по вертикали—40, по горизонтали—20 см)	7,4—7,9	0—5	5×10^4	10^5	10—100
13	Образец руды отвала (сев.-запад., гор. 2100, глубина: по вертикали—3 м, по горизонтали—30 см)	7,4—7,9	—4+3	0	10^3	1—10

они обнаруживаются в количестве до 1000 клеток в 1 г руды. Хотя, по имеющимся литературным данным, роль сероокисляющих тионовых бактерий, развивающихся при высоких значениях рН, в окислении сульфидных месторождений несущественна, тем не менее наличие их в рудном теле дает основание предполагать участие в начальных процессах окисления сульфидных руд.

При микробиологических анализах редко выявлялись пенициллы, аспергиллы и другие микроскопические грибы, которые, вероятно, в рудных месторождениях играют общегеохимическую роль.

Следует отметить также, что при выделении *Th. ferrooxidans* на твердой среде 9К (Сильвермана и Лjungрена) иногда встречали его гетеротрофного спутника—культуру бактерий, хорошо растущую в подкисленной полноценной агаризованной среде (с образованием красноватого пигмента), которая не утрачивала жизнеспособности при начальных пересевах на агаре 9К. О подобных бактериях имеются сведения в работе Заварзина [1].

Нам не удалось установить присутствие *Thiobacillus thiooxidans* в анализируемых пробах: в среде Ваксмана бактерии *Th. ferrooxidans* росли нормально, что и затрудняло учет и выделение *Th. thiooxidans*.

При химических анализах рудничных вод (табл. 3) было обнаружено немалое количество меди (0,055—1,75 г/л) и железа (0,01—6,36 г/л), тогда как молибдена почти не было, что и следовало ожидать.

Таблица 3
Содержание металлов в обследованных рудничных водах, мг/л

Кафанское месторождение				Каджаранское месторождение			
№№ проб	медь	молибден	железо	№№ проб	медь	молибден	железо
6	1750	<0,6	6360	1	<2	13	<1
7	480	<0,6	10	3	<2	8	<1
9	1150	<0,6	1280	4	<2	<0,6	<1
10	55	<0,6	490	7	<2	8	<1
12	630	<0,6	900	9	<2	7	<1
				11	<2	2,2	<1
				12	<2	<0,6	<1
				16	<2	5,5	<1
				19	<2	1,6	<1

Таким образом, присутствие большого количества железooksисляющих тионовых бактерий и высокая активная кислотность (рН достигает 2,0) подавляющего большинства проанализированных проб, а также обогащенность рудничных вод медью и железом указывают на наличие активных окислительных биогенно-химических процессов на Кафанском месторождении.

Результаты микробиологических исследований образцов Каджаранского месторождения, характеризующихся слабощелочной реакцией (табл. 2), показали, что как на карьере, так и в отвалах основными микроорганизмами являются сероокисляющие группы *Th. thioparvus* в количестве, чаще всего, 0,1—1 млн. клеток в 1 г руды или 1 мл руднич-

ной воды. На Каджаранском месторождении серуоокисляющие бактерии группы Th. thioparus жизнедеятельны в течение всего года, хотя интенсивное развитие их наблюдается в летний период, когда температурные условия более благоприятны.

Обсемененность железоокисляющими бактериями группы Th. ferrooxidans довольно низкая—0—100 клеток на 1 г руды или 1 мл воды. Это говорит о том, что на Каджаранском месторождении эта культура не играет существенной роли; в подобных случаях, как известно, предполагается, что она жизнедеятельна в микрizonaх рудного тела.

В анализированных пробах Каджаранского месторождения часто встречались также микроскопические грибы—пенициллы, аспергиллы и другие. Однако число всех жизнеспособных грибов (при высевах) на 1 г руды или 1 мл воды не превышало 100, что свидетельствует о второстепенной роли их в процессе окисления сульфидных минералов.

Химический анализ рудничных вод показал, что в зависимости от происхождения, характеристики самих вод (табл. 2) в них содержится молибден от <0,6 до 13 мг/л, тогда как медь и железо почти отсутствуют, составляя <2 мг/л и <1 мг/л соответственно (табл. 3).

Таким образом, повсеместное и преобладающее присутствие серуоокисляющих бактерий группы Th. thioparus (число клеток в 1 г руды или 1 мл воды составляет 0,1—1 млн), а также наличие молибдена в рудничных водах дает основание считать, что на Каджаранском медно-молибденовом месторождении происходит, хотя и медленный, но постоянный процесс бактериально-химического выщелачивания молибдена.

Армянский НИИпроцветмет

Поступило 26.V 1980 г.

ՂԱՓԱՆԻ ԵՎ ՔԱԶԱՐԱՆԻ ՀԱՆՔԱՎԱՅՐԵՐՈՒՄ
ՄԻԿՐՈՐԳԱՆԵՉՄԱՆԻ ՄԱՍՆԱԿՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ
ԼՎԱՑԱԶԵՐԾՄԱՆ ՊՐՈՑԵՍՆԵՐՈՒՄ

Ս. Տ. ՇԱՀՆՈՒՐԱՅԱՆ, Ս. Գ. ՍԱՐԻԿԱՆՅԱՆ

Ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ Ղափանի պղինձ-կոլչեղտնային հանքավայրում երկաթօքսիդացնող թիոնային Thiobacillus ferrooxidans բակտերիաները կենսագործում են պղնձի և երկաթի լվացադերծման ակտիվ պրոցեսներ: Քաջարանի պղինձ-մոլիբդենային հանքավայրում բացահայտված է մոլիբդենի դանդաղ, բայց մշտապես ընթացող բիոգենաքիմիական լվացադերծում: Ծծումբ օքսիդացնող Th. thioparus խմբի բակտերիաների ամենուր ու գերակշռող ձևով հանդես դալն այստեղ (1 գր հանքաքարում կամ 1 մլ հանքաջրում բջիջների թիվը կազմում է 0,1—1 մլն) հիմք է տալիս ենթադրելու, որ հենց այդ բակտերիաներն են մասնակցում մոլիբդենի լվացադերծմանը:

PARTICIPATION OF MICROORGANISMS IN METAL LEACHING PROCESSES AT KAPHAN AND KADJARAN DEPOSITS

S. T. SHAKHNUBARIAN, S. G. SARUKHANIAN

It has been established that active leaching of copper and iron at Kaphan chalcopyrite deposit is realized mainly by iron-oxidizing bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. Slow, but constant biogenous and chemical leaching of molybdenum at Kadjaran copper-molybdenum deposit has been revealed. General and prevalent presence of sulphur-oxidizing bacteria of *Thiobacillus thioparus* group (number of cells in 1 g of ore and 1 ml of water is equal to 0,1—1 million) allows to suppose the participation of these bacteria in molybdenum leaching process.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Заварзин Г. А. Литотрофные микроорганизмы. М., 1972.
2. Иванов М. В., Ляликова Н. Н., Кузнецов С. И. Изв. АН СССР, сер. биол., 2, 1958.
3. Каравайко Г. И. Микробиология, 35, 1004, 1966.
4. Каравайко Г. И., Кузнецов С. И., Голожик А. И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., 1972.
5. Каравайко Г. И. Автореф. докт. дисс., М., 1973.
6. Кузнецов С. И., Романенко В. И. Микробиологическое изучение внутренних водоемов (лабораторное руководство). М.—Л., 1963.
7. Ляликова Н. И. Микробиология, 29, 382, 1960.
8. Маркосян Г. Е. Биол. ж. Армении, 25, 26, 1972.
9. Мейнелл Дж., Мейнелл Э. Экспериментальная микробиология. М., 1967.
10. Bryner I. C., Beck J. V., Davis D. B., Wilson D. G. Ind. Eng. Chem., 46, 2587, 1954.
11. Razzell W. E. and Trussell P. C. Appl. Microbiol., 11, 105, 1963.

БИОСИНТЕЗ ЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ В КУЛЬТУРЕ BACILLUS SUBTILIS

О. В. КИСЛУХИНА, К. А. КАЛУНЯНЦ, Б. А. МАРГАРЯН, Т. А. КУЗНЕЦОВА

Искусственное обеднение среды достигалось разбавлением культуральной жидкости на стадии активного синтеза литических ферментов компонентами, не содержащими органических соединений углерода и азота. При разбавлении культуральной жидкости этими компонентами в 1,75—2,5 раза получено увеличение выхода литических ферментов на 60—70%. Для активации биосинтеза литических ферментов могут быть применены регуляторы автолиза, снижающие интенсивность автолиза клеток продуцента литических ферментов. В качестве регуляторов автолиза использовались препараты фракции тейхоевых кислот микроорганизмов.

Ключевые слова: автолиз, лизис, ферменты.

Литические ферменты находят применение в различных процессах, связанных с разрушением клеток микроорганизмов или повышением проницаемости микробных клеточных стенок. Они используются в микробиологической промышленности при получении лизатов микробной биомассы и в медицине как средство борьбы с патогенными микроорганизмами. В последние годы значительно расширился круг исследований, посвященных этим ферментам. Наряду с изучением классического объекта—лизоцима животных—проводятся обширные исследования литических ферментов микроорганизмов.

К числу активных продуцентов литических ферментов относятся бактерии вида *Bac. subtilis*. Наши исследования показали, что ферментные препараты, выделенные из культуры различных штаммов *Bac. subtilis*, способны лизировать клетки грамположительных и грамотрицательных бактерий, дрожжей и высших грибов [1, 2, 4, 6]. Ферменты, продуцируемые штаммами *Bac. subtilis* 402 и 797, относятся к группе литических протеаз [1, 2]. Были определены оптимальные условия культивирования этих продуцентов в режиме одностадийного периодического процесса. В настоящей статье приводятся результаты, полученные при культивировании продуцента литических ферментов в режиме двухстадийного периодического процесса с использованием искусственного обеднения питательной среды и стабилизации клеток продуцента с помощью регуляторов автолиза.

Материал и методика. В качестве продуцента литических ферментов использовали штамм *Bac. subtilis* 402 (ЦМПМ-В-1611). Глубинную культуру продуцента выращивали в колбах на качалке, питательная среда содержала (в %): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ —

0,4, KCl—0,06, CaCl₂—0,01, MgSO₄·7H₂O—0,01, органические источники питания—2 при рН 7—7,2. Продолжительность культивирования 16—18 ч при температуре 37°.

Препараты регуляторов автолиза выделяли следующим образом. К 100 мл суспензии биомассы микроорганизма, содержащей 5—10% сухих веществ, добавляли 10 мг кристаллического яичного лизоцима, лизис вели при постоянном перемешивании и температуре 40° в течение часа, затем вносили 10 мг кристаллического трипсина и продолжали процесс еще час в тех же условиях. К полученному фермент-лизату биомассы добавляли 20 мл 30%-ного раствора трихлоруксусной кислоты (конечная концентрация ТХУ 5%), экстрагировали кислоторастворимую фракцию в течение 3 ч при температуре 40—45° и перемешивали, после чего экстракт отделяли центрифугированием и охлаждали. К охлажденному экстракту добавляли 5 объемов изопропанола или ацетона, выпавший осадок отделяли центрифугированием, дважды промывали органическим растворителем, затем растворяли в воде, нейтрализовали слабым раствором NaOH и лиофилизировали.

Активность литических ферментов определяли турбидиметрическим методом по действию на клетки *E. coli* K12 [3]. За единицу активности принято количество фермента, которое вызывает снижение оптической плотности стандартной водной суспензии бактериальных клеток со скоростью 0,001 ед. оптической плотности в минуту при температуре 30°.

Интенсивность автолиза бактерий определяли путем измерения оптической плотности суспензии клеток до и после инкубации в течение часа при температуре 37°. Суспензию клеток pripravляли путем размешивания биомассы в воде на магнитной мешалке в течение 30—40 мин с последующей фильтрацией через слой ваты для отделения крупных частиц. Оптическую плотность измеряли на ФЭК-56М при длине волны 540 нм в кювете толщиной 5 мм. При определении влияния регуляторов на интенсивность автолиза реакционная смесь содержала в контроле 4 мл суспензии бактериальных клеток и 4 мл воды, в опытных вариантах—4 мл суспензии клеток и 4 мл водного раствора регулятора автолиза различной концентрации. При определении интенсивности автолиза клеток глубинной культуры *Bac. subtilis* реакционная смесь состояла из 4 мл суспензии клеток и 4 мл 0,02 М фосфатного буфера рН 7,8. Во всех случаях исходная оптическая плотность реакционной смеси—около 0,5. Интенсивность автолиза

$$I = \frac{D_0 - D_{60}}{D_0} 10\%, \text{ где}$$

D_0 —исходная оптическая плотность реакционной смеси, D_{60} —то же по истечении времени инкубации.

Результаты и обсуждение. Биосинтез внеклеточных литических ферментов является одним из приспособительных механизмов, способствующих выживанию микроорганизмов в естественных биоценозах. Микроорганизмы, продуцирующие внеклеточные литические ферменты широкого спектра действия, получают преимущество в конкурентной борьбе за источники питания, которая особенно обостряется на бедных питательных средах. В этих условиях продуцент литических ферментов может сохранить популяцию, используя в качестве органических источников питания продукты ферментативного расщепления клеток инородных микроорганизмов [5]. Биологическая целесообразность биосинтеза литических ферментов на бедных питательных средах позволяет предположить, что обеднение питательной среды по источникам органических соединений может служить стимулирующим фактором биосинтеза литических ферментов. Исходя из этого предположения, мы исследовали влияние искусственного обеднения питательной среды на выход литических ферментов при глубинном культивировании *Bac.*

subtilis. Искусственное обеднение среды проводили в конце ферментации. Выращивание продуцента на изначально обедненной среде считали нецелесообразным, так как это привело бы к снижению величины популяции.

Культуру выращивали на основной питательной среде в течение 14 ч, затем в культуральную жидкость вносили стерильную водопроводную воду или солевые растворы и продолжали культивирование еще 2 ч. Использовали следующие солевые растворы: $\text{CaCl}_2 + \text{MgSO}_4$, $\text{KCl} + (\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$, полный солевой состав основной среды. Соли содержались в растворах в тех же концентрациях, что и в основной питательной среде, за исключением фосфата аммония, концентрация которого была снижена вдвое.

Предварительные опыты показали, что при введении в культуральную жидкость воды или солевых растворов в количестве 0,5 объемов по отношению к исходному объему питательной среды выход литических ферментов повышается примерно в 1,5 раза и практически не зависит от состава разбавляющего раствора.

Было исследовано влияние степени разбавления культуральной жидкости на выход литических ферментов. Результаты табл. 1 показывают, что максимальный эффект от введения воды достигается в случае разбавления в 1,75 раза и составляет 62%. При разбавлении культуральной жидкости полным солевым составом оптимален вариант разбавления в 2,5 раза, при этом суммарная активность синтезированных литических ферментов повышается на 72%.

Таблица 1
Влияние разбавления культуральной жидкости на биосинтез литических ферментов в культуре *Vac. subtilis*

Состав разбавляющей среды	Кратность разбавления	Литическая активность, ед./мл	Выход литической активности, % к контролю
—	—	13200	100
Водопроводная вода	1,5	12400	141
	1,75	12200	162
	2	9100	138
Полный солевой состав среды	2	9630	146
	2,25	9150	156
	2,5	9100	172
	2,75	6770	141

Таким образом, искусственное обеднение питательной среды на стадии активного синтеза литических ферментов даст возможность повысить их выход практически без затрат на источники питания. Полученные результаты подтверждают предположение о том, что истощение запасов источников органических соединений в среде является индуктирующим фактором биосинтеза литических ферментов.

При обеднении питательной среды по источникам органических соединений углерода и азота снижается осмотическое давление среды. Известно, что осмотическое давление является фактором, стабилизи-

рующим клеточные структуры. При снижении его активируются литические процессы, снижается продолжительность продуктивного состояния микробных клеток. Это уменьшает положительный эффект обеднения питательной среды, связанный с индукцией синтеза литических ферментов. Для повышения положительного эффекта разбавления культуральной жидкости в нее одновременно с разбавляющими компонентами должны вводиться компоненты, препятствующие развитию автолитических процессов в клетках продуцента.

В качестве таких компонентов нами были использованы регуляторы автолиза бактерий—фракция тейхоевых кислот микроорганизмов. Исследование действия регуляторов на интенсивность автолиза *Bac. subtilis* шт. 402 показало, что препараты, выделенные из различных источников, могут повышать или понижать интенсивность автолиза и различаются по силе воздействия. Для стабилизации клеток продуцента литических ферментов необходимо было выбрать регуляторы, понижающие интенсивность автолиза и обладающие высокой эффективностью действия. С этой целью была определена зависимость интенсивности автолиза клеток шт. 402 от концентрации регуляторов и на основании полученных данных вычислены концентрации регуляторов из различных источников, необходимые для снижения интенсивности автолиза вдвое (табл. 2). Наиболее специфичным из испытанных ока-

Т а б л и ц а 2
Концентрации регуляторов автолиза, необходимые для снижения интенсивности автолиза *Bac. subtilis* шт. 402 на 50%

Источник регулятора	Концентрация регулятора, мг/мл
<i>Bacillus mesentericus</i> I	0,086
<i>Bacillus subtilis</i> 402	0,33
<i>Bac. mesentericus</i> 69	0,43
<i>Bac. mesentericus</i> 346	0,44
<i>Bac. subtilis</i> Г—43	0,57
<i>Bac. subtilis</i> Ф	0,9
<i>Bacillus licheniformis</i>	1
<i>Bac. mesentericus</i> ПВ	более 1
<i>Bac. subtilis</i> R—623	
<i>Candida guilliermondii</i>	
<i>Bac. subtilis</i> 72	
<i>Bac. subtilis</i> 797	

зался препарат регулятора из *Bac. mesentericus* I, высокой эффективностью обладал также регулятор из *Bac. subtilis* шт. 402. С точки зрения физиологии больший интерес представлял регулятор из культуры продуцента литических ферментов, и он был использован в опытах по влиянию регулятора автолиза на биосинтез литических ферментов.

Необходимо было определить момент введения регулятора. Для этого была исследована динамика интенсивности автолиза клеток продуцента и литической активности культуральной жидкости. Результаты, приведенные на рис., показывают, что в данной серии опытов максимум интенсивности автолиза и литической активности культуральной жидкости наблюдался в 18—20-часовой культуре. Для введения

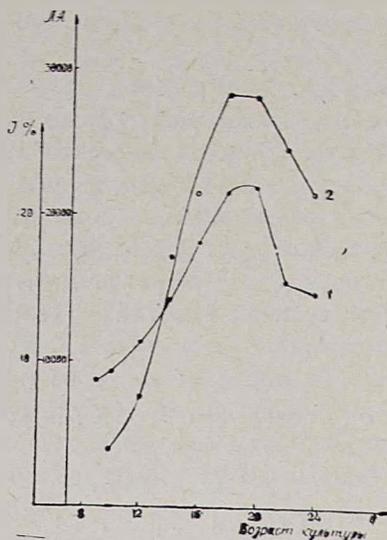


Рис. Зависимость интенсивности автолиза клеток продуцента и литической активности культуральной жидкости от возраста глубинной культуры *Bac. subtilis*. 1—интенсивность автолиза, 2—литическая активность

регулятора был выбран возраст культуры 14 ч, когда интенсивность автолиза составляет 70% от максимальной. После введения регулятора культивирование продолжали 4 ч, то есть до возраста культуры 18 ч.

Оптимальная концентрация регулятора автолиза, определенная при внесении его в малом объеме (0,12 объема исходной среды), составила 0,75 мг/мл (табл. 3). При этом было получено увеличение вы-

Таблица 3
Влияние регулятора автолиза из *Bac. subtilis* шт. 402 на биосинтез литических ферментов в культуре того же штамма

Добавляемые компоненты и их количество		Литическая активность	
вода, объемы	регулятор автолиза, мг/мл исходного объема среды	ед/мл	выход, % к контролю
—	—	13200	100
0,12*	0,25	13100	111
0,12	0,5	13200	112
0,12	0,75	15900	135
0,12	1	15700	133
1	0	9840	149
1	0,75	11900	180

* Объем водного раствора регулятора автолиза.

хода литических ферментов на 35%. При внесении того же количества регулятора автолиза на фоне двукратного разбавления культуральной жидкости водой эффект составил 80% по отношению к контролю, или 31% относительно варианта с разбавлением водой без регулятора. Таким образом, абсолютная величина эффекта от внесения регулятора была в обоих случаях одинаковой. Полученные результаты подтвердили предположение о том, что введение регулятора, снижающего интенсивность автолиза клеток продуцента литических ферментов, может повысить уровень биосинтеза этих ферментов.

Нами впервые был использован специфический регулятор автолиза для стимуляции биосинтеза внеклеточных метаболитов бактерий. В настоящее время в практике микробиологической промышленности для этих целей применяются неспецифические способы регуляции. Так, для стабилизации автолизирующихся клеток продуцентов амилазы и протеазы используется осмотическое давление, создаваемое высокими концентрациями органических компонентов питательной среды. В ферментации продуцентов аминокислот, где возникает необходимость повысить проницаемость клеточных стенок бактерий, в среду вводят поверхностно-активные вещества или антибиотики. Тот же эффект может быть достигнут путем введения специфических регуляторов, повышающих интенсивность автолиза клеток продуцентов аминокислот.

Общность механизма автолитических процессов у бактерий позволяет предполагать, что специфические регуляторы автолиза найдут широкое применение в процессах микробиологического синтеза целевых продуктов. Это даст возможность избежать нежелательных побочных явлений, вызываемых применением неспецифических способов регуляции автолиза.

ВНИИ биотехники, Москва, Институт микробиологии
АН Армянской ССР

Поступило 15.IX 1980 г.

ԼԻՏԻԿ ՖԵՐՄԵՆՏՆԵՐԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ BACILLUS SUBTILIS ԿՈՒՆՏՐՈՒՅՈՒՄ

Ս. Վ. ԿԵՍԻՍԻՆՅԱ, Կ. Ա. ԿԱԼՈՒՆՅԱՆՑ, Բ. Ա. ՄԱՐԳԱՐՅԱՆ, Տ. Ա. ԿՈՒԶՆՅՈՎԱ

Հոդվածում քննվում են լիտիկ ֆերմենտների բիոսինթեզը կարգավորող եզանակները:

Ցույց է տրված, որ իբրև բիոսինթեզի խթանիչ գործոն հանդես է գալիս օրգանական միացությունների պաշարի սպառումը: Դա գործնականորեն հնարավորություն է տալիս բարձրացնելու նրանց ելքը՝ առանց սննդի աղբյուրների ծախսման: Արտաբջջային լիտիկ ֆերմենտների բիոսինթեզը խթանելու համար օգտագործված է նաև յուրահատուկ կարգավորիչ, որն առանձնացված է *Bac. subtilis* 402 շտամից:

STUDY OF BIOSYNTHESIS OF LYTIC ENZYMES IN *BACILLUS SUBTILIS* CULTURE

O. V. KISLUKHINA, K. A. KALUNIANTS, B. A. MARKARIAN,
T. A. KUZNETSOVA

The ways of regulation of biosynthesis of lytic enzymes are discussed. The exhaustion of sources of organic compounds in the environment is the factor which induces biosynthesis of lytic enzymes making it possible to increase their output without any expenditure on the sources of nourishment. The specific regulator of autolysis, which has been also used for stimulation of biosynthesis of extracellular lytic enzymes, is the fraction of teichoic acid from *Bac. subtilis* 402.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксеновская В. Е., Кислухина О. В., Калунянц К. А. Ферментная и спиртовая промышленность, 7, 20, 1979.
2. Бизюлявичюс Г. С., Кислухина О. В., Авиженис В. Ю. Тр. ВНИИ прикладной энзимологии. Вып. 3. Производство и применение микробных ферментных препаратов. Вильнюс, 105, 1976.
3. Кислухина О. В. Микробиолог. промышленность, 10, 43, 1976.
4. Кислухина О. В., Бизюлявичюс Г. С. Прикладная биохимия и микробиология, 13, 55, 1977.
5. Кислухина О. В., Калунянц К. А. Микробиолог. промышленность, 9, 23, 1977.
6. Кислухина О. В., Кузнецова Т. А., Аксеновская В. Е. Микробиолог. промышленность, 4, 2, 1979.

БИОСИНТЕЗ АСПАРАГИНАЗЫ У ДРОЖЖЕЙ CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ У-42

К. Р. СТЕПАНЯН, М. А. ДАВТЯН

Активность аспарагиназы дрожжей *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 низка после выращивания их в течение 48 ч на твердом агаре (перед посевом в синтетическую среду). Резко снижается она и после азотного голодания дрожжей в 2%-ной глюкозе. Самая высокая активность фермента отмечается в конце лаг-фазы и в начале логарифмической фазы роста, по мере накопления биомассы и снижения pH среды выращивания (6,5—2,5) она снижается.

При использовании L-аспарагина, L-аспартата и последнего совместно с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в качестве единственных источников азота активность фермента не увеличивается.

Ключевые слова: дрожжи, аспарагиназа.

Установлено, что на образование аспарагиназы микроорганизмами существенное влияние оказывают источники азота, углерода, pH среды, температура, фаза роста, аэрация и т. д. Существуют различные механизмы регуляции биосинтеза аспарагиназы, даже среди представителей одного рода.

В большинстве случаев наибольшее накопление аспарагиназы наблюдается в конце логарифмической и в начале стационарной фазы роста [1, 7, 11, 15, 16]. В некоторых случаях, в частности у *Pseudomonas fluorescens*, максимальное образование фермента отмечено в середине логарифмической фазы роста [10].

Относительно много данных накопилось в отношении индукции аспарагиназы ее природным субстратом аспарагином и продуктом реакции аспартатом. Так, у *Pseudomonas* активность фермента в 20 раз выше в присутствии аспарагина и в 17 раз — аспарагиновой кислоты [3]. Повышение аспарагиназной активности при добавлении в среду аспарагина или аспарагиновой кислоты получено и другими авторами [5, 9, 11, 14]. Интересно, что у некоторых микроорганизмов аспартат оказывается более сильным индуктором, чем аспарагин [5, 6].

В предыдущих наших работах были приведены данные об ингибировании и стабилизации аспарагиназы дрожжей [13], описаны метод ее очистки и некоторые физико-химические свойства [4].

В настоящей работе приводятся результаты исследования зависимости активности аспарагиназы дрожжей от фазы роста, pH среды выращивания, источника азота и азотного голодания.

Выращивание дрожжей и определение ферментативной активности проводились по ранее описанным методам [12].

Результаты и обсуждение. В первой серии опытов определялись количество биомассы, рН среды и активность аспарагиназы дрожжей в стационарной фазе роста (после выращивания в течение 24 ч) при использовании разных источников азота.

Таблица I

рН среды, количество накопленной биомассы и активность аспарагиназы при выращивании дрожжей на разных источниках азота в стационарной фазе роста

Источник азота	рН среды		Количество биомассы, мг	Активность аспарагиназы, мкг NH ₃ / мг сухих дрожжей
	начальный	конечный		
(NH ₄) ₂ SO ₄	6,3	2,8	2,8	12,0
l-аспартат	6,5	7,3	4,1	20,0
l-аспартат ÷ (NH ₄) ₂ SO ₄	6,5	6,33	3,6	21,0
l-аспарагин + (NH ₄) ₂ SO ₄	6,4	3,1	5,2	15,0
l-аспарагин	6,45	4,3	6,4	19,0

Как видно из табл. I, наибольший прирост биомассы в стационарной фазе роста среди использованных источников азота наблюдается на аспарагине. Добавление (NH₄)₂SO₄ подавляет этот процесс как в вариантах с аспарагином, так и с аспартатом. Необходимо отметить, что здесь и в дальнейшем источники азота брались в таких количествах, чтобы и соотношение, и суммарное количество по азоту во всех вариантах были одинаковыми.

Из таблицы видно также, что самая высокая активность аспарагиназы в этих условиях наблюдается при использовании в качестве источника азота смеси аспартата с (NH₄)₂SO₄. На первый взгляд полученные данные можно оценить как результат индукции фермента аспарагином и аспартатом (лучшим вариантом является аспартат с ионами аммония).

Как уже отмечалось, в литературе есть данные, согласно которым аспартат у некоторых микроорганизмов является более сильным индуктором для аспарагиназы, чем ее природный субстрат—аспарагин [2, 6, 9]. У других микроорганизмов они не влияют на образование аспарагиназы, а у нескольких видов *Pseudomonas* добавление аспарагиновой кислоты или ее амида даже ингибирует синтез фермента [8, 15]. Некоторые авторы [17] предполагают, что наблюдаемое стимулирование синтеза фермента аспартатом связано не с явлением индукции, а с непосредственным участием его в образовании молекулы аспарагиназы, где он является доминирующим. В некоторых случаях индукция фермента аспартатом происходит только в среде, содержащей аммиак, который не влияет на его индукцию аспарагином [9]. Авторы этих данных предполагают, что аспарагиновая кислота превращается в амид и затем индуцирует синтез фермента.

Возможность индукции непосредственно продуктом реакции маловероятна, как и репрессия синтеза фермента его природным субстратом.

В наших опытах измерение pH среды выращивания дрожжей в стационарной фазе роста при разных источниках азота показало, что он меняется по-разному (табл. 1) и зависит от продолжительности и условий выращивания, количественных соотношений источников азота и т. д.

pH среды выращивания сохраняется относительно постоянным при использовании аспартата с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, и активность аспарагиназы при этом самая высокая (табл. 1). Так как pH среды играет отнюдь не последнюю роль как во всех происходящих в клетке процессах, так и, следовательно, в накоплении биомассы и проявлении активности аспарагиназы, нами была исследована активность фермента в условиях постоянного pH среды, поддерживаемого путем периодической нейтрализации его 0,1N NaOH. При этом совершенно неожиданно оказалось, что аспарагин и, тем более, аспартат в качестве источника азота не имеют преимуществ по сравнению с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (табл. 2). Следовательно, можно заключить, что аспарагин и аспартат, а также последний в комбинации с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ не являются индукторами аспарагиназы. Их благоприятное влияние на биосинтез фермента, по-видимому, обусловлено степенью поддержания pH среды постоянным.

Таблица 2

Активность аспарагиназы дрожжей в начале логарифмической фазы роста при выращивании на разных источниках азота (pH среды поддерживался постоянным, 6,4)

Источник азота	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспар- тат	l-аспар- тат + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспара- гин + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	l-аспара- гин
Активность фермента мкг, N_2 мг сухих дрожжей	45,5	39,0	43,5	42,0	48,0

Важным моментом оказалось выяснение зависимости активности аспарагиназы от фазы роста дрожжей. Как показывают данные (рис.), высокой аспарагиназной активностью обладают клетки в конце лаг-фазы и в начале логарифмической фазы роста. В дальнейшем, в ходе накопления биомассы, активность фермента снижается даже при поддержании pH среды постоянным, правда, она все же выше, чем при снижении pH среды (кривая получена при использовании $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Таким образом, полученные результаты дают основание предположить, что энергичное образование фермента у исследуемых дрожжей происходит в молодых делящихся клетках.

Интересно, что активность аспарагиназы была очень низкой у дрожжей и перед посевом в синтетическую среду, т. е. после выращивания в течение 48 ч на твердом агаре, всего 5 мкг NH_3 /мг сухих клеток (самая высокая активность фермента обнаруживается в начале ло-

гарифмической фазы роста, составляя примерно 45—55 мкг NH_3 /мг сухих дрожжей). Следовательно, после адаптации дрожжей к синтетической среде их аспарагиназная активность повышается примерно в 10 и более раз.

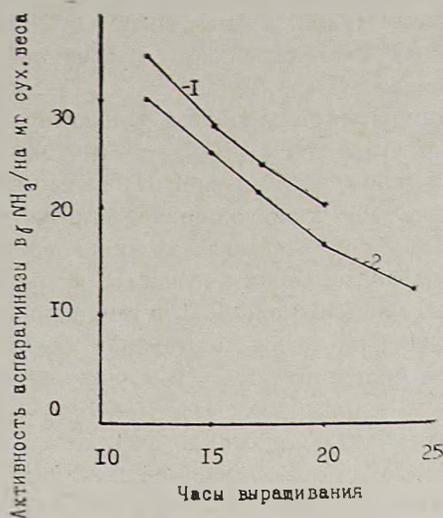


Рис. Зависимость активности аспарагиназы дрожжей от фазы роста и pH среды выращивания. 1—при постоянном pH, 2—при изменяющемся pH.

Изучалось также влияние азотного голодания дрожжей на активность аспарагиназы.

Голодание проводилось в условиях интенсивного аэрирования при 30° в двух вариантах: на дистиллированной воде (24 ч); на 2%-ной глюкозе (48 ч) с последующим перенесением биомассы на дистиллированную воду (24 ч).

Таблица 3

Аспарагиназная активность дрожжей, выращенных на разных источниках азота и на фоне голодания, мкг NH_3 /мг сухих клеток

Источник азота	Аспарагиназная активность перед и после голодания		
	перед голоданием (дрожжи в середине логарифмической фазы роста)	голодание на воде (24 ч)	голодание на 2%-ной глюкозе (24 ч) + на воде (24 ч)
$(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$	36,0	33,0	5,0
l-аспаргат	30,0	28,0	2,5
l-аспарагин	30,0	31,0	1,0

Из табл. 3 видно, что при голодании в течение 24 ч на воде активность аспарагиназы почти не меняется, т. е. не подвергается индукции, подобно большинству катаболических ферментов аминокислотного обмена (аргиназе, глутаматдегидрогеназе и т. д.), во втором же ва-

рианте она резко снижается. Можно предположить, что при азотном голодании на 2%-ной глюкозе происходит катаболитная репрессия, или аспарагиназа расходуется в этих жестких условиях для сохранения жизнеспособности клеток.

Ереванский государственный университет,
кафедра биохимии и проблемная лаборатория сравнительной и
эволюционной биохимии

Поступило 7.V 1980 г.

CANDIDA GUILLIERMONDII ВКМ-У-42 ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ԱՍՊԱՐԱԳԻՆԱԶԱՅԻ ԲԻՈՍԻՆԹԵԶԸ

Կ. Ի. ՍՏԵՓԱՆՅԱՆ, Մ. Ա. ԴԱՎԹՅԱՆ

48 ժամ պինդ ազարի վրա աճելուց հետո *Candida guilliermondii* ВКМ-У-42 խմորասնկերն ունեն շատ ցածր ասպարագինազային ակտիվություն: Ֆերմենտի ամենաբարձր ակտիվություն դիտվում է սինթետիկ միջավայրում աճման լադֆազի վերջում ու լոգարիթմական ֆազի սկզբում և կենսազանգ-վածի աճի հետ մեկտեղ այն նվազում է:

Ասպարագինազային ակտիվությունը կտրուկ իջնում է նաև խմորասնկե-րը 2% գլյուկոզայի միջավայրում ազոտային քաղցի ենթարկելուց հետո:

Ասպարագինի, ասպարտատի և վերջինիս $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -ի հետ որպես աղտի միակ աղբյուր օգտագործելու դեպքում ֆերմենտի ակտիվությունը չի բարձրանում:

Ուսումնասիրված սահմաններում աճման միջավայրի pH-ի նվազման (6,5—2,5) դեպքում ասպարագինազայի ակտիվությունը նվազում է:

SOME ASPECTS OF ASPARAGINASE BIOSYNTHESIS OF *CANDIDA GUILLIERMONDII* YEAST

K. R. STEPANIAN, M. A. DAVTIAN

It has been established that asparaginase activity after the growth during 48 hours on hard agar is low. The activity also considerably decreases after nitrogenous starvation in 2% glucose. The maximal activity of yeast asparaginase has been observed at the end of lagphase and the beginning of logphase, while during accumulation of biomass and decrease of growth medium pH the activity of asparaginase is reduced.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Виноградова Б. Д., Чегалейчик А. Г., Пириева Д. А., Ушаков В. М., Рылкин С. С. Микробиология, 45, 1, 1976.
2. Гривинь П. П., Аузан С. И., Озолин Р. К. Микроорганизмы—продуценты биологически активных веществ, Рига, 1972.
3. Гарьковая Л. Ф., Крайзман З. В., Гривинь П. П., Озолин Р. К. Биосинтез и выделение микробных метаболитов. Рига, 1975.

4. Давтян М. А., Степанян К. Р., Оганесян С. П. Биолог. ж. Армении. 30, 2, 1977.
5. Евсеев Л. П., Николаев А. Я., Еременко В. В., Мардашев С. Р. Биохимия, 32, 4, 1967.
6. Евсеев Л. П. Автореф. канд. дисс., М., 1970.
7. Еременко В. В., Соколов Н. Н. Прикладная биохимия и микробиология, 10, 1, 1974.
8. Занин В. А. Изв. АН СССР (сер. биол.), 3, 338, 1973.
9. Мардашев С. Р., Николаев А. Я., Евсеев Л. П., Еременко В. В. Биохимия, 32, 5, 1967.
10. Мардашев С. Р., Еременко В. В., Николаев А. Я. Микробиология, 39, 11, 1970.
11. Нефедова М. В., Игнатов С. Г., Чигалейчик А. Г., Виноградов Д. А., Егоров Н. С. Прикладная биохимия и микробиология, 14, 4, 1978.
12. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 28, 9, 1975.
13. Степанян К. Р., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении. 30, 3, 1977.
14. Смирнов И. П., Занин В. А., Березов Т. Т. Прикладная биохимия и микробиология, 12, 1, 1976.
15. Cedar H., Schwartz J. H. J. Bacteriol., 96, 6, 1968.
16. Roberts J., Burson G., Hill J. M. J. Bacteriol, 95, 2117, 1968.
17. Wehlan H. A., Wriston I. C. Biochem., 8, 6, 1969.

ВИТАМИН В₁₂ В ПОЧВЕ

З. Г. АВАКЯН, Э. К. АФРИКЯН

Установлено наличие витамина В₁₂ в различных типах почв в связи с микробиологической активностью и содержанием органического вещества почвы. Количество витамина В₁₂ снижается в глуболежащих горизонтах почвы и по мере ослабления ее биологической активности.

Ключевые слова: почва, витамин В₁₂.

Исследованиями многих авторов установлено наличие в почве различных витаминов и других физиологически активных веществ, играющих большую роль в плодородии почвы и жизни растений [3, 4, 5]. Эти соединения имеют важное значение для жизнедеятельности микроорганизмов почвы, определяющих, в основном, ее биологическую активность [5, 7]. С другой стороны, качественный и количественный состав микрофлоры, несомненно, является ведущим фактором накопления, усвоения и разрушения витаминов и других биологически активных веществ почвы.

Придавая важное значение роли витаминов в жизнедеятельности почвенной микрофлоры, ряд авторов ставили плодородие почвы в связи с содержащимися в ней ростовыми веществами. Показано, что витамины и другие ростовые вещества в почве во многом обуславливают ее продуктивность, а также видовой состав микрофлоры [5, 9].

Среди всех витаминов и различных других ростовых соединений витамин В₁₂ представляет собой наиболее специфический индикатор микробиологической активности почв. Как известно, этот витамин в отличие от других образуется исключительно микроорганизмами, в том числе водорослями. Ранее выполненные нами работы показали, что распространение витамина В₁₂ в разных типах почв коррелирует с содержанием в них органического вещества и экологией продуцирующих их микроорганизмов [1]. В наших опытах было показано образование и накопление в почве этого витамина в процессе развития в ней продуцирующих его бактерий [2].

В настоящей работе обобщается собственный материал по распространению в различных типах почв витамина В₁₂ по разным горизонтам и в связи с составом микрофлоры.

Материал и методика. Объектами изучения явились образцы различных типов почв Армении по разным горизонтам, предоставленные Институтом почвоведения и

игрохмия МСХ Армянской ССР. Исследовались также образцы различных лечебных грязей, полученных из разных учреждений.

Определение витамина В₁₂ в почве производилось микробиологическим методом с применением индикаторного штамма кишечной палочки 113—3, описанным ранее [1], с некоторой модификацией в подготовке материала, которая заключалась в том, что стабилизация витамина производилась добавлением взамен щавелевого калия раствора нитрата натрия. Стандартный раствор витамина готовился на ацетатном буфере при рН 4.6 с использованием кристаллического препарата витамина В₁₂, к которому добавлялся 0,01%-ный раствор KCN в дистиллированной воде из расчета 10 мг/мл KCN на 10 мл раствора витамина. Стандартный раствор разливался в ампулы, которые запаивались и затем стерилизовались в автоклаве при 1 атм. в течение 10 мин. Приготовленные подобным образом стандартные растворы витамина хранились в холодильнике и употреблялись при каждом определении. Параллельно при каждом определении готовился свежий стандартный раствор витамина.

Для эффективной стабилизации витамина В₁₂ экстракция его и разводки карбонатных почв производились в ацетатном буфере с рН 4.6, красноземы и кислые почвы разводились дистиллированной водой.

Содержание витамина в почве определялось из расчета на абсолютно сухую почву.

Количественный и качественный состав микробного населения почв определялся расевом почвенной разводки на дифференциальных питательных средах, мясо-пептонном агаре (МПА), МПА с сусло-агаром (1:1), синтетической среде СР 1 и Эшби-агаре. Содержание спор бактерий выявлялось высевом пастеризованной при 70° в течение 10 мин разводки почвы на МПА и МПА сусло-агаре. Групповой и видовой состав аэробных спороносных бактерий выявлялся по культуральным особенностям на указанных средах и микроскопией живых препаратов.

Учитывая, что исследованию были подвергнуты сравнительно несвежие образцы почв, количественные показатели содержания микрофлоры занижены, особенно по составу неспороносных бактерий.

Результаты и обсуждение. Полученные нами результаты подтвердили ранее полученные в нашей лаборатории данные о наличии определенной зависимости между содержанием витамина В₁₂ в почве и ее биологической активностью.

Как показывают данные табл. 1, в которой представлены выборочные и типичные результаты, более богатыми по содержанию витамина В₁₂ являются черноземы и лесные почвы, характеризующиеся высокой концентрацией органического вещества. Этот витамин обнаруживается здесь в количестве 3—6 мкг/кг воздушно-сухой почвы. Содержание его по мере углубления в нижележащие слои почвы уменьшается.

Для выявления закономерностей распространения витамина В₁₂ в разных горизонтах почвы нами были проведены специальные исследования приблизительно на 100 образцах различных типов почв. Одновременно с определением витамина анализировался количественный и качественный состав микрофлоры.

В табл. 2 обобщены данные о содержании микрофлоры и витамина В₁₂ по горизонтам бурых окультуренных почв Арташатского района. Как видно из таблицы, содержание витамина В₁₂ в верхнем горизонте находится в пределах 3—5 мкг/кг. В этих слоях почвы, являющихся наиболее биологически активными, обнаруживается обильная микрофлора, особенно по составу неспороносных бактерий. Уменьшение количества витамина в глубоких слоях сопровождается

Таблица 1
Содержание витамина В₁₂ в различных типах почв Армянской ССР (количество микробов в тыс./г почвы)

Почва, растительность, слой	Количество микроорганизмов			Витамин, В ₁₂ , мкг/кг	
	всего	в том числе			
		неспорозосных бактерий	бацилл	актиномицетов	
Бурая почва, кашня, пшеница, 0—10 см	1800	600	170	500	3,0
Чернозем, целина, травянистая растительность, 0—13 см	2600	120	300	700	3,2
Чернозем, целина, травянистая растительность, 13—39 см	2000	740	400	180	4,6
Чернозем, злаковые, 0—13 см	2400	1200	240	320	5,7
Лесная почва, 0—29 см	2800	1600	420	240	5,8
Горно-луговая почва, 0—11 см	1800	800	120	280	2,0
Горно-луговая почва, 11—30 см	1000	600	100	440	1,5
Горно-луговая почва, 50—89 см	800	200	100	220	0,5

Таблица 2
Состав микрофлоры и содержание витамина В₁₂ в бурых почвах Арташатского района, тыс. на г воздушно-сухой почвы

Ра зрезы	Слой почвы, см	Общее количество микроорганизмов	Всего бактерий	Всего актиномицетов	Аэробные спороносные бактерии					Содержание витамина В ₁₂ , мкг/кг
					Всего	Bac. subtilis-mesentericus	Bac. cereus	Bac. Idosus agglomeratus	Bac. megaterium	
24	0—34	1800	1000	590	200	20	60	60	20	3,0
	34—57	1400	700	400	200	10	20	40	100	1,0
	57—92	1200	200	560	300	10	120	40	80	0,7
	92—138	1400	300	680	240	20	20	20	50	0,04
27	0—23	2000	1000	320	460	60	30	60	240	4,0
	23—44	1600	700	440	400	40	80	120	50	2,0
	44—91	1400	1000	120	200	10	80	20	80	1,0
28	0—25	2400	1700	200	420	60	80	40	100	5,0
	25—53	1400	800	300	120	0	10	60	40	2,0
	53—101	1000	600	210	80	0	10	20	30	0,7

Примечание: нулевой показатель в этой и последующих таблицах указывает на содержание в почве менее 2 тыс. зародышей в 1 г.

соответствующим снижением количества микрофлоры. На глубине более 1 м витамин В₁₂ выявляется в количестве менее 1 мкг/кг, а в ряде случаев на 1—2 порядка ниже. Сопоставляя показатели по содержанию витамина В₁₂ с качественным составом микрофлоры, трудно сделать определенные заключения о наличии какой-то взаимосвязи между ними.

В отдельных случаях (например, образцы почвы разреза 24) отмечается почти одинаковое содержание актиномицетов в различных горизонтах. В этих образцах обнаруживается также высокое содержание бактерий вида *Bac. megaterium*, являющегося активным продуцентом витамина В₁₂. Однако содержание этого витамина не коррелирует с подобными изменениями в составе микрофлоры почвы. Видимо, в трактовке коррелятивной зависимости содержания витамина В₁₂ от состава микрофлоры почвы необходимо также исходить из экологии дефицитных по данному витамину микроорганизмов, что было с достоверностью показано в работах Локхиды [8]. С другой стороны, представленные в табл. 2 данные о распространении спороспособных бактерий отражают, особенно в глубинных слоях, содержание в почве спор, что, разумеется, не может быть показателем биологической активности этих организмов.

Табл. 3 обобщает выборочные данные анализов образцов почв по разным горизонтам, взятых из других районов Армянской ССР. Подобно ранее приведенным результатам, содержание витамина в большин-

Таблица 3
Содержание витамина В₁₂ в различных горизонтах почв (количество микробов, тыс./г почвы)

Тип почвы, район Армянской ССР	Слой почвы, см	Количество микроорганизмов				Витамин В ₁₂ , мкг/кг
		всего	количе- ство бак- терий	количе- ство ба- цилл	количе- ство ак- тиноми- цетов	
Бурая почва, целина, Наирыйский р-он	0—15	1400	1000	100	200	2,0
	15—35	1500	1000	50	400	2,0
	35—75	600	200	20	300	0,7
	0—16	2300	1000	160	1000	6,0
	16—37	1400	1100	50	200	3,0
	37—98	1000	600	60	300	2,0
	98—175	500	80	100	3000	2,0
	0—24	1800	1000	200	500	2,0
	24—50	1500	700	100	600	2,0
	50—90	500	10	50	300	1,0
90—124	300	100	50	100	1,0	
Бурая почва, целина, Аштаракский р-он	0—19	1400	600	60	800	2,0
	19—50	400	140	40	200	1,0
	70—135	100	100	20	50	0,3
	135—200	150	80	10	50	0,2
	0—22	1000	400	100	400	1,5
	22—44	500	100	50	300	0,2
	44—95	300	100	40	200	0,2
	95—165	200	50	10	100	0,1
Глинисто-бурая, целина	0—5	1700	1100	500	200	2,5
	5—15	2500	2000	300	100	2,5
	15—25	2000	1500	50	400	1,5
	25—50	1000	300	80	600	1,5

стве случаев сравнительно выше в верхних горизонтах. Однако в ряде случаев (например, в глинисто-бурой почве) этот витамин в нижеле-

жащих слоях почвы обнаруживается в довольно значительных количествах (1—1,5 мкг/кг), что, видимо, связано с вымыванием его из верхних горизонтов.

Нами были изучены образцы солончаков по различным горизонтам, сульфатно-хлоридного и карбонатно-хлоридного типов засоления. Как показали результаты исследований, витамин В₁₂ в этих почвах—по различным горизонтам—практически отсутствует. Что касается микрофлоры, то она представлена незначительным количеством микроорганизмов, в основном галофильными бактериями.

В специальной серии работ нами были изучены искусственные и природные лечебные грязи. Как известно, микрофлора лечебных грязей обстоятельно изучена многими авторами, и имеются указания о связи лечебного действия их с наличием ряда физиологически активных веществ микробного происхождения [6]. Данные анализов показали высокое содержание витамина В₁₂ в Ерванской и Джермуковской искусственных грязях, в то время как в Сакской и Тамбуканской грязях его количество было незначительным, соответственно 0,05 и 0,5 мкг/кг. Эти данные не могут служить основанием предполагать большую зависимость благотворного действия лечебных грязей от содержания в них витамина В₁₂.

Таким образом, содержание витамина В₁₂ отражает микробиологическую активность почвы и может быть индикатором богатства ее органическим веществом.

Институт микробиологии
АН Армянской ССР

Поступило 15. I 1981 г.

В₁₂ ՎԻՏԱՄԻՆԻ ՊԱՐՈՒՆԱԿՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀՈՂՈՒՄ

Ձ. Դ. ԱՎԱԿՅԱՆ, Է. Գ. ԱՖՐԻԿՅԱՆ

Հաստատված է, որ В₁₂ վիտամինը հայտնաբերվում է տարբեր տիպի հողերում զանազան քանակությամբ: Նրա պարունակությունը ուղիղ համեմատական է հողում օրգանական նյութի քանակին: Այս վիտամինի քանակությունն առավել է հողի վերին շերտում, ստորին շերտում այն նվազում է:

VITAMIN B₁₂ IN SOILS

Z. G. AVAKIAN, E. G. AFRIKIAN

Vitamin B₁₂ has been detected in various quantities in different types of soils. Its content in the soil is correlated with the concentration of organic substance and biological activity, particularly in superficial soil layer.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К., Бобикян Р. А., Авакян Э. Г. Микробиол. сб., II, 271, Ереван, 1961.
2. Африкян Э. Г., Бобикян Р. А. Тр. Ин-та микробиологии АН СССР, II, 341, 1961.

3. Звягинцев Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. М., 1973.
4. Красильников Н. А. Микроорганизмы почвы и высшие растения. М., 1958.
5. Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и плодородие почвы. М., 1956.
6. Новожилова М. И., Флорова Л. Ф. Микрофлора лечебных грязей Казахстана. Алма-Ата, 1975.
7. Овчаров К. Е. Витамины в жизни растений. М., 1955.
8. Lochead A. G. Bact. Revs., 22, 3, 145, 1958.
9. Schopfer W. Plants a. vitamins. Pull. Chron., Bot. Co, 1943.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ВЫРАЩИВАНИЯ НА
КАПСУЛООБРАЗОВАНИЕ У ДРОЖЖЕЙ

В. И. ГОЛУБЕВ, А. Р. МАНУКЯН, А. Н. ШКИДЧЕНКО

Капсулообразованию у *Cryptococcus magnus* var. *magnus* благоприятствуют слабокислые значения pH среды, повышенная аэрация и инкубирование при температуре, более низкой в сравнении с оптимальной для роста самого организма. Эти условия культивирования совпадают с рекомендуемыми для получения внеклеточных полисахаридов. Больших размеров капсулы формируются на плотной среде, чем в жидкой того же состава. Полученные данные рассматриваются как дополнительное подтверждение капсульного происхождения внеклеточных полисахаридов дрожжей и, следовательно, многостадийности процесса образования этих биополимеров.

Ключевые слова: дрожжи, капсулообразование.

Ряд микроорганизмов продуцирует внеклеточные полисахариды, представляющие практический интерес. Огромное разнообразие этих биополимеров обуславливает очень широкий спектр их применения. В качестве стабилизирующих, сгущающих и эмульгирующих агентов микробные полисахариды предложено использовать в пищевой, фармацевтической, текстильной, бумажной, химической и нефтедобывающей промышленности [3].

Среди активных продуцентов внеклеточных полисахаридов имеется значительное число дрожжевых и дрожжеподобных грибов, относящихся к капсулообразующим организмам. Последнее обстоятельство, а также сходство по моносахаридному составу [4] указывают на то, что внеклеточные полисахариды—продукт растворения в культуральной жидкости полисахаридов капсулы. Этап капсулообразования, следовательно, является ключевым при получении внеклеточных полисахаридов дрожжей и заслуживает всестороннего изучения.

Недавно нами были представлены данные о влиянии состава среды на формирование капсул [3]. В настоящей работе приводятся результаты изучения влияния условий выращивания: температуры инкубирования, уровня аэрации, значений pH и консистенции среды. Полученные данные сопоставляются с результатами аналогичных исследований по изучению образования дрожжами внеклеточных полисахаридов.

Материал и методика. В опытах использованы дрожжи *Cryptococcus magnus*, var. *magnus*, шт. 637. Состав среды (г/л дистилл. воды): манноза—30,0 пептон—2,0, KH_2PO_4 —2,0, MgSO_4 —0,01, CaCl_2 —0,01, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ —0,015, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —0,0015, FeSO_4 —0,03, дрожжевой экстракт—1,0. Нужные значения pH среды устанавливали с помощью 1N растворов HCl и NaOH. Для предотвращения пенообразования добавля-

ли олеиновую кислоту (0.01 мл/100 мл среды). В качестве инокулята брали односуточные культуры, выращенные в 500-миллиметровых колбах со 100 мл указанной среды на качалке /200 об./мин. 24°. Количество инокулята, способы измерения роста, толщины капсулы /в начале стационарной фазы/, результаты статистической обработки данных приведены ранее [3]. При изучении влияния значений рН среды, аэрации периодическое культивирование дрожжей проводили в аппаратах АНКУМ-2 при поддержании необходимых параметров на требуемом постоянном уровне. Концентрацию растворенного в среде кислорода измеряли с помощью мембранного электрода Кларка. При изучении зависимости удельной скорости роста культуры от температуры инкубации использован турбидостатный способ культивирования [9]. Концентрация клеток при этом поддерживалась на постоянном, достаточно низком уровне, рост не был лимитирован компонентами питательной среды, а скорость потока последней была численно равна удельной скорости роста. Дыхательную активность определяли динамическим способом [10] и выражали в обратных относительных единицах [7]. Используя плотные среды при изучении действия температуры инкубации на капсулообразование, сравнивали между собой культуры, накопившие такую же биомассу, как и 3-суточные культуры при 24°. Гипсовые блоки готовили общепринятым способом [1].

Результаты и обсуждение. Предварительные наблюдения показали, что очень низкие или высокие значения рН среды неблагоприятны как для роста исследованных дрожжей, так и капсулообразования. Дальнейшие эксперименты поэтому были ограничены диапазоном рН от 5 до 8. В разных вариантах этих опытов—культивирование в колбах на качалке при различных начальных значениях рН среды, в ферментерах при поддержании рН на заданном уровне, при температурах инкубации 20° и 24°—максимальные средние размеры капсул наблюдались при рН 6 (рис. 1). Несколько меньше они были при рН 5, а при нейтральном

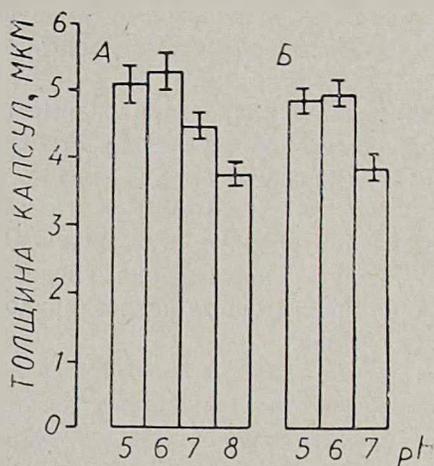


Рис. 1. Влияние рН среды на размеры капсул у *St. magnus var. magnus*, штамм 637. А—культивирование в 500-миллилитровых колбах со 100 мл среды на качалке при различных исходных значениях рН, 24°. Б—культивирование в аппаратах АНКУМ-2 при поддержании постоянных значений рН среды, рО₂ 70–90%, 20°. Риски указывают доверительные границы средней арифметической при $\beta = 0,95$.

и слабощелочном значениях толщина капсул уменьшалась значительно, хотя, судя по конечной оптической плотности суспензии, они отрицательно не влияли на рост культур. Концентрации клеточных суспензий при рН 7 и 8 достигали таких же величин или даже несколько более высоких, чем при рН 6, т. е. оптимальные значения рН среды или диапазон их различны для капсулообразования и роста самого продуцента.

Как и при капсулообразовании, наибольшее накопление внеклеточных полисахаридов дрожжами также отмечается при слабокислых значениях рН среды (от 4,5 до 6,8), чаще всего—около 6,0 [8, 11, 15, 12, 14]. Этим данным противоречит лишь сообщение Залашко и Пидопличко [6] о максимальном выходе полисахаридов у *Rhodotorula glutinis* при весьма низких значениях рН среды (2,0—2,5). Последнее трудно объяснить спецификой вида или штамма, поскольку данные других исследователей получены при изучении очень разных по своему происхождению и таксономическому положению дрожжевых организмов.

Как и на образование внеклеточных полисахаридов [8, 11, 2], на формирование капсул положительно влияет повышение аэрации среды. Зависимость, по-видимому, выражена больше, чем это явствует из данных табл. 1, поскольку с повышением вязкости среды для поддержания

Таблица 1
Влияние парциального давления растворенного кислорода (pO_2) в среде на капсулообразование у *Sg. magnus* var. *magnus*, шт. 637 (АНКУМ-2, 20°, рН 6,0)

pO_2 , %	Толщина капсул, мкм	
	$M \pm \Delta$	σ
5—15	4,5 \pm 0,2	0,8
45—55	4,7 \pm 0,1	0,7
80—90	5,1 \pm 0,2	0,8

Обозначения: M —средняя арифметическая, Δ —доверительные границы при $\beta = 0,95$, σ —среднее квадратическое отклонение.

высоких значений pO_2 , помимо увеличения подачи воздуха, нам приходилось увеличивать и число оборотов мешалки. Это, очевидно, интенсифицировало процесс растворения капсульного материала и, таким образом, нивелировало различия в размерах капсул. При всех уровнях аэрации среды конечная оптическая плотность культур достигала одинаковых величин.

Наиболее крупные капсулы у *Sg. magnus* var. *magnus* формируются при температуре инкубации 20° (рис. 2). С понижением температуры, вплоть до 5°, размеры их уменьшаются незначительно, в отличие от действия повышенных температур. При всех температурах инкубации, за исключением 30°, при которой рост был очень скудный, концентрации клеточных суспензий, достигших стационарной фазы роста, существенно не различались между собой. Судя по удельной скорости роста, дыхательной активности, для развития исследованных дрожжей оптимальной является температура 27° (рис. 3), что на 7° выше найденной оптимальной для образования капсул. Таким образом, мы вновь констатируем существенные различия между условиями, наиболее благоприятными для роста самого организма и максимально стимулирующими об-

разование капсул. Выход знеклеточных полисахаридов также значительно выше при пониженных температурах культивирования [11, 15, 6].

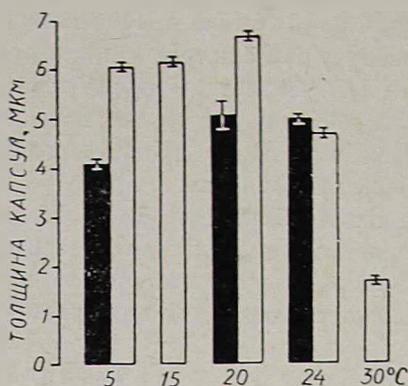


Рис. 2.

Рис. 2. Влияние температуры инкубации на размеры капсул у *St. magnus* var. *magnus*, шт. 637. Черные столбики—культивирование в жидкой среде, как указано на рис. 1А, рН 6,0, белые—культивированные на агаризованной среде, рН 6,0.

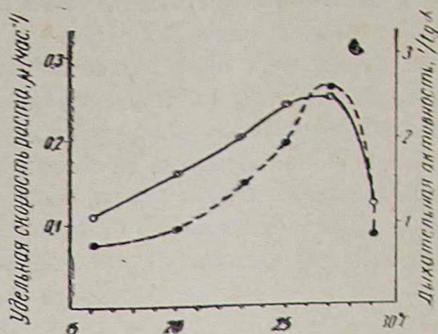


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость удельной скорости роста (—) и дыхательной активности (---) дрожжей *St. magnus* var. *magnus*, шт. 637 от температуры культивирования.

Данные, представленные на рис. 2, показывают заметные различия в размерах капсул в зависимости от консистенции среды, что побудило нас провести дополнительные опыты в этом направлении. В качестве контроля в них служили культуры, выращенные в тонком слое (не более 5 мм) жидкой среды в чашках Петри. Эти эксперименты подтвердили, что на плотных средах независимо от характера их поверхности, капсулы гораздо толще, чем при росте в жидкой среде того же состава (табл. 2). Эти различия не могут быть объяснены разницей в степени

Таблица 2

Размеры капсул у *St. magnus* var. *magnus*, шт. 637 при росте в жидкой и на плотных средах (6-суточные культуры, 24°, рН 6,0)

Консистенция среды	Толщина капсул, мкм	
	$M \pm \Delta$	σ
Жидкая	$4,0 \pm 0,1$	1,1
Агаризованная (2% агара)	$5,4 \pm 0,1$	1,1
Агаризованная, покрытая целлофаном	$5,6 \pm 0,1$	1,4
Гипсовые блоки	$6,2 \pm 0,1$	1,4

Обозначения см. табл. 1.

азрации, поскольку слой жидкой среды был незначительный и, кроме того, многие клетки развивались прямо на поверхности ее. В некоторой степени они могут быть обусловлены тем, что капсульный материал на плотных средах не растворялся. Однако мы склонны скорее полагать, что именно плотная консистенция среды стимулирует капсулообразование, хотя механизм такого действия мы объяснить затрудняемся.

Постоянно подчеркиваемое нами выше сходство не только в общем характере зависимости образования капсул и внеклеточных полисахаридов от условий культивирования, но даже и по абсолютным значениям (в частности, температуры инкубирования, рН среды) дополнительно свидетельствует о капсульном происхождении внеклеточных полисахаридов дрожжей. Эта общность не ограничивается условиями выращивания, она касается и состава сред: как для капсулообразования, так и наработки полисахаридов наиболее стимулирующие источники углерода, азота, их концентрации одинаковы [2, 5, 11, 15].

Таким образом, процесс образования дрожжами внеклеточных полисахаридов состоит из нескольких разных этапов: размножения, роста самого продуцента, образования им капсул и отделения, растворения капсульного материала в среде. Результаты настоящей работы показывают, что имеются значительные различия между условиями культивирования, оптимальными для первого и второго этапов. В этом отношении, несомненно, отличается и стадия отделения капсульных веществ, механизм которой пока совершенно не исследован.

В имеющихся работах по подбору условий культивирования в целях получения микробных полисахаридов не учитывается многостадийность этого процесса, без учета которого подобранные условия являются лишь усредненными между оптимальными для каждого из этапов. Дифференциация их, несомненно, способствовала бы резкому повышению эффективности процесса получения внеклеточных полисахаридов микроорганизмов.

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР,

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 15.XI 1980 г.

ԱՃՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԱՊԱՌԻԱՎՈՐՄԱՆ ՎՐԱ ԽՄՈՐԱՍՆԿԵՐԻ ՄՈՏ

Վ. Բ. ԳՈՒՐԵԿ, Ա. Բ. ՄՆՆՈՒԿՅԱՆ, Ա. Ն. ՇԿԻՏՉԵԿՈ

Cryptococcus magnus var. *magnus* խմորասնկերի կապսուլավորմանը նպաստում են միջավայրի թույլ թթվային pH-ը, ուժեղ աերացիան և այդ օրգանիզմի օպտիմալ աճին նպաստողից ավելի ցածր ջերմաստիճանը: Կուլտիվացման այդ պայմանները համընկնում են արտաբջջային պոլիշաքարների առաջացման համար առաջարկվող պայմաններին: Պինդ միջավայրում ավելի մեծ չափսերով կապսուլաներ են առաջանում, քան այդ նույն բաղադրությամբ հեղուկ միջավայրում: Ստացված տվյալները համարվում են լրա-

ցուցիչ հաստատում տվյալ խմորասնկերի մոտ արտաբջջային պոլիշաքարների կապսուլային ծագման և, հետևաբար, այդ բիոպոլիմերների առաջացման բազմաստիճանային պրոցեսին:

EFFECT OF GROWTH CONDITIONS ON CAPSULE FORMATION OF YEAST

W. I. GOLUBEV, A. R. MANUKIAN, A. N. SHKIDCHENKO

Slightly acid pH, high aeration and lower than optimal for the growth of organism incubation temperature promote capsule formation in *Cryptococcus magnus* var. *magnus*. These cultivation conditions coincide with the recommended ones for the elaboration of extracellular polysaccharides by yeasts. Capsule sizes are larger on a solid medium than in the same liquid one. Obtained data are regarded as additional corroboration of capsular origin of yeast extracellular polysaccharides and, therefore, the course of these biopolymer production is multistage.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бабьева И. П., Голубев В. И. Методы выделения и идентификации дрожжей. 40, М., 1979.
2. Голубев В. И. Научные докл. высш. школы (биол. науки). 1, 89, 1972.
3. Голубев В. И., Манукян А. Р. Микробиология 48, 314, 1979.
4. Голубев В. И., Свиридов А. Ф., Бабьева И. П. Микробиология. 48, 610, 1971.
5. Елинов Н. П., Гобаши А. М., Зайкина Н. А. Микология и фитопатология, 9, 397, 1975.
6. Залашко М. В., Пидопличко Г. А. Микробиология, 43, 245, 1974.
7. Чигалейчик А. Г., Шкидченко А. Н., Пирева Д. А. Прикл. бнохим. микробиол., 14, 527, 1978.
8. Anderson R. F., Cadmus M. C., Benedict R. G., Stodki M. E. Arch. Biochem. Biophys., 89, 289, 1960.
9. Anderson R. A. Rev. Sci. Instr., 27, 48, 1956.
10. Bandjopadhyay B., Humfrey A. E., Taguchi H. Biotechnol. Bioengineering, 9, 533, 1967.
11. Cadmus M. C., Lagoda A. A., Anderson R. F. Appl. Microbiol., 10, 153, 1962.
12. Catley B. J. Appl. Microbiol., 22, 650, 1971.
13. Margaritis A., Zajic V. E. Biotechnol. Bioengineering, 20, 939, 1978.
14. Ono K., Yasuda N., Ueda S. Agric. Biol. Chem., 41, 2113, 1977.
15. Ueda S., Fujita K., Komatsu K., Nakashima Z. Appl. Microbiol., 11, 211, 1963.

ВЛИЯНИЕ ПАРЦИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ РАСТВОРЕННОГО КИСЛОРОДА НА КУЛЬТИВИРОВАНИЕ *BACILLUS* *THURINGIENSIS*

Е. Н. АРЗУМАНОВ

Исследовано влияние pO_2 на экспоненциальный рост и спорообразование *Bacillus thuringiensis*.

Установлено, что снижение уровня pO_2 до 15 мм рт. ст. практически не изменяет среднюю удельную скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток в фазе экспоненциального роста, в то время как при дальнейшем снижении его резко увеличивается выделение уксусной кислоты в среду, снижается средняя удельная скорость потребления кислорода и, как следствие, уменьшается максимальный титр вегетативных клеток.

В фазе замедления роста и спорообразования уменьшение pO_2 до 15 мм рт. ст. не влияет на спорообразование и образование кристаллоидных токсинов.

Определен критический уровень pO_2 для всего процесса культивирования *Bac. thuringiensis*, составляющий не более 15 мм рт. ст.

Ключевые слова: *Bac. thuringiensis*, инсектицидная активность.

Снабжение микроорганизмов кислородом в аэробных процессах является важнейшей задачей при разработке управляемого биосинтеза, так как уровень парциального давления растворенного кислорода (pO_2) в среде влияет как на скорость роста, так и на метаболизм микроорганизмов [5]. Кислород мало растворим в водных средах и естественно, что при высоких скоростях потребления его микроорганизмами может стать лимитирующим субстратом, вызывая тем самым изменения в биосинтетических процессах [4].

Шеррер с сотр. обнаружил изменение размеров и удельной активности инсектицидных кристаллов в зависимости от степени аэрации при культивировании *Bac. thuringiensis* [7]. Однако данный вывод сделан качественно, так как в работе не содержится сведений об уровнях растворенного в культуральной жидкости (кж) кислорода.

Целью настоящей работы являлось исследование влияния парциального давления растворенного кислорода на титр спор и значения инсектицидной активности кж в процессах культивирования *Bac. thuringiensis*.

Материал и методика. Использован штамм 69—6 *Bac. thuringiensis* var. *galleriae*, который культивировали на питательной среде, содержащей кукурузный экстракт и техническую глюкозу. В качестве посевного материала использовали 72-часовой илюклят спор, выращенный на агаризованной среде.

Работа проводилась на лабораторных установках типа АК—10—1, оснащенных дополнительно датчиками и централизованным щитом контроля и регулирования следующих физических и физико-химических параметров процесса культивирования: давление в аппарате, скорость вращения мешалки, расход воздуха на аэрацию, температура, pO_2 , pH, а также концентрации O_2 и CO_2 в отходящих газах [1].

pO_2 в кж контролировали с помощью полярографического датчика кислорода собственной конструкции [2].

Методы определения углеводов, аминного азота, концентрации уксусной кислоты, титра микроорганизмов и состояния культуры описаны ранее [3].

Летальную концентрацию кж /ЛК₅₀/ определяли в конце процесса на личинках восковой моли *Galleria mellonella* L., выращенных на искусственном корме с применением системы пробитов согласно ТУ 59—61—74.

За инсектицидную активность (ИА) принимали 1/ЛК₅₀ (1%).

Питательные среды готовились с постоянными концентрациями общих углеводов, 1200 мг%, и аминного азота, 15 мг%, температура ферментации поддерживалась 30±0,2°, объем кж составлял 5 л.

В данной серии экспериментов в фазе экспоненциального роста, а также замедления роста и спорообразования, pO_2 стабилизировали на планируемых уровнях автоматически путем изменения расхода воздуха /2—20 л/мин/ и скорости вращения мешалки /200—800 об/мин/.

В связи с тем, что в лаг-фазе создание уровня pO_2 ниже 155 мм рт. ст. затруднено из-за отсутствия потребления кислорода микроорганизмами, стабилизировали минимальные значения расхода воздуха /2 л/мин/ и скорости вращения мешалки /200 об/мин/.

Были рассмотрены следующие параметры процесса культивирования: Y_1 —инсектицидная активность кж (1%), Y_2 —титр спор, млрд. ед./мл; Y_3 —максимальный титр вегетативных клеток, млрд. ед./мл; Y_4 —экономический коэффициент по глюкозе, потребленной до образования максимального титра вегетативных клеток, $\frac{\text{млрд. ед.}}{\text{мл мг \%}}$;

Y_5 —средняя удельная скорость потребления кислорода в фазе экспоненциального роста, $\frac{\text{л мл}}{\text{час млрд. ед.}}$; Y_6 —максимальная концентрация уксусной кислоты в кж в фазе экспоненциального роста, мг%;

Y_7 —процент лизиса клеток в фазе спорообразования, %; Y_8 —удельная инсектицидная активность кж, $\frac{\text{мл}}{\% \text{ млрд. ед.}}$.

Результаты и обсуждение. Как видно из таблицы, уменьшение pO_2 до 15 мм рт. ст. в фазе экспоненциального роста практически не влияло на среднюю удельную скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток. Изменялся лишь экономический коэффициент по глюкозе, потребленной до максимального титра вегетативных клеток за счет увеличения скорости потребления углеводов. В резуль-

Т а б л и ц а
Динамика параметров процесса культивирования при различных значениях pO_2 в среде

Фаза экспоненциального роста					Фаза замедления роста и спорообразования				
pO_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6	pO_2	Y_7	Y_8	Y_1	Y_2
120	2,4	0,055	1,62	52	<15	33,4	0,125	0,2	1,6
75	2,3	0,0046	1,58	61	15	4,4	0,59	1,3	2,2
15	2,3	0,0027	1,53	68	75	0	0,63	1,45	2,3
<15	1,4	0,0015	0,43	135	120	0	0,23	0,32	1,4
15	2,2	0,0029	1,51	60	15	0	0,61	1,35	2,2

тате, если при pO_2 , равном 120 мм рт. ст. в конце процесса, в кж оставалось около 700 мг% углеводов, которые можно использовать повторно при приготовлении питательной среды, то при pO_2 , менее 15 мм рт. ст., остаток углеводов в кж сводился к нулю. Таким образом, снижение уровня pO_2 приводило к экономически менее выгодному использованию углеводов микроорганизмами.

При значении pO_2 ниже 15 мм рт. ст. в фазе экспоненциального роста снижалась средняя удельная скорость потребления кислорода и увеличивалось выделение микроорганизмами уксусной кислоты в среду. Это указывает на преобладание в условиях недостатка кислорода анаэробного метаболизма, который не в состоянии обеспечить энергией делящиеся клетки, следствием чего является падение максимального титра вегетативных клеток. При глубокой лимитации по растворенному кислороду, в результате увеличения выделения уксусной кислоты в среду и, соответственно, понижения рН до значений ниже 5, прекращается рост микроорганизмов, или, как говорят, процесс «закисает».

Значение pO_2 , равное 15 мм рт. ст., является наименьшим, при котором сохраняются средняя удельная скорость потребления кислорода и максимальный титр вегетативных клеток. Следовательно, это значение pO_2 в фазе экспоненциального роста является критическим.

Уменьшение экономического коэффициента по глюкозе при понижении pO_2 до критического уровня, вероятно, является специфическим свойством *Bac. thuringiensis*, для объяснения которого необходимы дополнительные исследования.

Фаза замедления роста и спорообразования характеризуется при культивировании *Bac. thuringiensis* продолжением активного функционирования цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), через глиоксилатный шунт которого утилизируется уксусная кислота [6]. В этих фазах в результате вторичного метаболизма в клетках синтезируется кристаллоподобный токсин. При pO_2 ниже 15 мм рт. ст. уксусная кислота слабо потребляется микроорганизмами, вследствие чего рН практически не повышается. При этом затягивается спорообразование, что приводит к понижению титра спор по отношению к максимальному титру вегетативных клеток. Ухудшаются также и условия синтеза кристаллоподобных токсинов, о чем свидетельствует понижение удельной инсектицидной активности кж. Повышение уровня pO_2 выше 15 мм рт. ст. в фазе замедления роста и спорообразования не сказывается на значении инсектицидной активности.

Из изложенного следует, что значение pO_2 , равное 15 мм рт. ст. и более, в фазе замедления роста и спорообразования обеспечивает благоприятные условия для протекания процессов спорообразования и синтеза кристаллоподобных токсинов.

Значение pO_2 , ниже критического, в фазе экспоненциального роста приводит к снижению максимального титра вегетативных клеток и в дальнейшем титра спор, что отрицательно сказывается на величине инсектицидной активности кж. В этом случае, несмотря на нормальные

условия по pO_2 в период вторичного метаболизма, удельная инсектицидная активность кж уменьшается. Вероятно, ослабленные из-за недостатка кислорода в этой фазе, клетки частично теряют способность синтезировать кристаллоподобные токсины в последующих фазах.

Таким образом, критическое значение парциального давления растворенного кислорода для всего процесса культивирования составляет не более 15 мм рт. ст. Данный критический уровень pO_2 обеспечивает нормальное протекание первичного и вторичного метаболизма и, как следствие, наибольшие в исследуемой области значения титра спор и инсектицидной активности кж. Контрольный опыт подтвердил достоверность данного вывода.

Институт микробиологии АН Армянской ССР.
Всесоюзный научно-исследовательский и проектный
институт «Промавтоматика»

Поступило 11.XI 1980 г.

ԼՈՒՄՎԱՐ ԹԹՎԱՆՆԻ ՊԱՐՑԻԱԿ ՆՆՇՄԱՆ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ BACILLUS THURINGIENSIS-Ի ԿՈՒՆՏԻԿԱՑՄԱՆ ՎՐԱ

Ե. Ն. ԱՐՋՈՒՄԱՆՈՎ

Ուսումնասիրվել է pO_2 ազդեցությունը *Bac. thuringiensis*-ի աճի, սպոր
և բյուսեղառաջացման վրա: Որոշված է, որ pO_2 -ի կրիտիկական մակարդակը
Bac. thuringiensis-ի կուլտիվացման ողջ պրոցեսի ճամար պետք է լինի pO_2
սնդիկի սյան 15 մմ-ից ոչ ավելին:

INFLUENCE OF PARTIAL PRESSURE OF DISSOLVED OXYGEN ON THE CULTIVATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS*

E. N. ARZUMANOV

The influence of pO_2 on the growth, spore and crystal formation of *Bac. thuringiensis* has been investigated. The critical level of pO_2 for all processes of cultivation has been determined to be no more than 15 mm of mercury.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Арзуманов Е. Н., Насиров М. К., Бабамян А. В., Опришко А. А., Кантере В. М. В сб. Биотехнология и биоинженерия, 3, 10, Рига 1978.
2. Арзуманов Е. Н., Педобержан В. Е., Опришко А. А., Бабамян А. В., Кантере В. М. Авт. свид. СССР № 640199, Бюлл. изобретений, 48, 1978.
3. Арзуманов Е. Н. Микробиология, 1, 65, 1979.
4. Перт С. Основы культивирования микроорганизмов и клеток. 105, М., 1978.
5. Brooks R. Process Biochemistry, 4, 27, 1969.
6. Hanson R. S., Srinivason V. R. a. Halvorson H. O. J. Bacteriol., 86, 45, 1963.
7. Scherrer P., Lüthy P., Trumpl B. Appl. microbiology, 27, 614, 1973.

О НЕКОТОРЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НИТРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ АЗОТОБАКТЕРА АЦЕТИЛЕНОВЫМ МЕТОДОМ

В. Г. НИКОГОСЯН

Определялась нитрогеназная активность *Az. chroococcum* ацетиленовым методом, связанная с условиями и продолжительностью развития.

Показано, что наивысшая нитрогеназная активность у азотобактера, выращенного на среде Виноградского, проявляется в ранней логарифмической фазе. При длительном культивировании в газовой атмосфере она частично обусловлена наличием определенных количеств этилена в среде.

Ключевые слова: азотобактер, нитрогеназная активность.

В настоящее время для определения активности азотфиксации широко применяется ацетиленовый метод, теоретические основы и возможность применения которого для определения активности азотфиксации разными объектами представлены в ряде работ [1—5, 7, 12, 14—16]. Для определения азотфиксирующей активности указанным методом культуры инкубируются в присутствии ацетилена на жидкой или твердой питательной средах в герметически закрытых сосудах и периодически устанавливается количество образовавшегося этилена [6, 7, 10]. В ряде случаев ацетилен вводится в определенные периоды развития культуры [8].

Одновременно отметим, что в настоящее время у аэробных бактерий все еще недостаточно исследованы динамика нитрогеназной активности в процессе их развития, а также влияние на нее различных газов и густоты посева.

В настоящей работе мы задались целью исследовать влияние указанных факторов на нитрогеназную активность азотобактера, определяемую ацетиленовым методом.

Материал и методика. Исследования проводились на полученных нами стрептомициноустойчивых (С-5, С-6, С-20) и тетрациклинустойчивых (Т-3, Т-6, Т-16) мутантах и на исходном штамме *Az. chroococcum* 53 (НИИ сельхоз. микробиология, К-1).

Культуры выращивались при 27° на агаризованной среде Виноградского (3 мл) в 15 мл пенициллиновых флаконах. В определенный период развития воздух во флаконах заменялся смесью газов, состоящей из аргона (70), кислорода (20) и ацетилена (10%). В отдельных опытах за счет уменьшения количества аргона и кислорода в газовую смесь вводили этилен (1—8%).

Для исследования нитрогеназной активности в процессе роста культуры выращивались в 6-ти флаконах в течение 4, 24, 48, 72, 96 и 168 ч. По истечении этих сроков во

флаконы вводилась смесь газов, и после одночасовой инкубации определялась активность фермента. Количество образовавшегося этилена определяли в 0,5 мл образца смеси газов на газовом хроматографе «цвет» модели 4—67 с пламенноионизационным детектором. В колонке (60 см×0,3 см)—окись алюминия, обработанная щелочью при 50°. Температура испарителя 85°. Скорость газ-носителя (гелий) 40 мл/мин. Активность нитрогеназы выражали по восстановленному ацетилену (мкмоль/час) [9].

В качестве контроля служили флаконы с питательной средой и соответствующей смесью газов.

Результаты и обсуждение. Исследования динамики нитрогеназной активности азотобактера показали, что нитрогеназная активность проявляется спустя четыре часа после инокуляции и достигает максимума на 2—3-й день. Далее начинается быстрый спад активности фермента (табл. 1).

Таблица 1
Динамика нитрогеназной активности *Az. chroococcum* в процессе развития.
мкмоль C_2H_2 /час

Культуры	Возраст культуры, ч					
	4	24	48	72	96	168
С—20	0,10	0,90	1,65	2,55	1,10	0,40
С—6	0,25	1,80	1,75	1,30	1,20	0,45
С—5	0,15	1,42	1,35	1,90	1,35	0,50
Т—6	0,10	1,15	1,05	1,55	0,40	0,15
Т—16	0,23	0,60	1,75	2,10	1,00	0,27
Г—3	0,27	0,93	1,50	1,35	1,25	0,17
К—1	0,40	2,20	2,45	2,40	0,90	0,10

Опыты показали, что между нитрогеназной активностью, титром живых клеток и биомассой азотобактера нет коррелятивной зависимости (рис. 1).

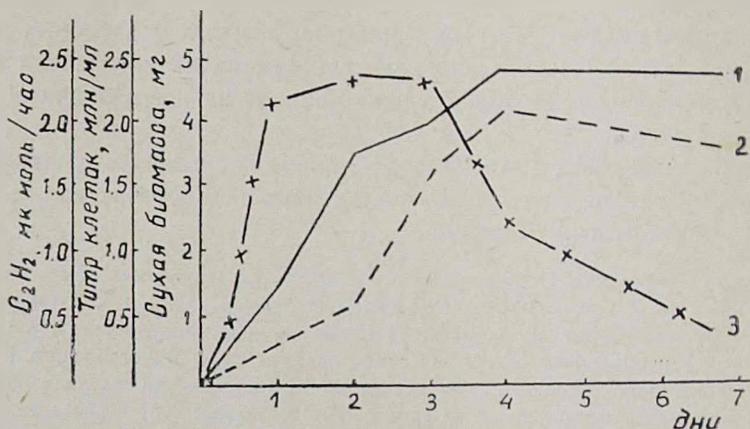


Рис. 1. Динамика накопления биомассы, титра живых клеток и нитрогеназной активности *Az. chroococcum* (К-1) в процессе развития. 1— сухой вес биомассы, 2— титр живых клеток, 3— нитрогеназная активность.

Азотфиксирующая активность достигает максимума в ранней логарифмической фазе роста культуры и в дальнейшем, с увеличением количества биомассы, клетки азотобактера значительно теряют нитрогеназную активность.

Интересно было выяснить и динамику нитрогеназной активности азотобактера в процессе длительного развития в газовой смеси. Проведенные нами исследования показали, что в присутствии ацетилена и других газов нитрогеназная активность растет, достигая максимума в 24-часовой культуре (рис. 2). При дальнейшем развитии в этих усло-

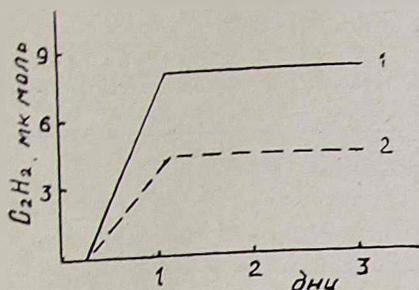


Рис. 2. Нитрогеназная активность *Az. chroococcum* при длительном развитии в газовой атмосфере. 1 — К; 2 — С-20

виях восстановления ацетилена не наблюдается, хотя предыдущими опытами (табл. 1) было показано, что у азотобактера наивысшая нитрогеназная активность обнаруживается на 2—3-й день. Вероятно, это можно объяснить отсутствием необходимого количества азота (N_2) для роста азотобактера, а также отрицательным воздействием смеси газов на нормальное развитие культуры.

В литературе имеются указания на то, что ацетилен ингибирует развитие микроорганизмов и, следовательно, в аналогичных экспериментах следует избегать сравнительно высоких концентраций ацетилена в газовой смеси [10]. Одновременно известно, что в ряде случаев продукты ферментативной реакции способны подавлять активность данного фермента.

В связи с этим было интересно выяснить влияние различных доз этилена на активность ферментного комплекса.

Нами выявлено, что незначительные концентрации этилена (1%), введенного в газовую среду, отрицательно действуют на нитрогеназную активность азотобактера (табл. 2).

Таблица 2
Влияние этилена на нитрогеназную активность *Az. chroococcum* в процессе развития.

Количество этилена, %	Количество восстановленного ацетилена, мкмоль, спустя	
	3 ч	24 ч
Контроль (без этилена)	6,10	13,10
1	6,10	10,50
2	5,15	6,80
4	3,30	5,00
8	2,80	3,00

При определении нитрогеназной активности ацетиленовым методом культуру обычно сеют густым штрихом [1].

В задачу наших исследований входило также выяснение оптимального периода для определения активности фермента в зависимости от количества посевного материала.

Исследования показали, что при внесении большого количества посевного материала, активность нитрогеназы выше у однодневных культур, а при внесении незначительного количества—у трех-, четырехдневных. Очевидно также, что независимо от количества посевного материала нитрогеназная активность на вторые сутки почти выравнивается (табл. 3).

Таблица 3
Зависимость нитрогеназной активности *Az. chroococcum* от количества посевного материала, мкмоль C_2H_2 /час

Густота посева	Возраст культуры, ч				
	2	24	48	72	96
Густой штрих	0,95	2,50	2,50	1,20	0,60
Умеренный штрих	0,45	1,75	2,80	1,45	0,80
Средний штрих	0,28	2,15	2,65	1,35	0,80
Слабый штрих	0,18	0,80	1,80	2,65	2,35
Незначительный штрих	0,15	1,05	2,55	2,90	1,80

Таким образом, проведенные исследования показывают, что нитрогеназная активность *Az. chroococcum* на среде Виноградского характеризуется одновершинной кривой, максимум которой совпадает с ранней логарифмической фазой и не коррелирует с ростом биомассы и титром живых клеток. Уровень азотфиксирующей активности в значительной степени зависит от продолжительности инкубации культуры в газовой атмосфере, содержащей различное количество этилена. Определение нитрогеназной активности на среде Виноградского ацетиленовым методом целесообразно проводить на второй день роста культуры, сокращая время инкубации в газовой смеси.

Отметим также, что при исследовании нитрогеназной активности азотобактера, выращенного на других питательных средах указанным методом, следует учитывать особенности развития культуры и динамику активности фермента.

Институт микробиологии
АН Армянской ССР

Поступило 18. XII. 1980 г.

ԱՅԵՏԻԼԵՆԱՅԻՆ ԵԳԱՆԱԿՈՎ ԱԶՈՏՈՐՖԱՅՆՔԻ
ՆԻՏՐՈԳԵՆԱԶԱՅԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՈՐՈՇՄԱՆ ՄԱՍԻՆ

Վ. Գ. ՆԿՈՂՈՍՅԱՆ

Ուսումնասիրվել են ացետիլենային եղանակով *Az. chroococcum*-ի նիտրոգենազային ակտիվության որոշման մի շարք հարցեր՝ կապված կուլտուրայի զարգացման տեղումային և սլայմանների հետ:

Պարզվել է, որ Վինոգրադսկու սննդամիջավայրում զարգանալիս աշոտարակտերի նիտրոգենազային ակտիվությունը մեծ է վաղ լոգարիթմական ֆազայում:

Այդտիպի նյարունակող միջավայրում, երկարատև զարգացման ընթացքում, *Az. chroococcum*-ի նիտրոգենազային ակտիվությունը մասամբ պայմանավորված է նաև զազային մթնոլորտում առկա էթիլենի քանակությամբ:

ON SOME PECULIARITIES OF DETERMINATION OF NITROGENASE ACTIVITY OF AZOTOBACTER BY ACETYLENOUS METHOD

V. G. NIKOGHOSIAN

Some questions on determination of nitrogenase activity of *Az. chroococcum* by acetylenous method connected with conditions and duration of development have been studied. It has been shown that the highest nitrogenase activity in azotobacter, grown on a medium of Vinogradski is displayed at early logarithmic phase.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гочелашвили З. А. Микробиология, 47, 5, 1979.
2. Егоров В. И. Микробиология, 48, 3, 1979.
3. Зубко И. К., Чундерова А. И., Тациев С. С. Гр. конф. Микробиолог. процессы в почвах и урожай с.-х. культур, Каунас, 1978.
4. Зубко И. К., Серегин М. С., Чундерова А. И., Тациев С. С. Микробиология, 48, 1, 1979.
5. Калининская Т. А., РАО В. Р., Волкова Т. Н., Ипполитов Л. Т. Микробиология, 42, 3, 1973.
6. Конопков Ф. П., Умаров М. М., Мирчинк Т. Г. Микробиология, 48, 4, 1979.
7. Метод. рекоменд. по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценке их эффективности. Л., 1979.
8. Назина Т. Н., Розанова Е. П., Калининская Т. А. Микробиология, 48, 1, 1979.
9. Парийская А. И., Калининская Т. А. Микробиология, 46, 1, 1977.
10. Умаров М. М. Почвоведение, 11, 1976.
11. Феодоров М. В. Биолог. фиксация азота атмосферы, М., 1952.
12. Феодоров Р. И., Милехина Е. И., Ильюхина Н. И., Бралиников В. В. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 1973.
13. Bulen W. A., Le Comte J. R., Bales H. E. J. Bacteriol., 85, 3, 1963.
14. Campbell N. E. R., Evans H. J. Canadian J. Microbiol., 15, 1342, 1969.
15. Hardy R. W., Holsten R. D., Jackson E. K., Burns R. C. Plant Physiol., 43, 1185, 1968.
6. Hardy R. W., Burns R. C., Holsten R. D. Soil. Biol. and Biochem., 5, 47, 1973.

ВЛИЯНИЕ МЕДА, САХАРНОГО СИРОПА И ПАСТЕРИЗАЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ПОЛУСИНТЕТИЧЕСКИХ АНТИБИОТИКОВ

З. М. АКОПЯН, Г. А. ШАКАРЯН

Установлено, что под действием меда и сахарного сиропа активность полусинтетических антибиотиков метациклина, оксациллина и диклоксациллина снижается. После пастеризации мед не полностью обезвреживается от метациклина, оксациллина и диклоксациллина.

Ключевые слова: антибиотики, мед, сахарный сироп, концентрация.

Наличие антибиотиков в пищевых продуктах, в частности в продуктах животного происхождения, может вызвать ряд нежелательных явлений в организме человека: повышение чувствительности макроорганизма к антибиотикам, нарушение нормальной микрофлоры, образование устойчивых форм микроорганизмов и т. д. Поэтому изучение остаточных количеств антибиотиков в продуктах животноводства до принятия его в пищу, а также разработка мер по обезвреживанию этих продуктов имеет большое не только научное, но и практическое значение.

Предыдущими нашими исследованиями было установлено, что при скармливании пчелам антибиотиков, последние из организма пчел переходят в мед, и хотя при хранении активность их постепенно снижается, некоторые из них сохраняются в меде довольно продолжительное время [2—5].

В настоящей работе ставилась цель изучить динамику снижения активности полусинтетических антибиотиков оксациллина, диклоксациллина и метациклина в меде и сахарном сиропе, а также влияние пастеризации на активность этих препаратов в меде.

Материал и методика. Испытывались два образца меда различного происхождения—из Талинского района Армянской ССР и Сухумского района Грузинской ССР.

К определенному количеству меда и сахарного сиропа в отдельности добавлялось определенное количество оксациллина, диклоксациллина и метациклина с известной активностью, затем все перемешивалось и в определенные сроки после хранения в комнатных условиях исследовалось на наличие остаточных количеств антибиотиков.

Концентрация этих препаратов в меде и сахарном сиропе определялась микробиологическим методом диффузии антибиотика в агар. Степень активности их после взаимодействия с медом и сахарным сиропом, а также после пастеризации выражали в процентах от исходной концентрации.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований, приведенные в табл. 1 показывают, что активность всех трех полусинтетических антибиотиков почти во все сроки исследования в обоих образцах меда ниже исходной концентрации.

Таблица 1
Остаточное количество оксациллина, диклоксациллина и метациклина в меде и сахарном сиропе (% к исходному)

Сроки исследования, (через ч)	Оксациллин			Диклоксациллин			Метациклин		
	мед		сахарный сироп	мед		сахарный сироп	мед		сахарный сироп
	талинский	сухумский		талинский	сухумский		талинский	сухумский	
1	80,0	76,6	28,3	100,0	80,6	51,3	67,4	51,6	35,7
3	73,3	66,0	30,0	80,6	72,6	41,3	51,5	72,8	35,7
6	76,6	73,3	28,3	86,0	53,3	33,3	43,8	73,1	29,6
24	80,4	83,3	8,3	80,0	76,0	19,3	45,3	64,2	29,8
48	68,3	68,3	1,7	61,3	66,6	6,3	45,3	51,8	26,0
72	65,0	65,0	следы	47,3	66,6	0,8	32,0	46,0	17,8
1 месяц	1,7	46,6	0	20,6	60,6	следы	30,4	44,0	17,8

Активность метациклина через час после взаимодействия с медом снижается интенсивнее, чем полусинтетических пенициллинов—оксациллина и диклоксациллина. В последующие сроки уровень метациклина в талинском меде с некоторыми колебаниями продолжает снижаться, но все же спустя месяц он еще сохраняется (30,4% от исходного).

В сухумском меде до 24 ч концентрация метациклина несколько повышается, очевидно, за счет связанного антибиотика, далее его уровень хотя и снижается, но спустя месяц он в меде сохраняется на более высоком уровне—44,0% от исходного.

Снижение активности оксациллина и диклоксациллина в первые три дня взаимодействия с медом происходит значительно медленнее и более равномерно в обоих образцах меда; спустя месяц оксациллин и диклоксациллин сохраняются в талинском меде (1,7 и 20,6%), в сухумском меде их количество значительно больше—соответственно 46,6 и 60,6% от исходного.

Таким образом, полусинтетические антибиотики—оксациллин, диклоксациллин, а также метациклин, подобно ранее изученному нами пенициллину [1], более интенсивно разрушаются в талинском меде. Следовательно, происхождение меда оказывает определенное влияние на процент снижения активности этих препаратов.

Значительное снижение активности метациклина, и в особенности оксациллина и диклоксациллина, во все сроки исследования регистрировались нами в сахарном сиропе.

Если через месяц метациклин в сахарном сиропе сохраняется на 17,8% от исходного, то диклоксациллин за этот же период выявляется в виде следов, а оксациллин вообще не выявляется.

В контрольных опытах антибиотики в таком же количестве растворялись в воде, и во все сроки исследования их выявлено в значительно большем количестве.

Остаточное количество метациклина, оксациллина и диклоксациллина

Происхождение меда	Метациклин					
	до пастеризации	70°	80°	90°		
				однократно	двукратно	троекратно
Армянская ССР, Галинский р-н	71,4	—*	67,7	39,7	29,7	21,4
Грузинская ССР, Сухумский р-н	52,0	60,7	38,2	22,0	—	—

* не исследовано

Таким образом, при взаимодействии оксациллина, диклоксациллина и метациклина с медом в течение месяца активность их хотя значительно снижается, но полностью эти препараты не инактивируются. Поэтому обезвреживание меда от остаточных количеств антибиотиков до употребления его пищу имеет большое практическое значение.

Нами испытывалось влияние пастеризации на активность оксациллина и метациклина в меде.

Образцы меда, содержащие известное количество указанных антибиотиков, подвергались пастеризации при температуре 70°, 80° и 90° в течение 30 мин. Концентрация антибиотиков в меде определялась как до, так и после всех режимов пастеризации. Исследования проводились в трех повторностях, средние данные которых, выраженные в процентах, приведены в табл. 2.

Как и следовало ожидать, при взаимодействии с медом в наибольшей степени снизилась активность метациклина. При нагревании меда активность его продолжает снижаться, и после пастеризации при температуре 80° в талинском меде сохраняется 67,7%, в сухумском меде значительно меньше—38,2% метациклина. В дальнейшем с повышением температуры и повторностей пастеризации количество антибиотика в меде продолжает снижаться, однако и после 3-кратной пастеризации при температуре 90° он все еще сохраняется в талинском меде на довольно высоком уровне. Под действием теплового фактора значительно снижается также активность оксациллина и диклоксациллина (табл. 2).

Из той же табл. 2 видно, что все препараты при всех режимах пастеризации интенсивнее разрушаются в сухумском меде.

Заслуживает внимания тот факт, что ранее изученный нами пенициллин и полусинтетический пенициллин—амициллин под действием

теплового фактора разрушались интенсивнее, особенно в галинском меде [1].

Таблица 2

в меде после пастеризации, % к исходному

до пастеризации	Оксациллин					Диклоксациллин					
	70°	80°	90°			до пастеризации	70°	80°	90°		
			однократно	двукратно	тремякратно				однократно	двукратно	тремякратно
100,0	83,3	50,8	66,6	55,8	15,8	94,3	90,1	76,7	56,1	18,7	0,1
97,5	57,6	—	54,7	—	—	79,6	67,7	41,8	29,2	—	—

Следовательно, разрушительное действие теплового фактора на активность различных антибиотиков в меде различного происхождения проявляется не одинаково.

Таким образом, активность метациклина, оксациллина и диклоксациллина под влиянием меда значительно снижается, но полностью они не разрушаются, даже после пастеризации.

Ереванский зооветеринарный институт

Поступило 13. VI 1980 г.

ԱՆՏԻԲԻՈՏԻՎ ԵՎ ՊԱՍՏԵՐԻԶԱՑԻԱՅԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԿԻՍԱՍԽԻՆԹԵՏԻԿ ԱՆՏԻԲԻՈՏԻԿՆԵՐԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ձ. Մ. ՀԱԿՈՐՅԱՆ, Գ. Ա. ՇԱՔԱՐՅԱՆ

Երկու տարբեր ծագում ունեցող մեղրի նմուշներին և շաքարաջրին խառնել ենք հայտնի քանակությամբ կիսասինթետիկ անտիբիոտիկներ մետացիկլին, օքսացիլին և դիկլոքսացիլին: Որոշակի ժամկետներում մեղրի և շաքարաջրի մեջ որոշվել է հիշյալ անտիբիոտիկների կոնցենտրացիան. այն որոշվել է նաև մեղրի նմուշները 30 րոպե տևողությամբ 70°, 80° և 90°-ում պաստերիզացնելուց հետո:

Հետազոտությունները ցույց տվեցին, որ ինչպես մետացիկլինի, այնպես էլ օքսացիլինի և դիկլոքսացիլինի ակտիվությունը մեղրի և շաքարաջրի ազդեցությամբ իջնում է, սակայն տարբեր չափով:

Անտիբիոտիկների կոնցենտրացիան մեղրի մեջ չնայած ավելի զգալի է իջնում այն պաստերիզացնելիս, սակայն դրանք լրիվ չեն քայքայվում մեղրի մեջ նույնիսկ 90°-ում եռանվազ պաստերիզացնելուց հետո:

EFFECT OF HONEY SUGAR SYRUP AND PASTEURIZATION ON SEMI-SYNTHETIC ANTIBIOTIC ACTIVITY

Z. M. AKOPIAN, G. A. SHAKARIAN

It has been established that under the effect of honey and sugar syrup the activity of semi-synthetic antibiotics—metacyclin, oxacillin and dicloxacillin decreases. After pasteurization honey is not completely purified from semi-synthetic antibiotics.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Акопян З. М., Шакарян Г. А. Биолог. ж. Армении, 31, 1, 1978.
2. Шакарян Г. А., Даниелян С. Г., Акопян З. М. Пчеловодство, 6, 1968.
3. Шакарян Г. А., Даниелян С. Г., Акопян З. М. Биолог. ж. Армении, 23, 3, 1970.
4. Шакарян Г. А., Даниелян С. Г., Акопян З. М. Антибиотики, 3, 1970.
5. Шакарян Г. А., Даниелян С. Г., Акопян З. М. Ветеринария, 9, 1970.

АРОМАТООБРАЗОВАНИЕ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ ЮГОРТА

Л. А. ЕРЗИНҚЯՆ, А. Б. АКОПОВА, А. З. ИБРАГИМОВА, Н. Д. ШАМРАЕВА

Установлено, что максимальное накопление аромата происходит при развитии культур бактерий в первые часы до образования сгустка и последующем сохранении йогурта в холодильнике при 5°.

Симбиотическая бактериальная закваска йогурта Л-11 хорошо уживается с ароматообразующим стрептококком М23-III, что способствует значительному повышению аромата кисломолочного продукта.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, йогурт.

Аромат кисломолочных продуктов зависит от находящихся в них веществ—диацетила, летучих кислот и др., которые синтезируются молочнокислыми бактериями [1, 3—5]. Ряд ученых считают, что гетероферментативные бактерии диацетила синтезируют больше, чем гомоферментативные [2, 6]. В производстве маргарина, творога, сметаны, простокваши используются активные ароматообразующие молочнокислые бактерии. Представляло интерес установить влияние ароматообразующих культур на аромат йогурта.

С этой целью изучалось ароматообразование молочнокислых бактерий йогурта, монокультуры *Streptococcus diacetilactis* М23-III и ее симбиоза с кокковыми и палочковидными молочнокислыми бактериями микрофлоры йогурта.

Материал и методика. Для количественного определения диацетила нами использовался модифицированный метод японских исследователей [3, 7, 8]. Этот метод имеет следующие достоинства: отгон в токе инертного газа при относительно невысоких температурных условиях выделения, возможность анализировать одновременно 6 или 12 образцов при использовании несложной аппаратуры.

Сущность его заключается в извлечении током азота диацетила и фиксации его в специальной ловушке буферным раствором гидроксилламина. Выдержка при 75° в течение 15 мин способствует завершению реакции между диацетилем и гидроксилламино с образованием диацетилглиоксима, который дает стойкий цветной комплекс с сернокислым железом.

Нами были исследованы 5 культур йогуртных палочек и кокков в монокультуре и их симбиоз, а также ароматообразующие молочнокислые бактерии (ВНИИЖ) М23-III в монокультуре и совместно с молочнокислыми бактериями в симбиозе. В молоко вносили 1% исследуемых культур, которые выдерживались в термостате при температуре 37°. Диацетил и ацетон определяли в исходном молоке, 6-, 24-часовой культуре и в культуре, которая 6 ч инкубировалась в термостате, затем 18 ч выдерживалась в холодильнике при 5°. Наряду с этим, определяли кислотность (в градусах Тернера) в

24-часовой культуре, кроме того—летучие кислоты (муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную), ацетальдегид—при помощи хроматографа «Хром-2».

Для определения диацетила брали 20 мл молока, сквашенного исследуемыми молочнокислыми бактериями, а для определения ацетона к 5 мл сквашенного молока добавляли 1 мл 30%-ного FeCl_3 .

Пробу помещали в большую пробирку (емкостью 250 мл), которую погружали в водяную баню с температурой 65°. Каждую пробирку закрывали притертой пробкой, через которую проходила липетка, доходящая до дна и соединенная с источником азота. Большая пробирка соединялась U-образной трубкой с ловушкой, находящейся снаружи, внутрь помещалась градуированная малая центрифужная пробирка.

Выход азота наружу—свободный, через трубку. 1 мл буферного раствора гидросиламина заливали в малую центрифужную пробирку. Газ из балона подавался со скоростью 100—120 мл в мин (5—7 пузырьков в секунду). После отгонки в течение 1,5 ч ловушку с гидросиламином отсоединяли и погружали в водяную баню с температурой 75° на 15 мин. Затем в еще теплые пробирки добавляли 0,5 мл ацетонфосфата с целью связать непрореагировавший гидросиламин в комплексе и встряхивали. Сразу же добавляли 0,1 мл сернистого железа и немедленно встряхивали. Объем доводили до 5 мл 33%-ным K_2HPO_4 и колориметрировали на ФЭК с зеленым светофильтром, кювета № 5.

Количество диацетила в пробах определяли по заранее построенной на растворах чистого диацетила калибровочной кривой.

Для определения ароматических веществ в стеклянные сосуды емкостью 30 мл помещали по 6 г безводного сернистого натрия. Затем в сосуды добавляли по 5 г гомогенного образца сквашенного молока, тщательно перемешивали и герметически закрывали резиновыми пробками с навинчивающимися колпачками. Стеклянные сосуды помещали в водяную баню при 90° на 15 мин. Так как температура кипения диацетила 88°, то такая температурная выдержка обеспечивала его полное извлечение.

5 мл газовой смеси шприцем вводили непосредственно в хроматограф. В наших исследованиях использовали прибор «Хром-2» с пламенно-ионизированным детектором.

Идентификация пиков хроматографической записи была проведена с использованием свидетелей по времени удержания неизвестного с аналогичным пиком для стандарта, а количественное определение—по соотношению площадей пиков стандартных растворов с известным содержанием и площадей пиков в исследуемом образце.

Выделение летучих жирных кислот велось отгонкой с паром, с последующим определением их содержания методом газождкостной хроматографии по модификации Климовского [5].

Результаты и обсуждение. В результате исследований побочных продуктов брожения определено содержание ацетальдегида и летучих жирных кислот (муравьиной, уксусной, пропионовой, масляной). Установлено, что количество образовавшихся кислот по отношению к титруемой кислотности у йогуртных стрептококков составляет 10,2, йогуртных палочек—9,2, а при симбиозе молочнокислых палочек и кокков—5,3%, тогда как у молочнокислого ароматообразующего стрептококка М23-111 в симбиозе с молочнокислыми палочками и кокками составляет 9,0% (табл. 1).

Как видно из табл. 1, по количеству летучих кислот и ацетальдегида испытываемые молочнокислые бактерии йогурта оказались гомоферментативными. Они образуют молочную кислоту (90 % от общего количества продуктов брожения). Для расщепления глюкозы указанные бактерии обладают всеми необходимыми ферментами, включая альдолазу. Водород, отщепляющийся при дегидрировании трифосфата, передает-

ся на пируват. Небольшая часть пирувата подвергается декарбоксилированию с превращением в уксусную кислоту, этанон, CO₂ и ацетонн.

Таблица 1

Продукты брожения молочнокислых бактерий йогурта

Наименование культуры	Ацетальдегид, мг/л	Летучие жирные кислоты в промилях					Кислотность, °Т	% побочных продуктов по отношению к титруемым кислотам
		муравьиная	уксусная	пропионовая	масляная	итого		
Л- II к	1,4	57,92	46,08	2,02	4,64	111,0	102	10,2
Л- II п	10,4	38,24	55,28	2,73	4,84	111,4	114	9,2
Л- II	18,3	25,56	29,48	1,83	2,16	67,3	127	5,3
Л- II + М 23- III	40,2	45,2	117,04	1,44	1,68	145	171	9,0

Таблица 2

Накопление диацетила и ацетонна молочнокислыми бактериями йогурта при разных условиях культивирования в молоке

Культуры	Л- II к	Л- II п	М 23- III	Л- II + М 23- III	Л- II
Диацетил, мг/л					
Исходная	0,75	0,9	1,45	1,5	0,7
6 ч -37°	3	1,8	15,5	16,5	2,2
6 ч -37°	4,9	1,9	16,0	22,0	3,0
18 ч -5°	2,2	0,8	2,9	1,8	0,58
24 ч -37°					
Ацетонн, мг/л					
Исходная	4,45	3,5	6,35	6,9	0,7
6 ч -37°	10,2	5,4	85,4	75,5	8,2
6 ч -37°	11,1	4,9	91,2	81,2	6,0
18 ч -5°	2,6	1,2	—	9,7	0,8
24 ч -37°					
Кислотность, Г					
6 ч -37°	65	60	38	68	55
6 ч -37°	69	71	56	75	75
18 ч -5°					
24 ч -37°	102	114	64	171	121

При определении ароматообразования исследуемых культур, как видно из табл. 2, при инкубировании в термостате в течение 24 ч при оптимальной температуре роста количество диацетила и ацетонна заметно снижается по сравнению с 6-часовой культурой. Количество диацетила и ацетонна значительно увеличивается, когда последнюю сразу же после свертывания сгустка переносят в холодильник с температурой 5°, где выдерживают 18 ч. Ароматообразующий стрептококк М23-III ведет себя в отношении накопления ароматообразующих веществ аналогично молочнокислым йогуртным бактериям. При культивировании этой

культуры в симбиозе палочек и кокков молочнокислых югортных бактерий наблюдается накопление кислотности, уплотнение сгустка, значительное повышение аромата. Из исследуемых молочнокислых бактерий югорта лучшей способностью к ароматообразованию обладают стрептококковые формы.

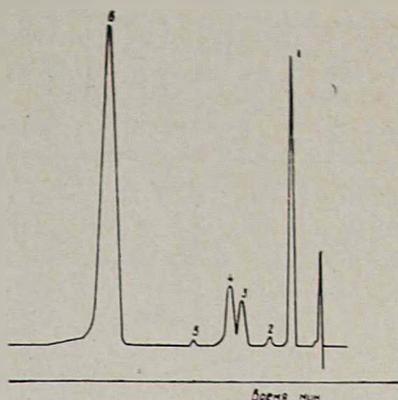


Рис. Пики хроматографической записи при определении аромата кисломолочного продукта. 1. Ацетальдегид, 2. Пропионовый альдегид, 3. Ацетон, 4. Этанол, 5. Гетанон, 6. Диэтил.

Таким образом, можно предположить, что в первые 6 ч инкубации при высокой температуре происходит быстрое накопление ароматических веществ, тогда как при дальнейшей инкубации до 24 ч и более происходит их разрушение. Поэтому необходимо после образования сгустка кисломолочный продукт перенести в холодильник с температурой 5°, где и происходит дальнейшее усиление аромата (рис.)

Высокая кислотность культуры и длительная выдержка при повышенной температуре (37°) отрицательно влияют на ароматообразование.

Институт микробиологии АН Армянской ССР,
Всесоюзный научно-исследовательский институт жиров,
г. Ленинград

Поступило 11. XII 1980 г.

ՅՈՒՂՈՐԴԻ ԿԱԹԵՆԱԹԹՎԱՅԻՆ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ
ԲՈՒՐՄՈՒՆՔԱՌԱՋԱՅՈՒՄԸ

Լ. Շ. ԵՐԶՆԱՅԱՆ, Ս. Բ. ԱԿՈՊՈՎԱ, Ա. Զ. ԻԲՐԱԶԻՄՈՎԱ, Ն. Դ. ՇԱՄՐԱԵՎԱ

Ուսումնասիրվել է յուղորդի կաթնաթթվային բակտերիաների բուրմունքառաջացումը: Պարզվել է, որ բուրմունքի մաքսիմալ կուտակումը տեղի է ունենում բակտերիալ կուլտուրայի զարգացման առաջին իսկ ժամերում՝ մինչև կաթնամակարդակի առաջացումը և հետագայում յուղորդը 5° սառնարանում պահպանման դեպքում:

AROMAFORMATION OF JUGURT LACTOBACILLUS

L. A. ERSINKIAN, A. B. ACOPOVA, A. S. IBRAGIMOVA, N. D. SHAMRAEVA

It has been established that lactobacillus used for jugurt production accumulates aromatic substances during first hours of growth. The cul-

ture gets on well with aromaproducing streptococci M23—111—5, this favours the increase of lacticacid product aroma.

Л И Т Е Р А Т У Р А

- 1 Богданов В. М. Молочная промышленность, 7, 1965.
- 2 Гибшман М. Р., Дерябина Е. Сборник реф. н.-и. работ ВНИИМС, 4, 1957.
- 3 Гриневиц А. Г. Микробиология, М., 1966.
- 4 Климовский И. И., Сергеева Е. Г., Белов А. Н. Молочная промышленность, 8, 1971.
- 5 Скородумова А. М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов, 1963, М.—Л.
- 6 Abd-el-Malek, Gibson T. J. Dairy Kesearch, 15, 3, 1948.
- 7 Pack M. Y., Vedamithi E. R., Sandine W. E., Elliker P. R., Leesment H. Dairy Sci., 51, 339—343, 1968.
Pack M. V., Sandine W. E., Elliker P. R., Dwy E. A., Idndsay R. C. Dairy Sci. 47, 981, 1964.

РАЗЛИЧИЯ В БИОХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *GALLERIAE*

Б. П. КАРАБЕКОВ, А. Г. ЧАХМАХЧЯН, М. Г. ОГАНЕСЯН

Показано, что природные штаммы *Bac. thuringiensis*, принадлежащие к серотипу Н5а:5в (var. *galleriae*), неоднородны по своим биохимическим свойствам. Исследованные штаммы принадлежали к двум хорошо дифференцируемым биохимическим типам, отличающимся друг от друга по способности утилизировать сахарозу и по потребности в никотиновой кислоте. Выявлена корреляция между этими двумя признаками, характерная только для штаммов var. *galleriae*.

Ключевые слова: *Bac. thuringiensis*, биохимические свойства.

Bac. thuringiensis v. *galleriae* (серотип Н5а:5в) известен однородностью биохимических свойств [7]. Ему свойственна неспособность сбраживать сахарозу [6—9] и аукоотрофность по никотиновой кислоте [1, 2]. Наряду с этим, у ряда штаммов этого серотипа обнаружена способность ферментировать сахарозу [1]. Но несмотря на это, вопрос о наличии различных биохимических типов внутри серотипа Н5а:5в не обсуждался.

В настоящей работе приводятся результаты сравнительного изучения 37 природных штаммов *Bac. thuringiensis* v. *galleriae*, полученных из различных источников.

Материал и методика. В работе использовали 79 штаммов *Bac. thuringiensis*, 37 штаммов v. *galleriae* и 42—других серотипов (Н11—Н12). Большинство исследованных штаммов получено из Всесоюзного института защиты растений (ВИЗР, Ленинград). Ряд штаммов получен из института «ВНИИгенетика» (Москва), Института ядерных исследований (ИЯИ, Гатчина), Института микробиологии АН Армянской ССР (ИИМИ, г. Абовян, Армянская ССР), Биологического института СО АН СССР (БИСОАН, Новосибирск) и Среднеазиатского института фитопатологии (САНИИФ, Ташкент).

Лабораторное культивирование штаммов проводилось на мясо-пептонном бульоне и мясо-пептонном агаре. Способность сбраживать сахарозу исследовалась на среде следующего состава (%): пептон—1; сахароза (цда)—1; агар—2; бромкрезоловый индикатор—50 мкг/мл (рН 7,0). Цвет среды красно-фиолетовый. При сбраживании сахарозы среда окрашивается в желтый цвет. Жидкая среда с сахарозой готовилась по той же прописи без добавления агара. Для этих же целей использовалась сухая среда с сахарозой и индикатором ВР, выпускаемая Дагестанским институтом питательных сред.

Потребность в факторах роста определялась в минимальной среде (МС) следующего состава (на один литр среды, в граммах): K_2HPO_4 —3,0; KH_2PO_4 —1,0; Na_2SO_4 —

0,1; $MgSO_4$ —0,246; $CaCl_2$ —0,112; $MnCl_2$ —0,125; NH_4COOCH_3 —2,31; глюкоза—0,5; 1—глутаминовая кислота—1,47 (рН 7,3). Для приготовления агаризованной МС добавляли 1,1% агара «Дифко». В случае необходимости к МС добавлялась никотиновая кислота в конечной концентрации 10 мкг/мл. Изучалась лецитиназная [4], уреазная [5] и протеолитическая активность [3].

Серологические свойства исследовались в реакции агглютинации на стекле с эталонными Н—антисыворотками, полученными из Института им. Пастера. При идентификации серотипов Н5а:5в (*v. galleriae*) и Н5а:5с (*v. canadensis*) использован метод перекрестной адсорбции антител. Для этого антисыворотка Н5а:5в в разведении 1:100 насыщалась свежей культурой штамма 1122 ИНИИ *v. canadensis*, находящейся в конце экспоненциальной фазы роста. Точно так же антисыворотка Н5а:5с насыщалась культурой штамма 69—6 *v. galleriae*. Смеси ставились в термостат при 37° на 20 минут. За это время происходило выпадение обильного хлопьевидного осадка. Затем смеси центрифугировались при 4500 об/мин в течение 20 мин. Надосадочная жидкость отбиралась и с нею ставилась реакция агглютинации на стекле.

Чувствительность исследованных штаммов к набору бактериофагов определялась качественно.

Результаты и обсуждение. При изучении биологических свойств природных штаммов *Bac. thuringiensis v. galleriae*, поступивших в нашу лабораторию, было установлено, что они отличаются друг от друга по способности сбраживать сахарозу. Так, из 37 исследованных штаммов 18 (48,6%) сбраживали сахарозу с образованием кислоты без газа (Sac^+), 19 штаммов этой способностью не обладали (Sac^-). Характеристика исследованных штаммов по этому признаку, в зависимости от источника получения, приведена в табл. 1, из которой видно, что Sac^+

Таблица 1
Характеристика исследованных штаммов по источникам получения

Источник получения штаммов	Количество штаммов	В том числе	
		сбраживают сахарозу	не сбраживают сахарозу
ВИЗР	22	12	10
ИЯИ	4	2	2
ВНИИгенетика	6	2	4
БИСОАН	2	0	2
САНИИФ	3	2	1
Всего	37	18	19

штаммы поступали в нашу коллекцию почти из всех источников. Поскольку в классификационной схеме Де Баржак и Бонефи [7] этот вариант *Bac. thuringiensis* (серотип Н5а:5в) отмечен как не сбраживающий сахарозу, мы предположили, что поступившие к нам Sac^+ штаммы ошибочно отнесены к *v. galleriae*. Для проверки этого предположения были изучены серологические свойства как Sac^+ , так и Sac^- штаммов. Было установлено, что все 37 исследованных штаммов, включая и Sac^+ , одинаково хорошо агглютинируют с эталонными Н-антисыворотками

Н5а:5в (*v. galleriae*) и Н5а:5с (*v. canadiensis*), при отрицательной реакции агглютинации со всеми остальными Н-антисыворотками (Н1—Н12). В связи с этим в опыт был взят также штамм 1122 ИИМИ *v. canadiensis*, серологическое изучение которого показало, что этот штамм также хорошо агглютинирует с Н5а:5в и Н5а:5с антисыворотками при отрицательной реакции агглютинации с прочими Н-антисыворотками. Эти результаты дали основание предположить, что Sac⁺ штаммы, поступившие в нашу коллекцию, могут принадлежать к *v. canadiensis*, поскольку штаммы этого варианта по той же классификационной схеме отмечены как обладающие способностью сбраживать сахарозу. Для проверки этого предположения было проведено сравнительное изучение биохимических свойств исследуемых штаммов и штамма 1122 ИИМИ. Результаты этих исследований, а также результаты изучения серологических свойств этих штаммов с адсорбированными Н-антисыворотками приведены в табл. 2, из которой видно, что исследуемые нами Sac⁺

Таблица 2

Результаты сравнительного изучения Sac⁺ штаммов *v. galleriae* и штамма 1122 ИИМИ *v. canadiensis*

Штаммы	Сбражива- ние саха- розы	Лецитина- зная актив- ность	Уреазная активность	Протеоли- тическая активность	Агглютинация с адсорбиро- ванными антисыворотками	
					Н5в	Н5с
1122	+	++++	-	++++	-	++++
234-4	+	-	+	+	++++	-
254-4	+	-	+	+	++++	-
11-67 (2)	+	-	+	+	++++	-
71-3	+	-	+	+	++++	-
3-014	+	-	+	+	++++	-
3-16	+	-	+	+	++++	-
260-15	+	-	+	+	++++	-
260-12	+	-	+	+	++++	-
19-2	+	-	+	+	++++	-
78-1	+	-	+	+	++++	-
78-2	+	-	+	+	++++	-
И-77	+	-	+	+	++++	-
11-164	+	-	+	+	++++	-
42-2	+	-	+	+	++++	-
85-72	+	-	+	+	++++	-
11-670	+	-	+	+	++++	-
37-68 (12)	+	-	+	+	++++	-
260-12П	+	-	-	+	++++	-

Примечания: «+»—наличие признака, «-»—отсутствие признака, «++++»—ярко выраженная реакция.

штаммы четко отличаются по своим биохимическим и серологическим свойствам от штамма 1122 ИИМИ *v. canadiensis* и идентифицируются как штаммы, принадлежащие к серотипу Н5а:5в, т. е. к *v. galleriae*.

Таким образом, полученные результаты подтверждают данные Африкьяна [1] о том, что среди штаммов *Bac. thuringiensis v. galleriae* встречаются штаммы, способные сбраживать сахарозу. Отсюда следует,

что штаммы серотипа Н5а:5в принадлежат к двум биохимическим типам, один из которых способен утилизировать сахарозу, другой же этой способностью не обладает.

Сравнительное изучение свойств штаммов этих двух типов показало, что Sac⁺ и Sac⁻ штаммы *v. gallerae* отличаются друг от друга по крайней мере еще по одному биохимическому признаку, а именно по потребности в никотиновой кислоте для роста. Sac⁺ штаммы, как правило, не нуждаются в никотиновой кислоте, т. е. являются Nic⁺, в то время как Sac⁻ штаммы не растут без нее, т. е. являются Nic⁻. По другим признакам (морфо-культуральным и остальным биохимическим свойствам), включая чувствительность к набору вирулентных и умеренных фагов, указанные штаммы мало чем отличались друг от друга. Эти данные подтверждают вывод о том, что серотип Н5а:5в *v. gallerae* должен быть представлен двумя биохимическими типами.

Вызывает интерес выявление неожиданной корреляции между Sac⁻ и Nic⁻ признаками у исследованных штаммов *v. gallerae*. Корреляция между ними может быть отражением особенностей обмена всей группы *Bac. thuringiensis*. Для выяснения этого была изучена коррелятивная связь между этими признаками у штаммов, представляющих другие варианты и серотипы *Bac. thuringiensis* (табл. 3). Как видно из табл. 3,

Таблица 3

Коррелятивная связь между способностью сбраживать сахарозу и потребностью в никотиновой кислоте у штаммов различных серотипов и вариантов *Bac. thuringiensis*

Варианты	Серотип	Количество штаммов	Сбраживание сахаразы	Рост при отсутствии никотиновой кислоты	Фенотип
berliner	1	3	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
finitimus	2	3	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
alesti	3a	2	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
kurstaki	3a : 3b	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
kenyae	4a : 4c	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
sotto	4a : 4b	3	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
dendrolimus	4a : 4b	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
canadensis	5a : 5b	2	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
subtoxicus	6	3	+	-	Sac ⁺ Nic ⁻
entomocidus	6	2	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
aizawai	7	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
morrisoni	8	2	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
tolworthi	9	2	+	+	Sac ⁺ Nic ⁺
darmstadtensis	10	2	-	-	Sac ⁻ Nic ⁻
toumanoffi	11	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺
thompsoni	12	3	-	+	Sac ⁻ Nic ⁺

у 8 из исследованных вариантов или серотипов изучаемые признаки не коррелируют, что не говорит в пользу предположения о связи этого явления с особенностями обмена у всех представителей *Bac. thuringiensis*. Природа корреляции этих признаков у штаммов *v. gallerae*, таким образом, пока не ясна.

Филиал ВНИИ генетики и селекции
промышленных микроорганизмов
Главмикробиопрома СССР

Поступило 10. IX 1980 г.

Ուսումնասիրվել են *Bac. thuringiensis*-ի H5a:5b սերոտիպին պատկանող (*v. galleriae*) 37 բնական շտամներ: Պարզվել է, որ նրանցից 18-ը ընդունակ են սախարոզան քայքայել՝ առաջացնելով թթու, առանց զազի հատկության, որը բնորոշ չէ այդ սերոտիպին պատկանող միկրոօրգանիզմների համար: Հարկ է նշել, որ սախարոզան քայքայող բոլոր շտամներն էլ, առանց բացառության, ի տարբերություն սախարոզան չքայքայող շտամների, իրենց ածի համար նիկոտինաթթվի կարիք չեն դրոմ: Ստացված տվյալները թույլ են տալիս ենթադրելու, որ *Bac. thuringiensis* H5a:5b սերոտիպին պատկանող *v. galleriae*-ն կազմված է իրարից բիոքիմիապես լավ տարբերվող երկու տիպի միկրոօրգանիզմներից, որոնցից առաջինն ընդունակ չէ յուրացնել սախարոզան և ածի համար նիկոտինաթթվի կարիք ունի, իսկ երկրորդը՝ յուրացնում է սախարոզան և նիկոտինաթթվի պահանջ չի դրոմ:

Ուշադրության արժանի է վերը նշված երկու բիոքիմիական հատկանիշների հայտնաբերված զուգակցությունը ուսումնասիրված շտամների մոտ, որի բնույթը դեռևս պարզ չէ:

VARIATIONS OF BIOCHEMICAL PROPERTIES OF *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *GALLERIAE* STRAINS

B. P. KARABECOV, A. G. TCHAKHMAKHCHYAN, M. G. OGANESSIAN

It has been shown that natural strains of *Bac. thuringiensis* which belong to serotype H5a:5b (*var. galleriae*) are not homogeneous by their biochemical properties. Studied strains belong to two well differentiated biochemical types which are strongly distinguished according to their reaction to sucrose and nicotinic acid. A correlation of these two signs characteristic only for *var. galleriae* strains has been revealed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Микробиол. журн., Киев, 35, 1, 58, 1973.
2. Африкян Э. К. Успехи микробиологии, 10, 142, 1975.
3. Петрова И. С., Ванцюняйте М. М. Прикладная биохимия и микробиология, 2, 3, 322, 1966.
4. Полховский В. А. Микробиология, 39, 576, 1970.
5. Тимиков В. Д., Гольдфарб Д. М. Основы экспериментальной медицинской микробиологии, М., 1958.
6. de Barjac H., Bonnefol A. J. Invert. Pathol., 11, 335, 1968.
7. de Barjac H., Bonnefol A. Entomophaga, 18, 5, 1973.
8. Norris J. R. J. Appl. Bact., 27, 3, 439, 1964.
9. Norris J. R., Burges H. D. Entomophaga, 10, 11, 1965.

О ФИТОПАТОГЕННОСТИ ГРИБОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПЛОДОВ И СЕМЯН ДРЕВЕСНО-КУСТАРНИКОВЫХ ПОРОД

С. А. СИМОНЯН, Т. О. МАМИКОНЯН

Изучены 7 видов и 1 вариация грибов, выделенных из плодов и семян древесно-кустарниковых пород, перспективных для озеленения аридной зоны Армении, на патогенность к их проросткам. Выявлены 3 группы грибов, различающиеся по этому признаку. В пределах одного и того же вида имеются слабо- и сильнопатогенные штаммы. Изученные грибы могут оказать отрицательное влияние на семенное возобновление указанных пород в природе и при выращивании их в питомниках.

Ключевые слова: микофлора, фитопатогенность, семена древесно-кустарниковых.

Плоды и семена древесно-кустарниковых растений часто поражаются грибными организмами. Это может явиться одной из причин ослабления или потери их всхожести или получения больных всходов.

В Институте ботаники АН Армянской ССР в последние годы изучалась микофлора плодов и семян 11 перспективных для озеленения аридной зоны Армении ксерофильных древесно-кустарниковых пород: *Acer ibericum* M. Bieb., *Amygdalus fenzliana* (Fritsch.) Lipsky, *Cerasus incana* (Pall.) Spach, *Celtis glabrata* Stev., *Ephedra procera* Fisch. et Mey., *Jasminum fruticans* L., *Juniperus foetidissima* Willd., *J. polycarpus* C. Koch., *Lonicera iberica* M. Bieb., *Pistacia mutica* Fisch. et Mey., *Rhamnus pallasii* Fisch. et Mey.

На указанных субстратах нами выявлено свыше 120 видов грибов из различных систематических групп. Среди сапротрофных микромицетов оказались виды, известные по литературным данным как возможные патогены, передающиеся с помощью семян [2, 4, 6, 7, 9]. В связи с этим нами была поставлена цель подтвердить экспериментальным путем болезнетворность этих грибов для проростков древесно-кустарниковых пород путем опытов по искусственному заражению.

Материал и методика. На патогенность испытаны 7 видов и одна вариация грибов (табл. 1).

Для проращивания семена указанных пород были подвергнуты стратификации (кроме семян эфедры, которые для прорастания в ней не нуждаются). Семена смешивались с промытым песком в соотношении 1:3 и оставлялись в вазонах при температуре 0—5° на различные сроки, требуемые для стратификации [3]. Затем они высевались в вазоны с почвой, помещались в тепличные условия и по достижении проростками высоты 4—5 см использовались для заражения.

Таблица 1

Виды грибов, изученных на патогенность к сеянцам
древесно-кустарниковых пород

Виды грибов	Штаммы	Выделены из семян и плодов
<i>Fusarium heterosporum</i>	503 8	<i>Ephedra procera</i>
	503 8	<i>Jasminum triflicans</i>
<i>F. avenaceum</i> var. <i>herbarum</i>	511 11	<i>Ephedra procera</i>
<i>F. sambucinum</i>	510 11	<i>Amygdalus fenzliana</i>
<i>F. sambucinum</i> var. <i>minus</i>	485 8	<i>Ephedra procera</i>
<i>F. sporotrichiella</i>	538 1	<i>Amygdalus fenzliana</i>
<i>Alternaria alternata</i>	368 2	<i>Cerasus incana</i>
	485 4	<i>Ephedra procera</i>
<i>Trichothecium roseum</i>	346 2	<i>Pistacia mutica</i>
	517 11	<i>Lonicera iberica</i>
<i>Botrytis cinerea</i>	513 11	<i>Lonicera iberica</i>

Инокуляция исследуемым видом гриба (за исключением *Fusarium sambucinum*) проводилась по модифицированной методике Ниргарда [8]. По 3 проростка, поверхностно простерилизованных в течение 5 мин 0,001%-ном раствором сулемы, помещались на поверхность колпачка из фильтровальной бумаги в стерильные пробирки, содержащие 20 мл питательного раствора, рекомендуемого Институтом агрохимических проблем и гидропоники АН Армянской ССР для беспочвенного выращивания растений [1].

Заражение проводилось 2-недельной культурой гриба, выращенной на агаризованной среде Чапека. Равные кусочки культуры гриба вносились в каждую из пробирок вблизи от корешков проростка. Пробирки устанавливались на штативе в лабораторных условиях при температуре 18—22°. Для каждого штамма бралось по 9 пробирок (всего 27 растений). Контрольных пробирок (без внесения инокулюма) было 5 (15 растений).

Учет пораженности проводился на 4-, 7-, 10-й и 17-й дни после заражения по шкале со следующим обозначением баллов:

- 0—растение без признаков поражения,
- 1—слабые признаки увядания,
- 2—увядает все растение, стебель тонкий, потемневший,
- 3—растение погибло.

Процент развития болезни высчитывался по формуле [5]:

$$R = \frac{\sum (ab) 100}{NK}$$

где R—интенсивность развития болезни (процент);

$\sum (ab)$ —сумма произведений числа растений на соответствующий им балл поражения;

N—общее количество учтенных растений,

K—наивысший балл шкалы учета.

С *Fusarium sambucinum* проведены вегетативные опыты по следующей методике.

Поверхностно дезинфицированные сулемой проростки высаживались по 3 в стерильные вазоны емкостью 0,5 л со стерильной почвой и выращивались до высоты 3—4 см.

Гриб культивировался в 50 мл жидкой среды Чапека в колбах Эрленмейера объемом 150 мл в течение 15 дней. Затем содержимое каждой колбы фильтровалось, пленка

гриба растиралась в ступке со стеклянным песком с небольшим количеством стерильной воды, добавлялась вода до 50 см³, и вазон равномерно поливался инокулюмом из расчета: пленка гриба из одной колбы на вазон. Последующий полив производился ежедневно равными объемами воды в каждый вазон. Для опыта было взято 6 вазонов (18 растений), для контроля—3 вазона (9 растений). Учет пораженности проводился вышеописанным способом.

Для повторной идентификации исследуемых на патогенность видов грибов заболевшие проростки дезинфицировались сулемой, промывались стерильной водой и закладывались на среду Чапека в чашки Петри.

Изоляты, выделенные из больных проростков, не отличались по своим морфологическим и культуральным признакам от исходных.

Результаты и обсуждение. *Fusarium heterosporum* Nees. При заражении проростков *Ephedra procera* и *Jasminum fruticans* на 7-й день появлялись первые признаки увядания: проростки постепенно теряли тургор, листья скручивались. На 17-й день учета процент развития болезни составил соответственно 33,3 и 28,4.

Fusarium avenaceum (Fr.) Sacc. var. *herbarum* (Corda) Sacc. Искусственно зараженные проростки *Ephedra procera* уже на 4-й день учета проявляли признаки увядания и на 10-й полностью погибали. Процент развития болезни составил 100.

Fusarium sambucinum Fuck. В вегетационных опытах первые признаки увядания проростков *Amygdalus fenzliana* начали появляться на 7-й день. На 17-й день процент развития болезни достиг 61,1.

Fusarium sambucinum Fuck. var. *minus* Wg. На 7-й день учета проростки *Ephedra procera* начали терять тургор, увядать и на 17-й день процент развития болезни достиг 58,8.

Fusarium sporotrichiella Bilai. Зараженные проростки *Amygdalus fenzliana* уже на 4-й день увядали, теряли тургор, а через 17 дней процент развития болезни достиг 87,4.

Alternaria alternata (Fr.) Keissler (штамм 368/2). Проростки *Cerasus incana* на 4-й день учета проявляли признаки увядания, на 7-й наблюдалось присутствие черного мицелия гриба на стебельках и листьях проростков. Они скручивались и на 12—17-й дни все без исключения увядали. Процент развития болезни составил 100.

Alternaria alternata (Fr.) Keissler (штамм 485/4). Первые симптомы заболевания лишь на 10-й день появились у некоторых проростков *Ephedra procera*. На 17-й день учета процент развития болезни составил 25,5.

Trichothecium roseum Link. (штамм 346/2). На 4-й день учета наблюдались признаки слабого увядания проростков *Pistacia mutica*, растения потеряли тургор. На 7-й день на стеблях и листьях появился розовый налет гриба, проростки начали увядать и почти полностью погибли. Процент развития болезни к концу опыта составил 87,1.

Trichothecium roseum Link. (штамм 517/11). Первые признаки увядания проростков *Lonicera iberica* появились на 7-й день. Проростки постепенно покрывались розовым налетом гриба. На 17-й день учета процент развития болезни составил 66,6.

Botrytis cinerea Pers. ex Fr. Уже на 4-й день проростки *Lonicera ibericum* начали увядать, покрываясь пыльным серым мицелием гриба. На 10-й все без исключения погибли. Процент развития болезни составил 100.

Суммарные данные по патогенности изученных грибов приведены в табл. 2.

Таблица 2

Патогенность некоторых видов грибов в отношении проростков
древесно-кустарниковых пород

Вид гриба	Вид растения	Процент развития болезни по срокам учета				Контроль
		I	II	III	IV	
<i>Fusarium avenaceum</i> var. <i>herbarum</i>	<i>Ephedra procera</i>	27,7	68,8	90	100	0
<i>F. sambucinum</i> v. <i>minus</i>		2,2	8,8	20	58,8	0
<i>F. heterosporum</i>		4,4	8,8	18,8	33,3	0
<i>Alternaria alternata</i>		3,3	3,3	13,3	25,5	0
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Pistacia mutica</i>	15,5	25,5	77,7	100	0
<i>Alternaria alternata</i>	<i>Cerasus incana</i>	4,9	17,6	51,8	100	0
<i>Fusarium heterosporum</i>	<i>Jasminum fruticans</i>	8,7	12,3	23,4	28,4	0
<i>F. sporotrichiella</i>	<i>Amygdalus tenzliana</i>	41,6	66,6	79,1	87,4	0
<i>F. sambucinum</i>		12,9	27,7	44,2	61,1	0
<i>Trichothecium roseum</i>	<i>Lonicera iberica</i>	4,1	16,6	33,3	66,6	0
<i>Botrytis cinerea</i>		66,6	100	100	100	0

Вышеизложенные эксперименты позволяют распределить изученные штаммы грибов с точки зрения их патогенности к проросткам древесно-кустарниковых пород на 3 группы:

Сильнопатогенные¹—*Fusarium sporotrichiella*, *F. avenaceum* var. *herbarum*, *Trichothecium roseum* (штамм 346/2), *Alternaria alternata* (штамм 368/2), *Botrytis cinerea* (процент развития болезни составлял соответственно для *Fusarium sporotrichiella* 87,4 и 100 — для всех остальных).

Среднепатогенные—*Fusarium sambucinum*, *F. sambucinum* var. *minus*, *Trichothecium roseum* (штамм 517/11) (процент развития болезни соответственно 61,1, 58,8 и 66,6).

Слабопатогенные—*Fusarium heterosporum* (процент развития болезни от 28,4 до 33,3 на разных растениях) и *Alternaria alternata* (штамм 485/4)—25,5%.

Опыты показали, что в пределах одного и того же вида имеются штаммы, обладающие различной степенью патогенности в отношении древесно-кустарниковых пород. Таков, например, гриб *Alternaria alternata*, штамм 368/2 которого является сильнопатогенным, а штамм 485/4 относится к группе слабопатогенных.

Таким образом, среди обилия сапротрофных грибов, выделяемых с поверхности и из внутренних частей семян и плодов древесно-кустарниковых пород, имеются и такие, которые являются болезнетворными. Все испытанные нами виды грибов оказались в той или иной степени патогенными для проростков исследуемых древесно-кустарниковых пород и вызывали их увядание вплоть до гибели.

Эти патогенные грибы способны, по-видимому, оказывать отрицательное воздействие на семенное возобновление древесно-кустарниковых пород в природе, а также при выращивании в питомниках.

Институт ботаники АН Армянской ССР

Поступило 10.XI 1980 г.

ՉՈՐԱԳԻՄԱՑԿՈՒՆ ՄԱՌԱԹՓԱՅԻՆ ՏԵՍԱԿՆԵՐԻ ՊՏՈՒՂՆԵՐԻՑ
ՈՒ ՍԵՐՄԵՐԻՑ ԱՌԱՆՁՆԱՑՎԱԾ ՈՐՈՇ ՖԻՏՈՊԱԹՈԳԵՆ ՍՆԿԵՐԻ
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՇՈՒՐՋԸ

Ս. Ա. ՍԻՄՈՆՅԱՆ, Թ. Հ. ՄԱՄԻԿՈՆՅԱՆ

Ուսումնասիրվել է Հայկական ՍՍՀ արիդային գոտու կանաչապատման համար ծառաթփային հեռանկարային տեսակների պտուղներից ու սերմերից առանձնացված սնկերի 7 տեսակներ և 1 վարիացիա: Այդ տեսակների ծիլերին անցնող հիվանդածնությունն ուսումնասիրությանը նրանց մեջ բացահայտվել է իրենց հիվանդածնությունը միմյանցից տարբերվող 3 խումբ:

Տվյալ տեսակի սահմաններում գոյություն ունի թույլ և ուժեղ հիվանդածին շտամներ: Ուսումնասիրված սնկերը կարող են բացասական ազդեցություն ցուցաբերել ծառաթփային տեսակների սերմային վերականգնման վրա ինչպես բնության մեջ, այնպես էլ տնկարանում աճեցնելու դեպքում:

ON PHYTOPATHOGENECITY OF SOME FUNGI ISOLATED
FROM FRUITS AND SEEDS OF XEROPHILOUS TREES
AND SHRUBS

S. A. SIMONIAN, T. H. MAMICONIAN

The pathogenecity of 7 species and 1 variety of fungi to their plantlets isolated from fruits and seeds of xerophilous trees and shrubs which are long-range planting greenery for arid zone of the Armenian SSR has been studied. Three groups of fungi differing in their pathogenecity have been revealed. Within one species there are intense and weak pathogenic strains. Studied fungi may negatively influence the growth of plantlets in nature and nurseries.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Давтян Г. С. Картофель и овощи, 4, 1964.
2. Долидзе И. И., Киримслашвили Н. С. Труды НИИ защиты раст. Груз. ССР, 27, 1975.

3. Казарян В. О., Арутюнян Л. В., Хуршудян П. А., Григорян А. А., Барсегян А. М. Научные основы облесения и озеленения Армянской ССР. Ереван, 1974.
4. Сенгеримян Я. А., Казарян А. В. Тез. докл. IV Закавказского совещания по спорам растений. Ереван, 1972.
5. Чумаков А. Е., Минкевич И. И., Власов Ю. И., Гагарилова Е. А. Основные методы фитопатолог. исслед. М., 1974.
6. Arja L. Folia forest, 408, 14 s., KUV, 1979. Реф. ж. Фитопатология, 5, 79, 159.
7. Harman G. E., Heit C. E., Pfleger F. L. Braverman S. W. Plant Disease reports 57 (7), 1973. New York Sta. Agric. Exp. Stn. USDA, Geneva. Rev. Plant. Pathol. 1974. 1833.
8. Neergaard P. Danish species of Alternaria and Stemphylium. London, 1979.
9. Ruokola A. L. Acta agr. scand. 29, 3, 1979. Реф. ж. Фитопатология, 1, 79, 124, 198

О ФУНКЦИОНАЛЬНОМ И ЦИТОЛОГИЧЕСКОМ ИЗУЧЕНИИ
ПОГЛОТИТЕЛЬНОЙ СПОСОБНОСТИ МАКРОФАГОВ

Р. А. ПЕТРОСЯН, Э. Д. СТЕПАНЯН

Ранее существующая концепция о ретикуло-эндотелиальной системе в настоящее время пересматривается в свете представлений о мононуклеарной фагоцитарной системе. Поэтому в настоящем исследовании делается попытка параллельного изучения поглотительной способности РЭС и мононуклеарных фагоцитов при воздействиях бактериального антигена и рентгеновских лучей на организм.

Ключевые слова: фагоцитоз, РЭС.

По мере накопления новых цитоиммунологических фактов учение о ретикуло-эндотелиальной системе (РЭС) Ашоффа [12] неоднократно подвергалось критике [2, 15]. Наиболее серьезные возражения выдвигались против ведущей роли эндотелиальных и ретикулярных клеток в осуществлении фагоцитоза. Основанием для этого служили классические исследования Мечникова [7] и Высоковича [4], согласно которым макрофаги имеют первостепенное значение в акте фагоцитоза. Более того, Мечников дифференцировал макрофаги на малые полиморфно-ядерные и большие мононуклеарные фагоциты и по сходству функций объединил их в единую «макрофагальную систему».

К настоящему времени классификация фагоцитов, предложенная Мечниковым, обогатилась и уточнилась современными цитологическими исследованиями [13, 14]. Поэтому в новом варианте она именуется теперь «мононуклеарной фагоцитарной системой» (МФС). В нее вошли главным образом промоноциты костного мозга, моноциты периферической крови и тканевые макрофаги. Эти клеточные образования объединены в целостную систему по сходству функций, морфологии, происхождения и кинетики. Причем нарочито подчеркивается высокая фагоцитарная деятельность мононуклеарных клеток по сравнению с менее активными ретикулярными и особенно эндотелиальными клетками. Однако деление клеточных элементов на высоко- и низкоактивные фагоциты удалось произвести в результате комплексного применения разнообразных методов изучения (цитологического, иммунологического, радиобиологического и пр.).

Несмотря на научную ценность подобного рода аналитических исследований, в практике изучения поглотительной способности макро-

фагоз нередко используют простые методы. К их числу прежде всего относится функциональная проба с конгорот, предложенная Адлером и Раймоном [11] для определения поглотительной способности элементов РЭС, а по некоторым литературным источникам, и макрофагов [1, 10].

Широкое применение данной пробы в клинических и экспериментальных исследованиях вызвало необходимость проверки ее показаний в свете современного представления о «мононуклеарной фагоцитарной системе». Поэтому нами сделана попытка параллельно изучить фагоспособность РЭС и макрофагов при воздействии рентгеновских лучей бактериального антигена на организм.

Материал и методика. Опыты ставились на белых крысах (120—150 г) обоего пола линии Вистар. Поглотительная способность РЭС определялась конгорот-пробой по Адлеру и Раймону [11] в модификациях Саканияна [8] и Степаняна [9]. С этой целью крысе внутривенно инъецировали раствор конгорот (0,2% 0,4/100 г) и спустя 4 и 30 минут пункцией сердца получали по 0,3 мл крови. Принятым нами способом в сыворотке обеих порций крови определяли индекс фагоцитоза. Величина индекса отражала отношение концентрации красителя в сыворотке второй (30-минутной) к первой (4-минутной) порций крови, применяемой за 100%. Повышение индекса указывало на стимуляцию, а понижение—на угнетение фагоспособности РЭС.

Фагоцитоз свободных макрофагов изучался обычным путем *in vivo* с применением убитой 24-часовой культуры золотистого стафилококка (*St. aureus*) и последующим выведением процента фагоцитирующих клеток (индекс фагоцитоза) [6]. Макрофаги добывали из перитонеального экссудата по Ильину и Кязимовой [5] с использованием только питательной среды № 199 и бычьей сыворотки.

Кроме того, по специально разработанному нами экспресс-методу подсчитывалось количество макрофагов (звездчатые эндотелиоциты) в печени белых крыс. Суть его состоит в том, что у декаптитированной крысы печеночная ткань фиксировалась и окрашивалась ацетокармином. Затем готовились давленные препараты, подсчитывалось в 100 полях зрения общее количество макрофагов и печеночных клеток и выводилось процентное содержание макрофагов. Количество моноцитов в мазках периферической крови подсчитывалось обычным гематологическим методом.

Животных иммунизировали однократно посредством внутривенной инъекции 0,2 мл (2 млрд. бактериальных тел) убитой бруцеллезной культуры (*Bg. bovis*) штамма № 19. Тотальное облучение крыс производилось в сублетальной дозе 300 р на рентгеновской установке РУМ-11. Наблюдения за подопытными и контрольными животными производились в динамике через 3 ч, а также 1, 4, 8 и 12 дней после соответствующих вмешательств.

Результаты и обсуждение. Из табл. 1 следует, что спустя 3 ч после внутривенной инъекции бруцеллезного антигена фагоцитоз РЭС прогрессивно нарастает и, достигнув на 4-й день максимума, постепенно на 12-й день возвращается к исходному уровню. Сходная картина наблюдалась и у макрофагов перитонеального экссудата, фагоцитирующих золотистые стафилококки. В этих же условиях синхронно с постантгенной стимуляцией фагоцитоза РЭС и макрофагов повышалось процентное содержание моноцитов периферической крови, а также макрофагов перитонеального экссудата и печеночной ткани.

Несколько иные результаты получены при облучении крыс в дозе 300 р (табл. 2). Действительно, через 3 ч после облучения поглотительная способность РЭС кратковременно подавлялась. В дальнейшем фа-

Таблица 1

Функциональные и количественные изменения фагоцитов при воздействии
бактериального антигена на организм

Серия	Условия опыта	Сроки исследования, дни	Индекс фагоцитоза, %		Количество, %		
			РЭС	макрофагов	моноцитов крови	макрофагов	
						перитонеально-го экссудата	печени
1	Контроль		53±1,10 (10)	18±0,44 (6)	0,9±0,06 (10)	12±0,90 (5)	18±0,50 (5)
2	Инъекция антигена	3 ч	62±1,40	25±0,61 (5)	3,2±0,13	31±0,80 (6)	28±0,50 (5)
		1	65±0,90	28±0,85 (5)	5±0,35	36±1,30 (5)	35±0,70 (5)
		4	71±1,00	35±0,80 (5)	3,5±0,17	47±0,80 (6)	47±0,80 (6)
		8	60±0,90	23±0,84 (5)	2,1±0,15	22±1,00 (5)	24±0,47 (5)
		12	50±1,40	20±0,95 (5)	2,4±0,11	20±1,10 (5)	20±1,50 (5)
	$P < 0,01-0,2$						

Примечание: в скобках указывается количество животных.

Таблица 2

Функциональные и количественные изменения фагоцитов при облучении
белых крыс в дозе 300 р

Серия	Условия опыта	Сроки исследования, дни	Индекс фагоцитоза, %		Количество, %		
			РЭС	макрофагов	моноцитов крови	макрофагов	
						перитонеально-го экссудата	печени
1	Король		52±1,28 (10)	16±0,56 (6)	1,4±0,07 (10)	14±0,7 (5)	2±0,12 (6)
2	Облучение, 300 р	3 ч	33±1,57	9±0,15 (5)	0,9±0,05	10±1,40 (5)	15±0,17 (5)
		1	60±0,80	25±0,83 (6)	0,8±0,07	30±1,1 (6)	29±0,85 (5)
		4	66±1,80	32±0,97 (6)	2,1±0,60	29±0,7 (5)	52±1,20 (5)
		8	69±0,69	20±0,79 (5)	2,5±0,08	20±1,2 (5)	23±0,50 (5)
		12	57±0,63	20±0,95	1,8±0,90	—	—
	$P < 10,2$						

Примечание: в скобках указывается количество животных.

гоцитоз с нарастающей силой активизировался, достигая наивысшей точки на 8-й день, а на 12-й—приближался к исходной величине. Такая же динамика изменения отмечалась и у макрофагов, фагоцитирующих

стафилококки. Параллельно с волнообразным изменением фагоцитоза РЭС и макрофагов количество моноцитов периферической крови, а также макрофагов брюшной полости и печеночной ткани через 3 ч после облучения животных кратковременно понижалось. Однако в последующие сроки наблюдения их число заметно увеличивалось.

Прежде всего заслуживают внимания синхронные изменения РЭС и макрофагов при воздействиях бактериального антигена или рентгеновских лучей на организм. Основываясь на этой общей закономерности, мы имеем возможность высказать следующие соображения. Биологическим объектом действия бактериального антигена и рентгеновских лучей являются одни и те же реагирующие системы, и в том числе элементы РЭС и макрофаги организма. Применяемые нами функциональные и количественные методы изучения фагоцитоза одинаково точно и объективно отражают состояние РЭС и макрофагов. Поглотительная способность элементов РЭС и фагоцитарные свойства мононуклеарных клеток взаимосвязаны. Функциональная проба с конгорот позволяет определять как поглотительную способность элементов РЭС, так и фагоцитарные свойства макрофагов. Кстати, на возможность поглощения конгорот макрофагами указывают не только некоторые авторы [1, 10], но и наши специально поставленные опыты. Так, инкубирование свежей печеночной ткани в 1 мл среды № 199 с добавлением 0,3 мл 2%-ного раствора конгорот вызывало зернистое накопление красителя в макрофагах (звездчатые эндотелиоциты). Аналогичное поглощение красителя наблюдалось и макрофагами перитонеального экссудата при внутрибрюшинном введении 0,4 мл/100 г 0,4%-ного конгорот в 10—15 мл среды № 199 белым крысам.

Перечисленные соображения по-разному указывают на функциональное сходство поглотительной способности РЭС и макрофагов. Однако говоря о сходстве их функций, мы далеки от мысли ставить знак равенства между ними. Ибо по интенсивности протекания фагоцитоза в элементах РЭС и макрофагах они значительно отличаются друг от друга. Достаточно сослаться на то, что во все сроки наблюдения фагоцитоз РЭС после инъекции бактериального антигена в среднем повышался в 1,5 раза меньше, нежели у макрофагов перитонеального экссудата (табл. 1). Подобные расхождения в фагоцитозе еще более резко были выражены у облученных животных (табл. 2).

Правда, условия изучения фагоцитоза РЭС и макрофагов были идентичными. Однако полученные при этом результаты оказались настолько демонстративными, что позволяют признать правомерным существующее в настоящее время представление, согласно которому мононуклеарные клетки обладают более высокой фагоцитарной активностью, нежели элементы РЭС [13, 14].

Правомерность современной концепции о МФС, особенно по части происхождения макрофагов от подвижных моноцитов крови, в определенной мере подтверждается и нашими косвенными данными. Здесь в первую очередь имеется в виду параллельное нарастание количества

моноцитов крови, а также макрофагов в брюшной полости и печеночной ткани при воздействиях бактериального антигена и рентгеновских лучей на организм.

В заключение отметим, что результаты, полученные различными функциональными и количественными методами изучения фагоцитоза РЭС и макрофагов, выглядят достаточно убедительно. Однако важность затронутых в настоящем исследовании вопросов выдвигает необходимость дальнейшего их разрешения с помощью применения какого-либо одного унифицированного метода.

Армянский НИИ животноводства и ветеринарии

Поступило 12.XII 1980 г.

ՄԱԿՐՈՖԱԳԵՐԻ ԿԼԱՆՈՂԱԿԱՆՈՒԹՅԱՆ ՖՈՒՆԿՑԻՈՆԱԼ
ԵՎ ԲՋՋԱՐԱՆԱԿԱՆ ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ռ. Ա. ՊԵՏՐՈՍՅԱՆ, Է. Դ. ՍՏԵՓԱՆԻԱՆ

Ելնելով մոնոնուկլեարային ֆագոցիտար սիստեմի ժամանակակից պատկերացումներից՝ ուսումնասիրվել է ՌԷՍ-ի էլեմենտների կլանիչ հատկությունը և մոնոնուկլեար բջիջների վիճակը սպիտակ առնետների մոտ՝ միկրոբային հակածին և ռենտգենյան ճառագայթների ազդեցությամբ:

Փորձերի արդյունքները ցույց տվեցին, որ վերոհիշյալ զրգռիչների ազդեցությամբ ՌԷՍ-ի ֆունկցիոնալ և մակրոֆագերի փոփոխությունները հիմնականում ընթանում են սինխրոն:

Հիմնվելով այս օրինաչափության վրա, արվում է որոշ ենթադրություններ՝ մակրոֆագերի հետ ռետիկուլյար և էնդոթելային բջիջների ֆունկցիոնալ փոխազդեցության և այն կոնգորտ-նմուշով ուսումնասիրելու հնարավորության մասին:

ON THE FUNCTIONAL AND CELLULAR STUDY
OF MACROPHAGE ABSORTION

R. A. PETROSSIAN, E. D. STEPANIAN

An attempt of parallel study of absorbing ability of RES (reticular-endothelial system) and mononuclear phagocytes on the organism under the effect of bacterial antigen and x-ray irradiation has been made.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аничков Н. Н. Учение о ретикуло-эндотелиальной системе. М.—Л., 1930.
2. Богомолец А. А. Физиологическая система соединительной ткани. Киев, 23—43. 1941.
3. Воробьев А. И., Лорин Ю. И. Новое в гематологии. М., 1974.
4. Высоковы В. К. Избранные труды. М., 1954.
5. Ильин Г. И. и Кязимова А. А. Лабораторное дело, 6, 361, 1968.
6. Кротова М. Р. ЖМЭИ, 7, 22—26, 1971.
7. Мечников И. И. Избран. произв., М., 263—343, 1956.

8. Сакалян С. Ш. Докт. дисс., Ереван, 1950.
9. Степанян Э. Д. Лабораторное дело, 2, 25—28, 1963.
10. Титов К. Г. Значение исследования ретикуло-эндотелиальной системы костного мозга в клинике у детей и в эксперименте. Ташкент, 1959.
11. Adler H., Reim F. Exper. Medizin. Berlin. 47, 5—6, 1925.
12. Aschoff L. Das reticuloendothelial system. Ergebn. inn. Med. u. Kinderheilk, 2, 1, 1924.
13. Furth R. van, Cohn Z. A., Hirsch Y. G., Humphrey Y. H., Spector W. G., Langerhans H. L. Bull. Wld. Hlth. Org. 46, 845—852, 1973.
14. Furth R. van, Cohn Z. A. J. Exptl. Med., 128, 3, 415, 1968.
15. Maximov A. A. Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen. 2, part. Berlin, Springes, 1927.

АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЕ У ОБЫКНОВЕННЫХ ПОЛЕВОК ПРИ ПОВТОРНОМ ЗАРАЖЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЕМ ЧУМЫ

А. Е. СУВОРОВА, А. Г. МНАЦАКАНЯН, А. А. ВАРТАНЯН,
 М. Т. ШЕХИКЯН, В. В. ОГАНЕСЯН

Установлено, что синтез антител при вторичном заражении у полевок происходит более активно, чем при однократном инфицировании их.

Вторичное заражение полевок на фоне снижения антител вызывает образование как полных, так и неполных антител. Среди обыкновенных полевок, повторно зараженных возбудителем чумы, в отличие от малых сусликов, встречаются особи с отрицательными показателями серологических реакций.

Ключевые слова: обыкновенная полевка, антителообразование, чума.

Серологическому методу исследований при чуме в настоящее время придают важное значение [4]. Оценка результатов серологических реакций требует творческого подхода, так как в числе носителей чумы могут быть грызуны с широким диапазоном варьирования естественной иммунологической реактивности, восприимчивости и инфекционной чувствительности.

В ходе развития эпизоотий в очагах чумы не исключено повторное инфицирование животных, поэтому представляет интерес изучение иммунологической реактивности не только после разового попадания возбудителя в организм, но и особенности ответной иммунологической реакции на повторное инфицирование животных, выживших после первичного заражения.

Характер ответной иммунологической реакции при чуме на реинфекцию достаточно хорошо изучен в опытах на большой песчанке [5, 6] и малом суслике [8]. Установлено, что повторное инфицирование чумой этих зверьков стимулирует более выраженную продукцию специфических антител, при этом в основном происходит синтез полных антител [8, 10]. Это объясняется общеизвестной биологической закономерностью механизмов иммуногенеза [3].

Касаясь природного очага чумы «полевочьего» типа, следует отметить, что популяция основного носителя характеризуется выраженной индивидуальной чувствительностью к возбудителю чумы [9], поэтому в ходе эпизоотий значительная часть инфицированных чумой полевок выживает и может подвергнуться повторному заражению. Это обусловило необходимость выяснения особенностей иммунологической реак-

тивности полевок после реинфекции. Нам известна лишь одна работа подобного рода [2], согласно данным которой при повторном заражении встречаются особи с высокими титрами гематоглобину в РПГА и особи с отрицательными иммунологическими реакциями, даже после введения высокой инфицирующей дозы, 10^5 микробных тел м. т. Однако на основании этих данных не представлялось возможным судить о динамике синтеза специфических антител при реинфекции полевок возбудителем чумы, так как наблюдения проводились только в один срок.

В настоящем сообщении представлены результаты изучения синтеза антител к Ф I возбудителя чумы на фоне высокого содержания антител и в период снижения его после первичного заражения.

Материал и методика. Полевок отлавливали на территории Армянской ССР в районах, где никогда не регистрировались эпизоотии чумы и выдерживали до постановки опыта в карантине в течение 15-ти суток. Из числа отловленных 10 полевок исследовали на наличие специфических антител к возбудителю чумы. Всех полевок, павших за период наблюдения, и 5 выживших в целях дополнительного контроля на отсутствие естественной зараженности исследовали на чуму. Результаты бактериологических и серологических исследований были отрицательными.

Для заражения полевок использован штамм *Yersinia pestis* 2048, выделенный от блох в Гужасянском районе Армянской ССР. Штамм обладал типичными для полевоочной разновидности чумного микроба признаками. В опытах на здоровых полевках LD_{50} этого штамма равнялась 10^4 м. т.

В опыт взято 250 полевок которые были заражены подкожно в правую паховую область культурой штамма 2048 в дозе 10^4 м. т. Зараженных зверьков наблюдали в течение месяца, подвергая бактериологическому и серологическому исследованию всех павших. За месяц пало 116 полевок, из них от 70, погибших в первые семь дней после заражения, из крови, лимфатических узлов и внутренних органов выделяли возбудитель чумы. Выживших полевок исследовали серологически через 5, 10, 20 и 30 дней после заражения, по 10 животных на каждый срок.

Полевки, не павшие к 30-му дню после первичного заражения, были разделены на 4 группы, по 25 экз. в каждой. Первую группу зверьков заражали на 30-й день после первичного инфицирования, вторую—на 90-й день, т. е. в сроки, соответствующие достаточно высокому содержанию антител к Ф I возбудителя чумы и значительному снижению его [7]. Первые две группы животных инфицировали культурой штамма 2048 в дозе, равной одной LD_{50} (10^4 м. т.). Третья и четвертая группы служили в качестве контроля.

Подопытных зверьков первых двух групп исследовали серологически и бактериологически через 5, 10, 20, 30, 45 дней после реинфицирования. Животных третьей группы исследовали через 35, 40, 50, 60, 75 дней после первичного заражения, т. е. одновременно с животными первой опытной группы. Полевок четвертой группы исследовали через 95, 100, 110, 120, 135 дней после первичного заражения. В каждый срок исследовали по 5 зверьков.

Серологические исследования проводили в соответствии с «Инструкцией по применению серологических методов...» (Саратов, 1974). Бактериологические исследования осуществляли путем отпечатков внутренних органов, крови и лимфатических узлов на агаровые пластины. Статистическая обработка результатов проводилась по Ашмарину и Воробьеву [1].

После 30-ти суток в контроле и в группах, повторно зараженных возбудителем чумы, положительных результатов бактериологических исследований зарегистрировано не было. Гибель полевок в группах, повторно зараженных возбудителем чумы, не отмечалась.

Результаты и обсуждение. Анализируя изменения титров антител в группе полевок, зараженных повторно через 30 дней после первичного инфицирования, необходимо отметить, что уже на пятый день после повторного заражения титр серологических реакций по сравнению с титрами антител животных, зараженных однократно, повышен. В момент повторного заражения средний геометрический титр РПГА составил $1:112 \pm 1:13$, через пять дней произошло увеличение его до $1:160 \pm 1:10$. Различие в титрах РНАГ было менее выраженным и соответственно составляло $1:185 \pm 1:40$ и $1:90 \pm 1:30$. Незначительные различия в указанных показателях свидетельствуют о продукции в основном полных антител.

Нарастание титров серологических реакций у полевок, повторно зараженных на 30-е сутки, происходило в течение 20-ти дней после повторного заражения. Наивысший титр РПГА составил $1:225 \pm 1:60$ при индивидуальных показателях от $1:80$ до $1:640$; в РНАГ— $1:280 \pm 1:30$ при колебаниях от $1:160$ до $1:640$. Полученные нами величины РПГА оказались значительно ниже показателей, полученных Дятловым [2]. Различие в титрах серологических реакций, на наш взгляд, можно объяснить методом и дозой заражения. А. И. Дятлов первичное заражение полевок проводил внутрибрюшинно, повторное—подкожно, в дозе 10^8 м. т. В наших опытах применялось только подкожное заражение и в значительно меньшей дозе, 10^4 м. т.

Увеличение полных антител к Ф 1 чумного микроба в группе полевок, повторно зараженных через 90 дней после первичного инфицирования, т. е. на фоне невысоких титров серологических реакций (РПГА— $1:40$; РНАГ— $1:80$), происходило также быстро, на пятый день после повторного заражения. Титр РПГА увеличился до $1:112 \pm 1:40$, титр неполных антител остался на уровне, отмеченном в момент повторного заражения. На 10-й день после повторной встречи с возбудителем чумы титр РПГА увеличился до $1:160 \pm 1:50$, а титр РНАГ— почти в три раза, $1:206 \pm 1:25$. Индивидуальные показатели колебались в РПГА от $1:80$ до $1:640$, в РНАГ— от $1:160$ до $1:640$.

Нарастание титров антител у полевок данной группы происходило также в течение 20 дней, как и у полевок, зараженных повторно через 30 дней после первичного заражения. Однако титры реакций в этой группе животных оказались выше, чем в группе, повторно зараженной на фоне относительно высокого содержания антител. У полевок второй группы на 20-й день титр антител составил $1:484 \pm 1:110$. Титры РНАГ в этот срок были максимальными и превышали их в РПГА примерно в два раза. Снижение титров серологических реакций после повторного заражения в срок, отдаленный от первого заражения, начинается с 30-го дня, причем снижение титров неполных антител происходит быстрее, чем полных, и к 45-му дню показатели реакций сравниваются, составляя $1:250 \pm 1:30$.

Следует отметить, что во все сроки исследования полевок, повторно зараженных возбудителем чумы, были животные, у которых выявить на-

ляние антител к Ф 1 возбудителя чумы не удалось. Серологические реакции были получены в $36,3 \pm 8,3\%$ случаев. В группе полевок, повторно зараженных через 90 дней, число серонегативных животных было несколько ниже, $21,8 \pm 7,2\%$.

Полученные нами результаты в определенной степени согласуются с данными Дятлова [2], согласно которым среди полевок встречается значительное число особей, у которых при повторном заражении возбудителем чумы отсутствует способность к образованию специфических антител, что отличает этих животных от малых сусликов, которые при вторичной встрече с возбудителем чумы во всех случаях вырабатывают специфические антитела [8].

На основании полученных данных можно считать, что синтез антител у полевок, зараженных вторично, происходит более активно, чем при однократном инфицировании. Повторная встреча с возбудителем чумы в срок, совпадающий с относительно высоким содержанием антител, выработавшихся в результате первого заражения, сопровождается синтезом преимущественно полных антител. Вторичное заражение полевок на фоне снижения антител вызывает образование как полных, так и неполных антител. Среди обыкновенных полевок, повторно зараженных возбудителем чумы, в отличие от малых сусликов, имеются особи с отрицательными показателями серологических реакций.

Научно-исследовательский противочумный институт Кавказа и Закавказья,
Армянская противочумная станция

Поступило 10.III 1980 г.

**ՍՈՎՈՐԱԿԱՆ ԳԱՇՏԱՄԿՆԵՐԻ ՄՈՏ ՀԱԿԱՄԱՐՄԻՆՆԵՐԻ ԱՌԱՋԱՑՈՒՄԸ
ԺԱՆՏԱԽՏԻ ՀԱՐՈՒՑԻՉՈՎ ԿՐԿՆԱԿԻ ՎԱՐԱԿՄԱՆ ԳԵՊԲՈՒՄ**

Ա. Ե. ՍՈՎՈՐՈՎԱ, Ա. Գ. ՄԵԱՏԱԿԱՆՅԱՆ, Ա. Ա. ՎԱՐԿԱՆՅԱՆ,
Մ. Տ. ՇԵՆԿՅԱՆ, Վ. Վ. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

Փորձնական հետազոտությունների հիման վրա հաստատված է, որ սովորական դաշտամկան մոտ հակամարմինների կրկնակի սինթեզը տեղի է ունենում ավելի ակտիվ, քան հակամարմինների արտադրվելը միանվագ վարակման ժամանակ:

Հակամարմինների պակասող ֆոնի վրա դաշտամկանների կրկնակի վարակումը առաջ է բերում ինչպես լիարժեք, այնպես էլ ոչ լիարժեք հակամարմիններ:

Ժանտախտի հարուցիչով կրկնակի վարակված սովորական դաշտամկանների մոտ, ի տարբերություն փոքր ասիական պոնտական մկանների, լինում են անհատներ սերոլոգիական անակցիաների բացասական ցուցանիշներով:

THE FORMATION OF ANTIBODY IN ORDINARY FIELD-VOLES UNDER REPEATED INFECTION BY PLAGUE STIMULUS

A. E. SUVOROVA, A. G. MNATSAKIAN, A. A. VARTANIAN,
M. T. SHEKHNIKIAN, V. V. HOVHANNISSIAN

It has been established that repeated synthesis of antibodies in field-voles proceeds more active than under momentary infection. Secondary infection of field-voles against a background of antibody lowering gives rise to the formation of full and not full antibodies. Among ordinary field-voles infected repeatedly by plague stimulus in contrast to small gophers an individuals with negative indices of serological reactions have been met.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин Н. Р., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л., 1962.
2. Дятлов А. И., Галоян В. О., Осипова С. П., Петров П. А., Аракелян Н. А., Нерсисян О. А. Тез. докл. научн. конф. МОИП, 22—24. Ставрополь, 1972.
3. Зильбер А. А. Основы иммунологии. М., 1958.
4. Лидный И. Д., Милютин В. Н., Дрожжевкина М. С., Микаровская Л. Н. ЖМЭИ, 11, 42—50, 1977.
5. Новикова Т. А., Першин И. Б., Губайдулина В. С., Решетникова П. И., Свирилов Г. Г., Куницкий В. Н. Мат-лы VII научн. конф. противочум. учрежд. Ср. Азии и Казахстана, 148—151, Алма-Ата, 1971.
6. Пейсахис Л. А., Стогова А. Г., Лопатина Н. Ф. и др. Мат-лы научн. конф. по природной очаговости и профилактике чумы, 176—178, Алма-Ата, 1963.
7. Розанова Г. Н., Елкин Ю. М., Осипова С. П., Лалазарова И. Г., Галоян В. О. Тез. III научно-практ. конф. противочумных учреждений Кавказа по природной очаговости, эпидемиологии и профилактике особо опасных инфекций. 107—109, Ставрополь, 1974.
8. Топорков В. П., Марин С. Н., Бережнов А. З., Балухин В. Н., Подсвилов А. Е. Пробл. особо опасн. инфекц., вып. 5 (45), 18—22, 1975.
9. Юндин Е. В. Обыкновенная полевка как носитель чумы в Юго-восточных районах Армянской ССР. 16, Саратов, 1966.
10. Яхъев А. Д., Канатов Ю. В., Мат-лы VIII научн. конф. противочумн. учреждений Ср. Азии и Казахстана, 150—153, Алма-Ата, 1974.

ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ФУНГИЦИДНОГО ПРЕПАРАТА РОВРАЛЬ
НА ВЫСШЮЮ НЕРВНУЮ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ БЕЛЫХ КРЫС

С. Е. ГАРИБЯН, С. А. АРУТЮНЯН, А. А. АСМАНГУЛЯН

Изучалось влияние нового фунгицидного препарата ровраль на высшую нервную деятельность белых крыс. По показателю условнорефлекторных реакций установлен порог острого токсического действия исследуемого препарата на уровне 50 мг/кг.

Ключевые слова: фунгицид, ровраль.

Вопрос о неблагоприятном влиянии на организм постоянно действующих раздражителей небольшой интенсивности связан с проблемой гигиенического нормирования. Одним из подходов такого рода нормирования является проведение экспериментальных исследований на животных, что требует разработки и применения достаточно чувствительных методов. В любом токсикологическом эксперименте проводится оценка функционального состояния нервной системы—системы, интегрирующей организм. В настоящем исследовании оценка функционального состояния нервной системы проводилась с использованием метода условных рефлексов. Методика оборонительных условных рефлексов широко используется как у нас [1—4], так и за рубежом [5—7] для выявления механизма действия токсических веществ и установления пороговых уровней. Нами использовалась методика оборонительных условных рефлексов для мелких лабораторных животных [7].

Материал и методика. Исследованию подвергнут новый фунгицидный препарат ровраль французской фирмы «Рон-Пуленк», предложенный для применения против широкого спектра грибов на различных сельскохозяйственных культурах. Препарат представляет собой 1—изопропил-карбомил—3 (3,5 дихлорфенил)—гидантонил. Анализ структурной формулы ровраля показал, что его основным структурным компонентом является пятичленное тетероциклическое кольцо гидантоина, к которому присоединен дихлорфенильный радикал. Сходное строение имеет дифенил (5,5—дифенил-гидантонил), являющийся противосудорожным препаратом. Он предупреждает судороги, вызываемые электрическим раздражением мозга, посредством торможения распространения патологического возбуждения по мозгу. Известно также, что продукты замещения водорода галогеном в бензольном кольце обладают некоторыми наркотическими свойствами. Вместе с тем, клиника острой интоксикации ровралем дает основание предположить, что препарат влияет на центральную нервную систему. После введения препарата в дозах, близких к среднесмертельным, через 30—40 мин животные падали в заторможенное состояние, двигательная активность резко снижалась, однако тонус мышц сохранялся. Подобное состояние постепенно усиливалось и длилось при малых дозах до 10—11 дня наблюдения, а при больших—завершалось летальным исхо-

дом. Ровраль относится к группе малотоксичных соединений. Среднесмертельная доза (ДЛ₅₀) крыс равна 3200, мышей—2800, кроликов—2700 мг/кг. Для определения порога острого действия нами были выбраны, кроме условнорефлекторной методики, следующие показатели: порог нервномышечной возбудимости, выведение гиппуровой кислоты с мочой, активность аспартат и аланин аминотрансфераз, деметилазы амипоипирина системы оксидаз смешанной функции (ОСФ). Статистически достоверное изменение в сторону увеличения активности имело место лишь в системе ОСФ на уровне 340 и 100 мг/кг.

Условнорефлекторные эксперименты проводились в экспериментальной камере, представляющей собой прозрачный плексигласовый ящик с вертикальным деревянным стержнем в середине крышки. Дно камеры было выстлано металлической решеткой с расстоянием между спицами 1,5 см. Условным раздражителем служил электрический звонок, изолированное действие которого составляло 3 сек. В качестве безусловного раздражителя использовался электрический ток с напряжением 60 в.

Опыты проводились на 24 половозрелых белых крысах массой до 200 г, которые были распределены на 4 группы по 6 животных. Одна группа служила контролем, остальные три группам на фоне упроченного оборонительного рефлекса вводились однократно внутривентрикулярно в виде водных растворов следующие дозы препарата: 100, 50, 25 мг/кг. Показатели снимались через 1, 3, 5 ч после введения и на вторые, третьи сутки—до полного восстановления условнорефлекторной деятельности (УРД).

В начале эксперимента в группы были выбраны крысы с идентичными типологическими особенностями высшей нервной деятельности. Эксперименты начинались с приучения крыс к экспериментальной обстановке—камере, звонку, на что обычно уходило 6—7 опытных дней. Этого времени было достаточно для угасания ориентировочной реакции крыс. Лишь после этого приступали к выработке отставленного оборонительного условного рефлекса. Каждый опытный день применяли 10 сочетаний условного раздражителя с безусловным с промежутками между ними в 1—3 мин. После 50—70 сочетаний у крыс появлялись первые прыжки на стержень, к 120—150—рефлексы становились упроченными. По мере выработки отставленного условного рефлекса прыжок крысы постепенно сдвигался к моменту электрического подкрепления. В дальнейшем, когда рефлекс был упрочен, прыжок осуществлялся непосредственно перед подкреплением. В опыт отбирали лишь тех крыс, которые в течение пяти опытных дней давали положительные ответы на все 10 сочетаний. Правильными ответами мы считали лишь те прыжки, которые совершала крыса по истечении 3 сек изолированного действия условного раздражителя. Известно, что период изолированного действия условного раздражителя при отставленном рефлексе характеризуется развитием начальной тормозной фазы. Это проявлялось и в поведении животных—крысы либо находились в дремотном состоянии, либо, спокойно сидя, выжидали 3 сек действия условного сигнала. Таким образом, после упрочения отставленного условного рефлекса мы имели возможность судить о действии препарата на тормозную и возбуждательную фазы рефлекса.

Результаты и обсуждение. Через час после введения препарата в дозе 100 мг/кг у крыс вновь появлялась ориентировочная реакция, выражающаяся в прыжках на стенки камеры, сильных вздрагиваниях при предъявлении условного раздражителя, нарушении ориентации, в беспокоестве. Наблюдались срывы условнорефлекторных реакций, бесконечные межсигнальные прыжки на стержень. В тех случаях, когда в ответ на условный сигнал крысы совершали прыжок, они не были в состоянии удержаться на нем и скатывались на наэлектризованную решетку. Наибольшая степень угнетения УРД отмечалась через 3 ч после введения препарата (рис.). Увеличивалось число выпадений условнорефлекторных реакций, животные были дезориентированы, на звонок реа-

гировали хаотичными поисками стержня, и, не найдя его, прыгали на стенки камеры, а иногда оставались неподвижными, не реагируя даже на последующее электрическое раздражение. Немаловажное значение имело для нас выяснение характера действия препарата на первую— тормозную фазу отставленного условного рефлекса. Оказалось, что введение роврала нарушает процесс запаздывания при отставленном ус-

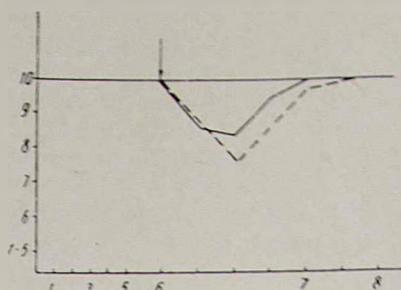


Рис. Динамика изменений условнорефлекторной деятельности белых крыс под действием препарата ровраль. По оси абсцисс—дни исследования—(1, 2, 3, 4, 5.— до введения препарата; 6— стрелкой обозначен день затравки, деления без цифр—1, 3, 5—часы после введения роврала, 7 и 8—вторые и третьи сутки после введения препарата). По оси ординат— число сочетаний. Сплошная горизонтальная линия после введения препарата—контрольная группа и группа, подучившая 25 мг/кг, сплошная ломаная—50, пунктирная—100 мг/кг. График составлен на основании средних арифметических данных для каждой группы.

ловном рефлексе—те прыжки, которые крыса осуществляла, совершались, как правило, с начала включения условного раздражителя. Через три часа после введения препарата нарушения УРД убывали и к концу вторых суток полностью исчезали. При введении 50 мг/кг роврала были выявлены аналогичные нарушения, выраженные, однако, сравнительно слабее. Угнетение УРД у затравленных крыс наиболее четко наблюдалось также через три часа после введения препарата, однако восстановление шло быстрее— к началу вторых суток на все 10 сочетаний крысы давали правильные ответы. Введение препарата в дозе 25 мг/кг не оказывало действия на протекание условных рефлексов на всем протяжении исследования (рис.). С целью выяснения, являются ли вышеописанные сдвиги УРД результатом механического воздействия на стенки желудка, контрольной группе животных внутрижелудочно вводили воду. При этом сдвигов УРД не было обнаружено (рис.).

Выявленное в экспериментах угнетение, ослабление УРД свидетельствуют о воздействии препарата на кору и подкорковые структуры мозга. Нарушение высшей нервной деятельности можно связать с ослаблением подготовительных, тонизирующих механизмов мозга, обеспечивающих оптимальный уровень активности нейронных структур анализаторов условных и безусловных рефлексов, который необходим для реализации выработанных форм поведения животного. Факт воздействия препарата как на тормозную, так и на возбуждательную фазы от-

ставленного условного рефлекса дает нам основание заключить, что препарат вызывает ослабление нервных процессов—возбуждения и торможения—и нарушает их баланс. Степень указанных нарушений и длительность восстановительного периода находятся в прямой зависимости от дозы вводимого препарата.

По показателю УРД установлен порог острого однократного действия препарата ровраль на уровне 50 мг/кг.

Всесоюзный НИИ гигиены и токсикологии пестицидов,
полимеров и пластических масс (ВНИИГИНТОКС)

(Армянский филиал)

Поступило 1.VIII 1980 г.

ՆՈՐ ՀՈՒՆԳԻՑԻԿԱՅԻՆ ՊՐԵՊԱՐԱՏ ՌՈՎՈՒԱԼԻ ԱԶՂԵՑՈՒԹՅԱՆ
ՌԻՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍՊԻՏԱԿ ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ԲԱՐՉՐԱԳՈՒԹՅԱՆ
ՆՅԱՐԳԱՅԻՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԻ ԳՈՐԾՈՒՆԵՆՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ս. Ե. ԳԱՐԻԲՅԱՆ, Ս. Ա. ՀԱՐՈՒԹՅՈՒՆՅԱՆ, Ա. Ա. ԱՍՄԱՆԳՈՒԼՅԱՆ

Ռուլալ պրեպարատի սուր շեմային ազդեցություն մեխանիզմը որոշելու համար օգտագործվել է պաշտպանական պայմանական ռեֆլեքսների մեթոդը: Հայտնաբերվել է, որ պրեպարատը 100 մ և 50 մգ/կգ դեղաչափերով փորձնական կենդանիների ստամոքսը ներմուծելու դեպքում խափանում է հետաձգված պայմանական ռեֆլեքսի ուղացումը, ինչպես նաև առաջացնում է պայմանական ռեֆլեկտոր ռեակցիայի անկում և փորձնական կենդանիների ապակողմնորոշում:

25 մգ/կգ դեղաչափի ստացող փորձնական կենդանիների խմբում բարձրագույն ներվային համակարգի ռեֆլեկտոր գործունեության փոփոխություններ չեն արձանագրվել:

Ամփոփելով ստացված տվյալները, կարելի է եզրակացնել, որ 50 մգ/կգ դոզան համարվում է շեմային:

THE EFFECT OF A NEW FUNGICIDE ROVRAL ON HIGHER
NERVOUS ACTIVITY OF ALBINO RATS

S. E. GARIBIAN, S. A. HAROUTJUNIAN, A. A. ASMANGULIAN

The article deals with Rovral, a new fungicide, developed by Rhone-Poulenc as a broad-spectrum antifungal preparation, its threshold of acute toxic action is determined according to the index of the conditioned reflex activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Белов Д. М., Крылов С. С., Снегирев Е. А. Журн. высш. нервн. деят., 5, 12, 969, 1962.
2. Лебедев К. В. Журн. высш. нервн. деят., 1, 11, 190, 1961.
3. Рябиновская А. М. Тр. ин-та высш. нервн. деятельности АН СССР. Серия физиол., 4, 152, 1960.
4. Хелми Р. М. Фармакология и токсикология, 2, 137, 165.
5. Desl I. and Sos J. XV Congress Inter. de med. du travail., 9, 19, 1966.
6. Horvath M., Frantic E., Mikuskova H. Tractats of Symposium „Higher nervous functions and occupational health“, Prague, 12, 1966.
7. Knoll J., Knoll B. Arzneimittel-Forsh, Bd. 8, 330, 1958.

ՀԱՄԱՐԻՑ ՀԱՎՈՐՈՒՄՆԵՐ

NDK 576.8.095+577.1.576.851.5

BAC. SUBTILIS-MESENTERICUS ԽՄԲԻ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ
ՅՈՒՐԱ-ՀԱՏՈՒԿ ՖԻԶԻՈԼՈԳԻԱ-ԲԻՈՔԻՄԻԱԿԱՆ ՀԱՏԿԱՆԻՇՆԵՐԸ

Ա. Մ. ՄԱՆԱՍՅԱՆ

Բանալի բաներ. *Bac. subtilis mesentericus*:

Աէրոբ սպորավոր բակտերիաները շատ տարածված են բնության մեջ և մեծ դեր են խաղում տարբեր բիոլոգիական և հողառաջացման պրոցեսներում:

Bac. subtilis-mesentericus խմբի բակտերիաները մեծ չափով տարածված են հողում, օժտված են ուժեղ արտահայտված անսուազոնիստական հատկություններով և հանդիսանում են բազմաթիվ ֆիզիոլոգիայես ակտիվ միացությունների պրոդուցենտներ [1]:

Մեր աշխատանքների հիմնական նպատակն է եղել, էլենյով *Bac. subtilis-mesentericus* խմբի բակտերիաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական հատկանիշների ուսումնասիրությունից, հատուկ ուշադրություն դարձնել այդ տեսակի դիֆերենցիալ հատկանիշների մշակման վրա՝ նրանց ճիշտ տեսակավորելու համար:

Նյութ և մեթոդ. Ուսումնասիրվել է աէրոբ սպորավոր բակտերիաների *Bac. subtilis-mesentericus* խմբին պատկանող 45 շտամների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական առանձնահատկությունները: Օգտագործվել են սպորավոր բակտերիաների համաչափաչափ ենթակոմիտեի կողմից առաջարկված մեթոդները [2]:

Ուսումնասիրվել են Տետայա տեսերը՝ կուլտուրաների անլու ունակությունը pH 5,7-8,7 միջակայքում, 50°C-ի, սննդամիջավայրում 7% նատրիումի քլորի անկայունության պայմաններում, դիֆերոօքսիացետոնի, ուրեազայի, էլյուտինազայի առաջացումը, տիրոզինի բայրայումը, կազինի և նատրիումի ցիտրատի յուրացումը, կաթի պեպտոնիկացիան, լիզին, գրեյտին գեկարթոսիլազաների, արգինինոլահիդրոլազայի առաջացումը, չեզոք պրոտեազա արտադրելու ունակությունը, նատրիումի պրոպիոնատի յուրացումը, նատրիումի հիպուրատի հիդրոլիզը:

Արդյունքներ և բնահալում. *Bac. subtilis-mesentericus* տեսակի բակտերիաները մեկ տոկոս գլյուկոզ պարունակող ՄՊԱ սննդամիջավայրի պայմաններում լավ աճում են, առաջացնելով գորշավուն, սպիտակա-կրեմագույն, կրեմա-վարդագույն և գորշ գույնի պիգմենտավորում: Նրանց մակերեսը լինում է հարթ, մեծ և մանր կնճռավոր կամ ծայրավոր, անփայլ կամ խոնավանման փայլով, ոչ հարթ եզրերով: Քաղցրիկները հեշտ են վերցվում ազարի վրայից, այսինքն՝ չեն ներաճում ազարի մեջ: Այս տեսակին պատկանող կուլտուրաների մի մասի արտադրած պիգմենտը թափանցում է ազարի մեջ, որը կարող է լինել գորշ և գորշանման գույնների:

Bac. subtilis-mesentericus խմբի կուլտուրաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական առանձնահատկությունների ուսումնասիրություններից ստացված արդյունքները բերվել են աղյուսակում: Ինչպես երևում է աղյուսակի տվյալներից, ուսումնասիրված բոլոր 45 շտամները արտադրում են լիզինդեկարբոքսիլազա, աճում են սննդամիջավայրի pH 5,7 թթվություն և 7% նատրիումի քլորի առկայության պայմաններում, քայքայում են կազեինը, յուրացնում են նատրիումի ցիտրատը, իսկ կաթի լակտուսային ռեակցիան տեղի է ունենում պեպտոնիզացման կամ մակարդման միջոցով՝ տարբեր թթվություն պայմաններում: Բացառությամբ 5 կուլտուրայի, մնացած 40 շտամներն արտադրում են օրնիտինդեկարբոքսիլազա և աճում 50°-ի պայմաններում: Ուսումնասիրված 45 բակտերիաներից 40-ը զուրկ են ադինինդեկարբոքսիլազային և շեզոք պրոտեազային ակտիվությունից: *Bac. subtilis-mesentericus* խմբի կուլտուրաների մոտ բացակայում են նատրիումի հիպուրատը հիդրոլիզելու, տիրոզինը քայքայելու, դիհիդրոօքսիացետոն և լիցիտինազա առաջացնելու ունակությունները: Քանի որ կուլտուրաների մի մասի մոտ ստացվել է դրական, իսկ մյուս մասի մոտ բացասական տվյալներ, հետևաբար նատրիումի պրոպիոնատը յուրացնելը և ուրեազային ակտիվություններն այս խմբի բակտերիաների մոտ պետք է համարել տատանվող հատկություն:

Աղյուսակ

Bac. subtilis-mesentericus խմբի բակտերիաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական առանձնահատկությունները

Ուսումնասիրվող ռեակցիաները	Շտամների քանակը ըստ ռեակցիաների	
	դրական	բացասական
Լիզինդեկարբոքսիլազա	45	0
Օրնիտինդեկարբոքսիլազա	40	5
Արգինինդեկարբոքսիլազա	5	40
Չեզոք պրոտեազա	5	40
Լիցիտինազա	1	44
Ուրեազա	26	19
Պազեինի քայքայումը	45	0
Նատրիումի ցիտրատի յուրացումը	45	0
Կաթի պեպտոնիզացիա	45	0
Նատրիումի հիպուրատի հիդրոլիզը	0	45
Տիրոզինի քայքայումը	0	45
Դիհիդրոօքսիացետոնի առաջացումը	0	45
Նատրիումի պրոպիոնատի յուրացումը	27	18
Աճը 50°	40	5
Աճը pH 5,7	45	0
Աճը 7% NaCl	45	0

Bac. subtilis-mesentericus խմբի բակտերիաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական հատկանիշները համեմատելով մեր ուսումնասիրած աէրոբ սպորավոր բակտերիաների այլ խմբերին պատկանող կուլտուրաների ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական հատկանիշների հետ, պարզվել է, որ *Bac. subtilis-mesentericus*

Խմբի բակտերիաներին յուրատուրի ֆիզրոլոգաբիոքիմիական հատկանիշ
կարելի է համարել արգինինգեֆորոլազա առաջացնելու ունակության բու
ցակայումբ և կուլտուրաների աճելու ունակությունը սննդամիջավայրում
7% նատրիումի քլորի առկայության պայմաններում:

Հայկական ՍՍՀ ԳԱ մանրէաբանության
Ինստիտուտ

Ստացված է 9. IX. 1959

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ КУЛЬТУР ГРУППЫ *BAC. SUBTILIS-MESENTERICUS*

А. М. МАЛХАСЯН

Изучены физиолого-биохимические признаки 45 штаммов бактерий
группы *Bac. subtilis-mesentericus*.

Установлено, что важными дифференциальными признаками для
культур группы *Bac. subtilis-mesentericus* являются рост при 7%-ном
 NaCl и отсутствие образования аргинин-дегидролазы.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Африкян Э. К. Бактерии-антагонисты и их применение. Ереван, 1959.
2. Gordon R. E., Haynes W. C., Tang C. H. The genus *Bacillus*. Washington D., 1973.

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ АНТИБИОТИКУСТОЙЧИ- ВЫХ МУТАНТОВ АЗОТОБАКТЕРА

В. Г. НИКОГОСЯН

Нами изучалось действие ультрафиолетовых (УФ) лучей и диметилсульфата (ДМС) на выживаемость клеток *Az. chgoosossim*, определялись возможности получения антибиотикустойчивых мутантов и их азотфиксирующая активность.

Воздействием УФ лучами методом селекции мутантов на агаризованной среде (с градиентом концентрации антибиотиков) получены мутанты *Az. chgoosossim*, которые по устойчивости к тетрациклину превосходят исходный штамм в 100—140 раз. Подобные мутанты с помощью ДМС получить не удалось.

Выяснено, что тетрациклинустойчивые мутанты азотобактера отличаются от исходной культуры некоторыми культурально-морфологическими (величина клеток, пигментация) и физиологическими признаками. Указанные мутанты по азотфиксирующей активности уступают исходному штамму.

Следует отметить, что ряд авторов подобную связь между антибиотикустойчивостью и эффективностью обнаружили у мутантов клубеньковых бактерий, обладающих повышенной устойчивостью к канамицину, неомицину, биомицину и стрептомицину.

8 с., табл. 2, ил. 1, библиогр. 12 назв.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 11. XII 1980 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ

ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ КУЛЬТУР
БАКТЕРИЙ *VAC. MYCOIDES*

А. М. МАЛХАСЯН

Изучались физиолого-биохимические особенности 53 культур штаммов группы *Vac. mycooides*, выделенных из почв различных почвенно-климатических условий.

Все изученные бактерии растут при pH 5, 7 и гидролизуют казеин, испытанные штаммы, кроме одного, дают реакцию на лакмусовое молоко с последующей лептонизацией при разных значениях pH. Из 53 изученных штаммов 47 усваивают пропионат натрия, 51 штамм образует лецитиназу. Все бактерии этого вида не образуют дигидроксиацетон и не гидролизуют глупурат натрия.

У изученных штаммов, за исключением четырех, отсутствует лизин-декарбоксилазная активность. Культуры *Vac. mycooides* не растут при 50°, кроме 9 штаммов. Из числа изученных культур 49 штаммов не растут на питательной среде с 7%-ным хлористым натрием.

6 с., библиогр. 3 назв., табл. 1.

Институт микробиологии АН Армянской ССР.

Поступило 9.1.1981 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИННИТИ

ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ СТАДИИ РАЗВИТИЯ И ИЗМЕНЕНИЯ
 МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК CHIRONOMUS
 PLUMOSUS L. (CHIRONOMIDAE, DIPTERA)
 В ПРОЦЕССЕ РОСТА

И. С. ОСТРОВСКИЙ

В основу работы положены собственные и литературные данные.

Ширина головной капсулы у личинок разного возраста очень стабильна в отдаленных популяциях. В разных водоемах размеры личинок I, II и III возрастов близки, а конечная длина тела личинок IV возраста существенно отличается. Это связано с тем, что в более холодных водоемах личинки достигают больших размеров.

Каждая последующая линька более растянута, чем предшествующая.

Данные разных авторов по продолжительности эмбрионального развития, длительности развития личинок I—III возрастов и стадии куколки почти совпадают, что объясняется примерным равенством линейных размеров у личинок I—III возрастов, непродолжительностью самих периодов развития и, по-видимому, не очень большими различиями в темпах роста. Длительность развития личинок IV возраста занимает примерно половину времени всего развития организма. Поэтому даже небольшие различия в темпах роста (например, за счет разной температуры воды) существенно отражаются на длительности IV возрастной стадии. Продолжительность последней также определяется длиной, при которой личинки данной популяции окукливаются.

Скорость роста и длительность развития личинок хирономид зависят от плотности их поселений. При плотности, в 2—3 раза превышающей естественную в оз. Севан, время окукливания задерживалось в среднем на 5 недель. При этом более чем в 5 раз увеличивался отрезок времени между первыми и последним окукливаниями личинок одной генерации. Это свидетельствует о возрастании вариабельности темпа роста особей при высоких плотностях посадки.

Количество градусодней, необходимое для развития *Ch. plumosus* в разных популяциях различное. Предполагается связь этой величины с длиной окукливающихся личинок в водоемах различных широт.

8 с., библиограф. 18 назв., табл. 4.

Севанская гидробиологическая станция
АН Армянской ССР

Поступило 1. IX 1980 г.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И УРОВНЯ ПРОТЕИНА
 В РАЦИОНЕ НА ПРОДУКТИВНОСТЬ И ПОТРЕБЛЕНИЕ КОРМА
 НЕСУШКАМИ

А. К. ПЕТРОСЯН

Опыты проводились на Ереванской экспериментальной базе АрмНИИЖиК в период с апреля по август 1980 г. на курах породы леггорн линии «С» кросса 288 в возрасте 150—300 дней. Куры I и II групп содержались при температуре 20—25°, а III и IV— при 30°. В первый период опыта (30 дней) куры получали рацион, содержащий 17% протеина и 250 ккал обменной энергии (I и II группы) и 19% протеина и 300 ккал обменной энергии (III и IV группы).

Опыты показали, что у кур III и IV групп яйценоскость составляет 36,40 и 35,83%, а у кур I и II—36,23 и 36,00%. Причем эти различия в рационе при разной температуре не оказали влияния ни на массу яиц, ни на их живую массу и сохранность поголовья, которая составила в среднем 97,5—98,6%.

Потребление корма в жарких условиях заметно сниженное и составляет: у кур I и II групп соответственно 118,5 и 118,2 г, у кур III и IV групп— 93,0 и 92,8 г.

Во втором периоде опыта (возраст кур 180—300 дней) курам всех четырех групп было предложено 3 рациона: I и II— 250 ккал обменной энергии, 17, 14, 12% протеина, III и IV групп— 300 ккал обменной энергии, 19, 14, 12% протеина. Куры I и II групп получали по 44 г каждого рациона, а куры III и IV групп— по 40 г.

II период опыта показал, что яйценоскость несушек, содержащихся в жарких условиях, составляет 48,3 и 48,6% и уступает яйценоскости кур, содержащихся при температурном комфорте, на 11,3 до 11,7%. Остальные показатели продуктивности мало отличались друг от друга у кур всех групп и изменялись стабильно в течение всего опыта.

Потребление корма также заметно понизилось у кур III и IV групп и составило 98,5 и 99 г, в то время как у кур I и II групп этот показатель составил 121,5 и 122,5 г на голову в сутки. Тем не менее яйценоскость кур III и IV групп была пониженной вследствие снижения общей питательности суммарного рациона по сравнению с первым периодом опыта.

Таким образом, в условиях повышенной температуры помещения заметно снижается потребление корма птицей и для обеспечения нормальной продуктивности необходимо применение высококалорийных рационов с содержанием 19 % протеина, 3,9% кальция.

9 с., 5 табл., библиогр. 15 назв.

Армянский институт животноводства и
кормопроизводства МСХ Армянской ССР

Поступило 27.1.1981 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Э. И. МИРЗОЯН. «РАЗВИТИЕ ОСНОВНЫХ КОНЦЕПЦИИ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ГИСТОЛОГИИ». М., НАУКА, 1980. 271 стр.

Проблема эволюции тканевых структур и их возникновения до настоящего времени остается недостаточно разработанной. Это объясняется целым рядом причин и прежде всего тем, что многие гистологические факты, полученные в исследованиях по сравнительной гистологии, противоречили аксиомам эволюционной морфологии. В ряде случаев они показали сходство и параллелизм в строении организмов, которые ни палеонтологически, ни сравнительно-анатомически, ни эмбриологически ничего общего не имеют. Очень многие исследователи, механически переносявшие метод тройного параллелизма в гистологию, категорически заявляли, как сделал это в свое время В. фон Эбнер, что приложение эволюционной теории к рассмотрению гистологических знаний невозможно.

В течение многих лет исторический метод постепенно проникал в гистологию. Вопросы, которые возникали при этом, оказались достаточно сложными. Систематическое изучение путей и закономерностей эволюции тканей началось лишь в 30-е годы текущего столетия, преимущественно в нашей стране, и связано оно с именами выдающихся советских ученых А. А. Заварзина и Н. Г. Хлопина.

Перед автором рецензируемой монографии стояла вполне определенная цель — проследить становление основных концепций эволюционной гистологии и показать закономерности проникновения исторического метода в этот раздел биологии. Кроме того, была еще одна задача: в той непростой ситуации, которая сложилась на пути формирования эволюционной гистологии, с помощью историко-научного анализа попытаться не только разобраться в истоках возникших разногласий, но и наметить пути их преодоления, а возможно, и перспективы дальнейшего развития данного направления.

В первых трех главах книги автор в сжатой форме изложил предпосылки возникновения эволюционной гистологии, показав, в частности, как первая попытка создания филогенетической системы тканей, сделанная Э. Геккелем, потерпела неудачу, обусловленную в первую очередь несоответствием исторического метода объекту исследования. Как само эволюционное учение, так и гистология не были в то время в достаточной степени разработаны и подготовлены для того, чтобы синтезировать свою теоретическую и экспериментальную основы.

Недостатком большинства обзоров, посвященных эволюционным проблемам гистологии, является то, что учение об эволюции тканей рассматривается вне общего движения эволюционной мысли. Совершенно опускается обычно и развитие цитологии, хотя на формирование сравнительно-эволюционного направления в гистологии очень большое влияние оказали представления о природе и функции клеток, сформировавшиеся уже к концу XIX века. Э. И. Мирзоян, используя собранные О. Гертвигом наиболее характерные воззрения на природу и генезис клеток и тканей, убедительно показал, почему гистологи поначалу скептически относились к приложению эволюционной идеи к тканевым структурам. Постулированный Гертвигом онтогенетический характер специфики тканей, основанный на абсолютизации идиоплазмы, закрывал пути для воссоединения онто- и филогенетического аспектов в гистологии.

Коротко остановившись на состоянии некоторых проблем теории эволюции, имеющих близкое отношение к проблематике эволюционной гистологии, автор создал тот

фоз, на котором лучше воспринимаются и понимаются задачи, подчас запутанные и сложные, которые пришлось решать А. А. Заварзину и другим гистологам-эволюционистам. В частности, после предварительного историко-критического анализа проблемы соотношения дивергенции, конвергенции и параллелизма, куда примыкает логически и история создания закона гомологических рядов, совершенно по-новому представляется заслуга А. А. Заварзина в создании эволюционного направления. Этот хрестоматийный факт приобретает в книге должную значимость.

Как справедливо отмечает Э. Н. Мирзоян, уже в самых первых работах, начиная со статьи 1934 года «Об эволюционной динамике тканей» Заварзин сочетал исторический подход с системным анализом объекта, что было важнейшим новаторским приемом, позволившем избежать многих методологических трудностей. Надо отдать должное автору. Перед ним стояла нелегкая задача. Материал, собранный и проанализированный им, не только велик по объему, но и чрезвычайно многообразен. Автору пришлось иметь дело не только с эволюционной и гистологической тематикой. Специфика выбранной им темы включает в себя и проблемы медицинской гистологии и экспериментальной эмбриологии, цитологии, биохимии, генетики, эволюционной морфологии и систематики. Проявив завидную эрудицию во всех перечисленных областях биологии, Э. Н. Мирзоян критически анализирует разнообразные и чрезвычайно насыщенные фактическим материалом работы основоположников эволюционной гистологии, их учеников и многие современные исследования, связанные с эволюционно-гистологическими проблемами.

Показав, как возникла и развивалась эволюционная гистология А. А. Заварзин и его школой, автор переходит к изложению другой концепции, другого подхода к эволюции тканей.

Теория дивергентной эволюции тканей, созданная Н. Г. Хлопиным, позволила в дальнейшем перейти к построению естественной, генеалогической системы гистологических структур. Она возникла значительно позже концепции Заварзина, однако первоначальный этап деятельности Хлопина был связан со школой Заварзина и тематикой его исследований. Возможно, что работа с культурами тканей, имеющими строгую видовую специфичность, привела Н. Г. Хлопина к выводу, принципиально отличному от основного положения теории эволюционной динамики тканей.— «филогенетическое развитие животных организмов и их частной системы (органов, тканей и клеток) происходит адаптивно но общему единому дарвиновскому принципу дивергентной эволюции в единстве с условиями существования» (стр. 122).

Изложив основные положения концепции Хлопина, автор остановился на полемике вокруг проблем эволюционной гистологии, возникшей в 30—40-е годы, и перешел к тем вопросам теории эволюции тканей, которые стоят перед исследователями в настоящее время.

В заключительной главе книги сделана попытка сопоставить данные эволюционной гистологии с проблемами современной эволюционной биологии и определить роль эволюционной гистологии в решении некоторых закономерностей эволюции.

Автор воссоздал тот большой и трудный путь, который за столетие прошла эволюционная гистология, показав трудности, возникавшие на этом пути, противоречия, которые разрешались со временем или остались неразрешенными. обстоятельный и полный анализ работ А. А. Заварзина и Н. Г. Хлопина дает четкое представление о сущности их концепций. Однако стремление автора к исчерпывающей полноте и некоторая увлеченность специфическими подробностями затрудняет восприятие и без того очень насыщенного материала. Некоторые проблемы, выделенные в специальные разделы, как нам кажется, могли бы быть только упомянуты, например, проблема метаплазии тканей. Взгляды В. П. Беклемишева, безусловно очень интересные и заслуживающие внимания, вряд ли стоило выделять в особую главу (гл. 3), тем более что в ней проанализирована всего одна работа. При изложении работ Заварзина и Хлопина очень много цитат. Хотелось бы видеть более четкую критику тех положений, которые оказались спорными или несостоятельными. Стремление автора показать, что эволюционная гистология разрешила все свои противоречия, вряд ли соответствует действительности. В частности, утверждение о том, что представления Заварзина о

конвергенции принципиально отличны от позиции Л. С. Берга (стр. 71), звучат убедительно.

В целом книга Э. Н. Мирзояна вносит существенный вклад в отечественную и мировую историко-научную литературу и, несомненно, представляет большой интерес для всех биологов, интересующихся проблемами истории биологии и эволюционного учения.

Е. Б. МУЗРУКОВА