

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Издается с 1916 года. Аястанн кенсабапакан андес, ыходит 12 раз п год
на армянском и русском языках.

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսը» հրատարակվում է Հայկական ՍՍՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և տարագրում է հայկական, քաղաքացիական, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաքիմիայի, մանրէաբանության, զենեկաբանության և ընդհանուր ու կիրառական կենսաբանության այլ բնագավառների վերաբերյալ հայերեն և անգլերեն լեզուներով:

Տարեկան լույս է տեսնում հանդեսի 12 համար: Ուսմանությանը համար 40 կ. Քաղաքացիական ընդունվում է Սոյուզականի բոլոր բաժանարարներում:

«Биологический журнал Армении» — научный журнал, издаваемый Академией наук Армянской ССР, публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии на армянском и русском языках. Выходит 12 раз в год, полнотная цена за год 6 руб. 40 коп. Подписку на журнал можно производить во всех отделенных книжничествах

© ՍՍՀ ԳԽ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից, 1986

Издательство АН Армянской ССР, Биологический журнал Армении, 1986

Խմբագրական կոլեգիա՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ս. Մ. Ավանյան, Վ. Ս. Ավանյան, Հ. Գ. Բակլադջյան, Ռ. Ե. Գալստյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ), Ժ. Մ. Հաջարյան, Ե. Ս. Հարությունյան (պատասխանատու փոխխմբագիր), Ս. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Հաջարյան, Ս. Հ. Ստեփանյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (խմբագիր), Ն. Ն. Արամյան, Վ. Ս. Ավանյան, Հ. Ս. Ավանյան, Գ. Ն. Բաբայան, Է. Ս. Գալստյան, Ռ. Ե. Գալստյան, Պ. Ա. Կարամյան, Ս. Կ. Կարամյան, Ս. Գ. Հովհաննիսյան, Է. Է. Հովհաննիսյան, Է. Ս. Հաջարյան, Ա. Ա. Խաթաբյան, Ս. Ս. Զաքարյան, Կ. Ս. Փոփոխյան:

Редакционная коллегия: Э. К. Африкян (главный редактор), С. М. Аванян, В. С. Аветисян, Ж. Н. Авакян, Е. С. Арутюнян (ответственный секретарь), Р. М. Арутюнян, О. Г. Баклаваджян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), В. С. Казарян, К. Г. Карапетян, С. О. Мовсисян.

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, В. Ш. Агвабали, П. Н. Акрамовский, Д. Н. Бабаян, Э. Ц. Габриелян, А. А. Галоян, А. С. Гамбарян, С. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. А. Осибян, К. С. Погосян, А. Л. Тахтаджян, П. А. Хуршудян, М. Х. Чайлаханян.

Адрес редакции: 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24-г, ком. 11, Тел. 58-01 97.

Editorial address: 375019, Yerevan, Marshal Bagramian Avenue 24-g.

Ответственный за номер Африкян Э. К. Технический редактор Аветисян Л. А.

Сдано в набор 19.03.1986 г. Подписано к печати 13.05.1986 г. ВФ 04061.
Бумага № 2, 70X108¹/₁₆. Высокая печать. Печ. лист, 5,75 + 3 вкл. Усл. печ. лист 8,69.
Учет.-изд. 7,46. Тираж 760. Заказ 267. Издатель 6752.

1986, 39, 4

Издательство Академии наук Армянской ССР, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24-г. Типография Издательства АН АрмССР, Ереван-19, пр. Маршала Баграмяна, 24.

ՌԵԳԱՆԴԱԿԱՌԻԹԵՅՈՒՆ

[illegible]

ՀԱՄԱՅՈՒԹ ԲԱԴՈՐՊՈՒՄՆԵՐ

[illegible]

Սարգսյան Ա. Մ., Ջրեղյան Ա. Ջ. Ֆերտիլիզիայի ազդեցությունը բույսերի խաղողի զմայար արմատակալող ախտերի զիվերի արմատակալման վրա	356
Անտոնյան Ա. Ա., Մարտիրոսյան Ա. Ա. Ամինաթթուները և սպիտակուցները խաղողի զեզե- տության օրգաններում ըստ վեգետացիայի փուլերի	358
Հակոբյան Է. Ա., Փալանքարով Ա. Ա., Սևովյան Մ. Ս., Ավետիսյան Մ. Փ. Հերքիցիդ- ների սխտեմատիկ կիրառման ազդեցությունը պտղատու սպիտակների հոդի մի- րոֆլորայի վրա Հայկական ՍՍՀ Արարատյան հարթավայրի պայմաններում	359
Նիկողոսյան Վ. Գ. Ամոնիֆիկատորների տարածվածությունը և տեսակային կազմը Սևանա լճի ջրում և բնահողերում	359
Ավետիսյան Ն. Ս., Խաչատրյան Է. Ա., Մարկոսյան Լ. Ս. Բևա-ֆրուկտոֆորանոգիզա- ցիայի, սպիտակուցի, պիղմենտի և պուրպուրանի բիոսինթեզը <i>Aureobasidium an-</i> <i>tilans</i> -ի կալտիվացման պրոցեսում ազոտի տարրեր աղբյուրների միջավայրներում	359
Լիլիյան Կ. Ս., Սարգսյան Ջ. Ա., Իսիգորյան Ի. Ա., Իսկրյան Մ. Ա. Միկրոէկոմենների կարտեսակության փոփոխությունը առևտրային օրգաններում և հիւսվածքներում «Արզնի» հանքային ջուրը խմելու կարգի ազդեցության տակ	360
ԼԵՄՈՆԻ	
Հովհաննես Մնացականի Ավագյան	362

СОДЕРЖАНИЕ

Բարայцук Г. В., Кулагин В. С., Африкан Э. К. Экологические и серологические особенности штаммов <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>denegrolimus</i>	275
Топузян М. А., Мугнецян Э. Г., Бегларян Н. П. Влияние тибсерелловой кислоты на мутагенез и УФ-чувствительность микроорганизмов	284
Попов Ю. Г., Шамцян М. Г., Агаджанян Дж. А., Захарян Т. А. Получение азотфиксирующих ассоциаций каллюса люцерны со специфичными клубеньковыми бактериями	289
Госинян Н. В., Давтян М. А. Изовязимный спектр трансминазы разветвленных аминокислот в процессе роста дрожжей рода <i>Candida</i>	294
Алексанян Е. Р., Маматян М. Н., Маркосян Л. С. Синтез бета-фруктофуранозидазы <i>Aureobasidium pullulans</i> в зависимости от возраста посезного материала	299
Габриелян А. Г., Гукасян Н. А., Аракелян А. Г. Моделные исследования особенностей структуры нуклеиновых кислот в растворах полистиленгликоля	303
Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О. Определение числа SH-групп и гистидиновых остатков в дрожжевой аргиназе	310
Геворкян М. П., Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О. Сравнительное изучение некоторых свойств дрожжевой и печеночной аргиназ	314
Бадалян С. М. Антифунгальная активность шляпочного гриба <i>Hematoloma fasciculare</i> (Huds.: Fr.) Karst.	319
Овсепян Л. А. Анаэробные инфекции у диких копытных, содержащихся в условиях неволи, и морфологическая характеристика атрофических органов	322
Хачатрян А. Ж., Богданов М. В., Лурсарьян С. С. Фосфатный потенциал и стехиометрия H ⁺ -насоса и K ⁺ -насоса у бактерий <i>Serratia marcescens</i>	325

Краткие сообщения

Լե Դյեն Գյոնգ, Африкан Э. К. Экология и характеристика штаммов сероти- на 14 <i>Bacillus thuringiensis</i>	332
Մнацаканյան Շ. Դ. Փենոտիպիկական արտահայտումներ պլազմիդային պաթոգենությանը մոտ մոտավորապես նույն ընտանիքի <i>Enterobacteriaceae</i>	333
Լե Դյեն Գյոնգ. Փենոտիպիկական միկրոֆլորայի բաղադրությունը միջատների և միջատ- ների միջավայրում	335
Բաղդասարյան Է. Գ., Գրիգորյան Մ. Օ., Դավթյան Մ. Ա. Վառիկային ամոնիակի ստացումը D-իզոմեր ավալինի միջավայրում <i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-42	337

Заминян С. С., Джанилоадян Л. О., Ловлян Р. Э. Количественный анализ фенотипических признаков дикого ячменя и гибридов, произрастающих в условиях Армянской ССР	340
Гудян А. А. Мутабельность мягкой пшеницы в потомстве колосов с различного онтогенетического происхождения	342
Казарян М. Х. О сложных гибридах пшеницы с различными фенотипами гибридной карликовости	345
Симонян Е. Г., Оганесян Г. Г. Цитогенетический эффект актиномицина-D на клетки корешков <i>Strepis capillaris</i>	348
Додалян М. А., Паносян А. Г. Влияние диглюкозида дигидрокукурбитамина D на перекисное окисление липидов микросом печени крыс при стрессе	351
Григорян Г. С., Нагащян О. З., Микасян С. Н. Ферменты перекисного окисления в диагностике и оценке лечения бронхоневмонии	354

Рефераты

Саркисова М. М., Джердзеджян А. З. Влияние физиологически активных соединений на окореняемость черенков трудноукореняющихся сортов винограда	357
Антоян А. С., Марутян С. А. Аминокислоты и белки в вегетативных органах гибридов винограда по фазам вегетации	359
Акопян Э. А., Калантаров А. А., Сеацумян М. А., Аветисян М. Ж. Влияние систематического применения гербицидов на почвенную микрофлору плодовых садов в условиях Арабатской равнины Армянской ССР	357
Никогосян В. Г. Распространенность и видовой состав эммонификаторов в воде и грунтах озера Севан	358
Александрян Е. Р., Хачатурян А. А., Маркосян Л. С. Биосинтез бета-фруктофуранозидов, белка, пигмента и пуллулана в процессе культивирования <i>Aureobasidium pullulans</i> на срезах с различными источниками азота	359
Эминян Р. С., Саркисян З. А., Григорян Р. А., Давтян М. А. Изменение содержания микроэлементов в органах и тканях крыс под влиянием курса питья минеральной воды «Арзни»	360

Хроника

Юваннес Минацканович Анакян	362
-----------------------------	-----

CONTENTS

Baraishchek G. V., Kulaçin V. S., Afrikan E. G. Ecological and Serological Characteristics of <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>dendrolimus</i> Straus	275
Topuzian M. H., Mugneshian E. G., Beglarian N. P. Influence of Gibberellic Acid on the Mutagenesis and UV-Sensitivity of Microorganisms	284
Popov Yu. G., Shamelian M. G., Aghajanian J. A., Zuharian T. A. Obtaining of Nitrogen-Fixing Associations of Alfalfa Callus with Specific Nodule Bacteria	289
Goginian I. V., Davtian M. A. Isoenzyme Spectrum of Branched Amino Acids Transaminase in the Process of Growth of Yeasts of <i>Candida</i> Genus	294
Alexanian E. R., Malatjan M. N., Markossian L. S. Synthesis of Beta-Fructofuranosidase of <i>Aureobasidium pullulans</i> in Dependence on the Sowing Material Age	299
Gabrulyan A. G., Gukasyan N. A., Arakelyan H. H. Model Study of Nucleic Acids Structure Peculiarities in Solutions of Polyethyleneglicole	303
Chubarian S. V., Tumanian L. R., Torchian R. O. Determination of Number of SH-Groups and Histidine Residua in Yeast Arginase	310
Gevorkian M. L., Chubarian S. V., Tumanian L. R., Torchian R. O. Comparative Investigation of Some Properties of Yeast and Liver Arginases	314
Badalian S. M. Antitumoral Activity of the Cap Fungus <i>Nematoloma fasciculata</i> (Huds.:Fr.) Karst.	319
Ousepian L. A. Anaerobic Infections in Wild Ungulate Animals, Maintained in Captivity, and Morphological Characteristics of Their Parenchymatous Organs	322

<i>Khachatryan A. G., Bogdanov M. V., Durgaryan S. S.</i> Phosphate Potential and Stechiometry of H^+ -pump and K^+ -pump in Bacteria <i>Serratia marcescens</i>	325
--	-----

Short Communications

<i>Le Tien Fiong, Afrikian E. G.</i> Ecology and Characteristics of Strains of the Serotype 14 <i>Bacillus thuringiensis</i>	332
<i>Mnatzakanov S. T.</i> Phenotypic Manifestations of Pathogenicity Plasmids in Some Representatives of <i>Enterobacteriaceae</i> Family	333
<i>Le Tien Fiong</i> On Entomopathogenous Microflora of Insects and Soil	335
<i>Bagdasarian E. G., Grigorian M. O., Davtian M. A.</i> Influence of the Ammonium Salts on the Assimilation of D-Isomer of Valine by Yeasts <i>Candida guilliermondii</i> BKM Y-42	337
<i>Zaminian S. S., Janpoladian L. O., Avallan R. E.</i> Quantitative Analysis of Phenotypic Signs of Wild Barley and Egilopsis. Growing under Conditions of the Armenian SSR	340
<i>Gulyan A. A.</i> Mutability of Soft Wheat in Generation of Ears of Various Ontogenetic Origin	342
<i>Kazarian M. Kh.</i> On Compound Hybrids of Wheat with Different Phenotypes of Hybrid Dwarfness	345
<i>Simonian E. G., Oganesian G. G.</i> Cytogenetic Effect of Actinomycin-D on the Roots Cells of <i>Crepis capillaris</i>	348
<i>Dadalian M. A., Panosyan A. G.</i> Dihydrocucurbitacin D Diglycoside Influence on the Lipid Peroxidation in Rat Liver Microsomes during Stress	351
<i>Grigorian G. S., Naghashian O. Z., Minasian S. A.</i> Reamination Enzymes in the Diagnostics and Estimation of the Treatment of Bronchopneumonia	354

Abstracts

<i>Sarkisova M. M., Jerejian A. Z.</i> Influence of Physiologically Active Combinations on the Rootstaking of Grape Hardly—Rootstaking Sorts	356
<i>Antonina A. S., Marutian S. A.</i> Amino Acids and Proteins in Vegetative Organs of Grape Hybrids According to Phases of Vegetation	356
<i>Hakobian E. A., Kalantarov A. A., Sevuntan M. A., Avetisian M. Zh.</i> Influence of Systematic Use of Herbicides on the Soil Microflora of Fruit Gardens under Conditions of the Armenian SSR Ararat Valley	357
<i>Nikoghosian V. G.</i> Spreading and Species Composition of Ammonifiers in the Water and Soils of the Lake Sevan	358
<i>Alexanian Ye. R., Khachatryan A. A., Murkossian L. S.</i> Biosynthesis of Beta-Fructofuranosidase, Protein, Pigment and Pullulan in the Process of <i>Aureobasidium pullulans</i> Cultivation in Media with Various Sources of Nitrogen	359
<i>Eminian R. S., Surgsian Z. A., Grigorian R. A., Davtian M. A.</i> Change of Microelements Content in the Rats Organs and Tissues under the Influence of "Arzni" Mineral Water Drinking Course	360

Chronics

<i>Hovhannes Mnatsakanovich Avagian</i>	3 2
---	-----

ЭКОЛОГИЧЕСКИЕ И СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММОВ *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *DENDROLIMUS*

Г. В. БАРАЯЩУК, В. С. КУЛАГИН, Э. К. АФРИКЯН

С использованием истощенных H-антисывороток изучены серологические свойства 120 природных штаммов серотипа 4 *B. thuringiensis*. Среди культур данного серотипа впервые показано существование штаммов с антигенным строением 4a и 4b, а также возможность дифференцирования культур var. *luciensis* по высокому содержанию антигенной фракции 4b и их выделению в самостоятельный биотип.

Անաստիաներված են *Bacillus thuringiensis* տեսակի չորրորդ սերոտիպի 120 բնական շտամների սերոլոգիական հատկանիշները՝ օգտագործելով ժտրակային հակաթիմուկներ: Առաջին անգամ հաստատված են *dendrolimus* ենթատեսակի մեջ 4a և 4b ենթասերոտիպերի առկայությունը, ինչպես նաև var. *luciensis* ենթատեսակին պատկանող կուլտուրաների առկայությունը բիոտիպի իդենտիֆիկացիայի հնարավորությունը 4b անտիգենային ֆրակցիայով հագեցված շտամիկի օգտագործմամբ:

Serological properties of 120 natural strains of serotype 4 *B. thuringiensis* have been studied using the H-antisera. The presence of subserotypes 4a and 4b has been revealed for the first time within the studied cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *dendrolimus*. The possibility of the identification of var. *luciensis* strains as a separate biotype by the use of high content of 4b antigenic fraction has been stated.

Ключевые слова: энтомопатогенный бацилл, микробиометод, дендробациллин.

Энтомопатогенные бациллы вида *Bacillus thuringiensis* широко распространены в природе, они выделяются из насекомых и различных эколого-географических зонах, что говорит об их большой экологической пластичности. Выделено свыше 20 серотипов *B. thuringiensis*, поражающих более 500 видов насекомых в лесных, декоративных, древесных насаждениях, в садах, на виноградниках и полях.

В Северном Прихубеугулье МНР, где энтомопатогенные бактериальные препараты никогда не применялись, *B. thuringiensis* был выделен из эпифитной микрофлоры 7,3% образцов растений, 4,8% образцов почвы и 1,9% живых насекомых [7]. При обследовании стаций обитания насекомых патогенные кристаллофорные бациллы данного вида выделены из 50 видов насекомых и с 22 видов древесных, кустарниковых и травянистых растений [6].

При обследовании 57 водных мельниц и 22 районах области Косовы (Югославия) установлено широкое распространение *B. thuringiensis* среди 5 видов чешуекрылых (*Ephestia kuehniella*, *E. plutella*, *Plodia interpunctella*, *Plutella maculipennis*, *Pieris farinalis*) [22]. Бактерии данного вида выделялись в пределах 2—72% обследованных

личинок мельничной огневки во всех исследованных районах, причем была выявлена приуроченность их именно к мельничной огневке. Другие виды чешуекрылых даже в одном месте были заражены в меньшей степени.

Ромашовой с сотр. [10] была показана возможность переноса и распространения этих бактерий в различных районах земного шара с помощью перелетных птиц. Культуры *B. thuringiensis* выделялись в 3,8% проанализированных образцов арагасовых, искодовых, кошарных, куриных клещей, постельных клопов, пухослов, внутренних органов и перьевого покрова домашних кур, фазанов, грачей, ворон серых, воробьев полевых и домашних.

По мере накопления данных природные штаммы, выделенные в различных эколого-географических районах, по физиолого-биохимическим и серологическим свойствам внутри некоторых серотипов подразделялись на биотипы [4, 17—19]. В зависимости от частоты встречаемости того или иного серотипа Африкян [1, 2] предложил выделить эколого-географические зоны: *sotto*, *aizawai* — Дальний Восток; *dendrolimus* — Сибирь; *alesti* — Европа; *caucasicus* — Кавказ; *kenyae* — Африка; *entomocidus*, *finitimus* — Северная Америка, а культуры серотипов *berliner (thuringiensis)* и *galleriae* — как широко распространенные разновидности без определенной эколого-географической локализации [1, 2].

Изучение экологии разновидностей *B. thuringiensis* важно для понимания хозяйно-паразитарных отношений в биоценозах, и особенности для вредных насекомых, дающих вспышки массового размножения на больших площадях. Эти исследования имеют существенное значение для целенаправленного поиска в природе штаммов, отличающихся высокой энтомоцидной активностью, и разработки способов их более рационального и эффективного использования. Выяснение закономерностей экологического распространения разновидностей *B. thuringiensis* позволит выявить условия выживаемости и репродукции этих бактерий в природе, что имеет основополагающее значение для рационального и эффективного применения инсектицидных препаратов из культур данного вида. Особый интерес представляет вопрос о приуроченности отдельных разновидностей к отдельным видам насекомых в плане выявления их адаптационной изменчивости.

Ромашова с сотр. [10] при изучении штаммов, выделенных из клещей и других насекомых в Киргизии, отмечает наличие следующих серотипов: I — *thuringiensis*, V — *galleriae*, IV — *dendrolimus*. Наиболее часто высевались культуры серотипа 5. При изучении микрофлоры постельных клопов из разных районов Киргизии было установлено распространение пяти серотипов — *thuringiensis*, *dendrolimus* и *galleriae*, *alesti*, *subtoxicus*.

Японскими авторами [20] были проанализированы Н-антигены 241 штамма кристаллофорных бактерий, выделенных в основном из испражнений гусениц тутового шелкопряда нескольких префектур. По их данным, в Японии преобладают серотипы *alesti*, *aizawai*, *sotto*, *dendrolimus*, *morrisoni*. Сравнительно редко встречаются культуры серо-

типов *thuringiensis*, *kurstaki*, *kenyae*, *toumanoffi*. Отмечено, что бактерии, принадлежащие к разным серотипам, иногда выделялись одновременно из одной и той же гусеницы.

Талалаева [14], изучая 300 культур *B. thuringiensis*, выделенных из различных видов насекомых, установила, что в Сибири наиболее распространенными серотипами являются *dendrolimus* (59%), *thuringiensis* (33%), *galleriae-canadensis* (6%), *alesti* (2% от числа всех идентифицированных культур).

Малоквасова и Черышева [9] при анализе микрофлоры дендрофильных чешуекрылых Дальнего Востока отмечают преобладание серотипов *sotto*, *dendrolimus*.

Африкян и Чил-Акопян [3] из тутового шелкопряда, насекомых-вредителей, почвы и других природных субстратов различных географических зон Армении выявили 7 серотипов *B. thuringiensis*. Чаще всего высевались культуры серотипов *caucasicus* (*darmstadiensis*) и *galleriae*; реже — *dendrolimus* и *morrisoni*, совсем мало — *thuringiensis*, *alesti*. Обнаружены районы очагового распространения культур отдельных серотипов [16].

В данной работе нами обобщены результаты изучения штаммов *B. thuringiensis*, выделенных из различных источников и стадиях обитания насекомых таежной зоны.

Материал и методика. Объектом исследований служила коллекция из 132 культур *B. thuringiensis*, выделенных в разные годы в лаборатории экологии и микробиологии насекомых НИИ биологии при Иркутском государственном университете. Культуры бактерий выделены при исследовании микрофлоры почвы, растений и насекомых из лесных и степных биотопов, где энтомопатогенные бактериальные препараты не применялись (табл. 1). Основная масса культур *B. thuringiensis* была выделена в Иркутской области.

Суспензии анализируемых образцов пастеризовались при 75° в течение 20 минут. Микробиологический анализ проводился рассевом суспензии на поверхность сухого питательного агара или агаризованной дрожже-полисахаридной среды.

Для изучения морфологических, культуральных и физиолого-биохимических показателей пользовались схемой, предложенной Де Баржак и Бонфуа [17—19]. Для изучения антигенного строения исследуемых культур были получены антижгутиковые сыворотки серотипа 4 по схеме Де Баржак и Бонфуа [17]. Иммунизация кроликов проводилась комбинированным способом: поддозы внутривенно в хвостую ушную вену, поддозы — в бедро [12]. Истощение Н-антисывороток проводили по модифицированному нами методу Де Баржак и Бонфуа [17] и Кастеллани [8]. С этой целью каждую сыворотку адсорбировали антигенами другой культуры для устранения гомологичных антител и выявления специфичности [8, 17, 18]. В качестве типовых культур для получения Н-антижгутиковых сывороток *B. thuringiensis* использованы типичные для отдельных серотипов штаммы из коллекции Института микробиологии АН АрмССР: шт. 1901 (*dendrolimus*), шт. 1002 (*sotto*), шт. 1006 (*trifolialis*), шт. 1010 (*kenyae*). Биологическая активность проверялась на гусеницах неварного шелкопряда по LC_{50} и коэффициенту активности штаммов (K), который представляет собой отношение среднелетальных концентраций (LC_{50}) штамма-эталола и испытуемого штамма. В качестве штамма-эталола использовали продуцент дендробациллина.

Результаты и обсуждение. Талалаевой и Покровской [13—15] было установлено, что по Н-антигену серотипы *sotto* и *dendrolimus* разделить невозможно, что было подтверждено японскими учеными

Таблица 1. Происхождение выделенных культур *B. thuringiensis*

Место выделения	Источник выделения	№ штаммов	Год выделения
Иркутская область	Растения	1, 2	1974
		29, 30, 31, 32, 121	1980
		34	1981
	Почва	3, 4, 5	1978
		25, 26	1979
		33	1980
		35, 36	1981
		59	1982
	Гусеницы сибирского шелкопряда (бактерионосители)	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	1978
		37, 38, 39, 40	1981
	Гусеницы сибирского шелкопряда (трупы)	41, 42	1981
		60, 61, 62, 63, 64, 65,	1982
		88, 89, 90, 91	1983
	Насекомые, сопутствующие сибирскому шелкопряду и биотопозе (бактерионосители)	14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24	1978
		27, 28	1979
		43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 123	1981
		92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 132	1983
Читинская область	Растения	108, 109, 110, 111, 112, 113, 114	1983
	Почва	117, 118, 119, 120	1984
Бурятская область	Гусеницы сибирского шелкопряда (трупы)	66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 126, 127	1982
Монгольская Народная Республика (Хубсугульский аймак)	Растения	52, 53, 54, 122	1981
		79, 129	1982
	Почва	55, 56, 57, 58	1981
		80, 124, 125	1982
		115	1983
	Вода	81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 128	1982
	Насекомые (бактерионосители)	116, 130, 131	1983

[20]. Одновременно ими было показано, что биотины четвертого серотипа *sotto*, *dendrolimus*, *kenyae* отличаются друг от друга свойствами 0-антигенов: сыворотка *B. thuringiensis subsp. dendrolimus* вызывает преципитацию антигена в низких титрах, а сыворотки *sotto* и *kenyae* — в сравнительно высоких.

Результаты наших опытов по перекрестной реакции при применении антижгутиковых сывороток к типовым культурам разновидностей *dendrolimus*, *sotto*, *tuviensis*, *kenyae* приведены в табл. 2. Из представленных данных следует, что антисыворотка, полученная к культуре *dendrolimus*, дает положительную реакцию агглютинации в разведении 1:12800 с антигенами культур *dendrolimus*, *sotto*, *tuviensis* и в разведении 1:400 с антигеном *kenyae*. Антисыворотки, полученные к штаммам *sotto* и *tuviensis*, агглютинировали с испытуемыми антигенами точно таким же образом. Антижгутиковая сыворотка культуры *kenyae* вступает в реакцию агглютинации в разведении 1:800 с антигеном *dendrolimus*, в разведении 1:400 с антигенами *sotto* и *tuviensis* и 1:12800 с антигеном *kenyae*. Представленные данные свидетельствуют о принадлежности испытанных культур к четвертому серотипу и серологической идентичности культур *dendrolimus*, *sotto*, *tuviensis*.

Таблица 2. Перекрестная агглютинация при применении сывороток к культурам серотипа 4 *B. thuringiensis*

Антижгутиковые сыворотки к культурам	Антигены разновидностей			
	<i>dendrolimus</i>	<i>sotto</i>	<i>tuviensis</i>	<i>kenyae</i>
<i>dendrolimus</i>	1 : 12800	1 : 12800	1 : 12800	1 : 400
<i>sotto</i>	1 : 12800	1 : 12800	1 : 12800	1 : 400
<i>tuviensis</i>	1 : 12800	1 : 12800	1 : 12800	1 : 400
<i>kenyae</i>	1 : 600	1 : 400	1 : 400	1 : 12800

Более детальное изучение антигенного строения культур четвертого серотипа проводилось с помощью истощенных сывороток. Схема истощения и ее результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3. Перекрестная реакция агглютинации при применении истощенных сывороток к культурам серотипа 4 *B. thuringiensis*

Сыворотка к культурам	Насыщение сывороток антигенами	Антигены разновидностей			
		<i>dendrolimus</i>	<i>sotto</i>	<i>tuviensis</i>	<i>kenyae</i>
<i>dendrolimus</i>	<i>sotto</i>	0	0	—	—
	<i>tuviensis</i>	0	—	0	—
	<i>kenyae</i>	1 : 3200	—	—	0
<i>sotto</i>	<i>dendrolimus</i>	0	0	—	—
	<i>tuviensis</i>	—	0	0	—
	<i>kenyae</i>	—	1 : 3200	—	0
<i>tuviensis</i>	<i>dendrolimus</i>	0	—	0	—
	<i>sotto</i>	—	0	0	—
	<i>kenyae</i>	—	—	1 : 12800	0
<i>kenyae</i>	<i>dendrolimus</i>	0	—	—	1 : 6400
	<i>sotto</i>	—	0	—	1 : 6400
	<i>tuviensis</i>	—	—	0	1 : 6400

Условные обозначения: (0)—отсутствие реакции агглютинации; (—)—реакция агглютинации не ставилась.

Показательно серологическое родство культур разновидностей *dendrolimus*, *sotto*, *tuviensis*. Антисыворотка, полученная к культурам *dendrolimus*, при насыщении антигенами *sotto* полностью теряет свою агглютинабельность, что свидетельствует о полной адсорбции антигенами *sotto* антител сыворотки *dendrolimus*.

При насыщении к культуре *sotto* антигенами *dendrolimus* происходит также полное истощение последней. Из этого можно сделать вывод об одинаковом антигенном составе культур *dendrolimus* и *sotto*.

В результате четырехкратного последовательного насыщения сывороток от культур *dendrolimus*, *sotto* антигенами *tuviensis* происходит полная адсорбция антител указанных сывороток. Антисыворотка к штамму *tuviensis* полностью теряет агглютинабельность при

однократном насыщении антигенами *dendrolimus, sotto*. Известно, что полное истощение антисыворотки наступает тогда, когда набор антител беднее или соответствует набору антигенов в культуре, используемой для истощения. Результаты перекрестной реакции агглютинации с применением истощенных сывороток позволяют сделать вывод об идентичности антигенного состава культур *dendrolimus, sotto, tuviensis* по формуле 4а4в.

При насыщении сывороток, полученных к культурам *dendrolimus, sotto, tuviensis*, антигенами *kenyae* сохраняется их специфичность в титре 1:3200 (*dendrolimus, sotto*) и 1:12800 (*tuviensis*) за счет антител 4в. Поскольку антигенная формула *kenyae* - 4а4с, эти данные указывают на адсорбцию антитела 4а (табл. 4).

Таблица 4. Результаты перекрестной реакции агглютинации при применении истощенных сывороток к культурам серотипа 4 В. *thurlagensis*

Сыворотка к культурам разновидности	Насыщение сывороток антигенами	Результат
<i>dendrolimus</i>	<i>sotto</i>	4з4з — 4а4в = 0
	<i>tuviensis</i>	4з4з — 4а4в = 0
	<i>kenyae</i>	4з4з — 4а4с = 4з
<i>sotto</i>	<i>dendrolimus</i>	4з4в — 4з4з = 0
	<i>tuviensis</i>	4з4в — 4з4з = 0
	<i>kenyae</i>	4з4в — 4з4с = 4в
<i>tuviensis</i>	<i>dendrolimus</i>	4з4в — 4з4з = 0
	<i>sotto</i>	4з4в — 4з4з = 0
	<i>kenyae</i>	4з4в — 4з4с = 4в
<i>kenyae</i>	<i>dendrolimus</i>	4з4с — 4з4в = 4с
	<i>sotto</i>	4с — 4з4в = 4с
	<i>tuviensis</i>	4с — 4з4в = 4с

При насыщении антисыворотки к культуре *kenyae* антигенами *dendrolimus, sotto, tuviensis* была получена монорецепторная сыворотка 4с.

Для дальнейших работ возникла необходимость проверить равнокачественность трех полученных сывороток с антителами 4в (табл. 5).

Таблица 5. Перекрестная реакция агглютинации истощенных сывороток 4в

Сыворотки, истощенные антигеном, к культурам	Антигены разновидности		
	<i>dendrolimus</i>	<i>sotto</i>	<i>tuviensis</i>
<i>dendrolimus</i>	1:3200	1:1600	1:12800
<i>sotto</i>	1:1600	1:3200	1:12800
<i>tuviensis</i>	1:3200	1:3200	1:12800

Из данных табл. 5 видно, что имеется некоторая специфичность истощенных сывороток. Так, сыворотка к культуре *dendrolimus* агглютинирует с антигеном *dendrolimus* в титре 1:3200, а с антигенами *sotto*—

1:1600 и, наоборот, сыворотка к *sotto* агглютинирует с антигенами *dendrolimus* в титре 1:1600, а то время как с антигенами *sotto* реакция идет в повышенном титре—1:3200. Реакция агглютинации истощенных сывороток к культурам *dendrolimus*, *sotto*, *tuvensis* с антигенами культуры *tuvensis* идет в высоком титре 1:12800. Это свидетельствует о высоком содержании антигенной фракции 4в в культуре *tuvensis*.

Полученные монорецепторные сыворотки использовались для изучения антигенного строения 120 природных штаммов четвертого серотипа (12 выделенных штаммов—представители других серотипов *B. thuringiensis*). Поскольку была выявлена разница в количественном содержании антигенов 4в, реакция агглютинации ставилась со всеми истощенными сыворотками к культурам *dendrolimus*, *sotto*, *tuvensis*. Для изучения антигенного состава природных штаммов использовалась также неистощенная сыворотка *kenyae*. Предварительно ставилась реакция с монорецепторной сывороткой 4с, и если результат был отрицательный, то природный штамм испытывался в реакции агглютинации с неистощенной сывороткой *kenyae*, тем самым определялось наличие антигенной фракции 4а. С помощью истощенных сывороток было выявлено 8 культур разновидности *kenyae* (штаммы 59, 82, 104, 105, 106, 107, 114, 119). Эти культуры с сыворотками 4в не агглютинировали, а с монорецепторной сывороткой 4с реакция агглютинации протекала в высоких титрах 1:12800, кроме штамма 82 (1:3200), который, по-видимому, беднее по содержанию антигенов.

При помощи истощенных сывороток с набором антител 4в выявлено четыре штамма, которые не агглютинировали ни с одной из трех испытываемых сывороток, тогда как с неистощенной сывороткой *kenyae* регистрировалась положительная реакция агглютинации. По-видимому, природные штаммы №№ 15, 52, 75, 98 имеют антигенную формулу 4а.

Выявлена серологическая группа штаммов, имеющая антигенную формулу 4в. Штаммы 18, 40, 61, 69 агглютинируют со всеми монорецепторными сыворотками 4в, а с истощенной сывороткой 4с и с неистощенной сывороткой *kenyae* дают отрицательную реакцию. 104 штамма агглютинировали с истощенными сыворотками 4в и неистощенной сывороткой *kenyae* 4а4с и не вступали в реакцию с монорецепторной сывороткой 4с.

Поскольку была выявлена некоторая разнокачественность истощенных сывороток с набором антител 4в, представилась возможность выявить серологические особенности в группе природных штаммов с антигенным строением 4а4в. Шесть штаммов агглютинировали в высоких титрах (1:12800) со всеми тремя истощенными сыворотками 4в. Сравнивая полученные данные с результатами перекрестной реакции агглютинации истощенных сывороток 4в с типовым штаммом *tuvensis* (табл. 5), можно предположить, что штаммы 26, 27, 73, 92, 94, 115 представляют собой биотип *tuvensis*.

Штамм 53 агглютинировал в титре 1:1600 с истощенной сывороткой *sotto*, в то время как с истощенными сыворотками *dendrolimus* и *tuvensis*, имеющими также набор антител 4в, реакция агглютинации

протекала в титре 1:200. Хотя типовые штаммы (табл. 5) ведут себя в перекрестной реакции агглютинации с истощенными сыворотками 4а несколько иначе, подобная специфичность природного штамма 53 по отношению к истощенной сыворотке *sotto* дает основание условно отнести эту культуру к биотипу *sotto*.

Большинство изученных штаммов (97) нами отнесено к биотипу *dendrolimus*. Титр в реакции агглютинации этих культур с истощенными сыворотками *dendrolimus* и *sotto* (4в) варьировал в пределах 1:200—1:6400, а с адсорбированной сывороткой *var. tuviensis*—1:200—1:3200, тогда как типовые штаммы агглютинировали с этими сыворотками в титрах 1:1600—1:3200 (табл. 5). Истощенные сыворотки к культурам *dendrolimus* и *sotto* в реакции агглютинации с природными штаммами в основном вели себя равнозначно. Только у шести культур (10, 54, 55, 56, 62, 63) зарегистрированы более высокие титры в реакции агглютинации с сывороткой *dendrolimus* по сравнению с сывороткой *sotto*. Выявлено 3 штамма (8, 90, 111), которые неступали в реакцию агглютинации с истощенными сыворотками *dendrolimus* и *sotto* в высоких титрах 1:6400—1:12800, в то время как с адсорбированной сывороткой *tuvienensis* реакция отмечалась в титре 1:800—1:1600. Проявление такой специфичности, по всей вероятности, нужно рассматривать как особенность этих природных штаммов.

Проведенные сравнительные исследования физиолого-биохимических свойств штаммов в основном подтвердили их распределение на серологические группы (табл. 6).

Таблица 6. Отличительные физиолого-биохимические свойства природных штаммов серотипа 4 *B. thuringiensis*

Серологическая группа	№№ штаммов	Отличительные физиолого-биохимические свойства
<i>kenyae</i>	59, 82, 104, 105, 106, 107, 114, 119	Уреазу образуют, салицин усваивают
<i>sotto</i>	53	Сахарозу усваивают
4а	15, 52, 75, 98	Уреазу не образуют
4б	18, 49, 61, 69	Сахарозу, салицин не усваивают
<i>tuvienensis</i>	26, 27, 73, 92, 91, 115	
<i>dendrolimus</i>	97 штаммов	

Первая группа культур разновидности *kenyae* образует уреазу и ферментирует салицин, что является отличительными признаками этой разновидности. Разновидность *sotto* отличается от *dendrolimus* только по усвоению сахарозы. Идентифицированный нами штамм ферментирует сахарозу. Однако физиолого-биохимических тестов, отличающих штаммы серотипа 4 с антигенным составом 4а и 4б, а также штаммы *tuvienensis* от культур *dendrolimus*, не выявлено. Все эти штаммы образовывали ацетилметилкарбинол, не усваивали салицин, сахарозу, маннозу, обладали амилолитической, протеолитической, лецитиназной активностями, не продуцировали уреазы. По данным Красильникова и Гуквасина, разновидность *tuvienensis* отличается от *dendrolimus* образо-

панием сероводорода и нидола на белковых средах [5]. По данным Африкьяна, штамм *tuviensis* по своим особенностям соответствовал культуре *dendrolimus*, исключая образование β -гемолизина в противоположность α -гемолизинам, обнаруженным у типичных культур серотипа *dendrolimus* [1]. Приведенные данные соответствуют выводу Де Баржак и Бонфуа о совпадении серологических свойств с биохимическими [18]. В данном случае родство культур *tuviensis* и *dendrolimus* очевидно, однако имеются серологические и биохимические особенности, позволяющие дифференцировать их как разные биотипы.

Изучение природных штаммов в пределах одного серотипа с помощью истощенных H-антисывороток позволяет выявить их особенности, которые, очевидно, впоследствии сказываются на специфике патогенеза, вызываемого этими бактериями. Работы Кривенчик [21] подтверждают это предположение. При исследовании 243 штаммов *B. thuringiensis* ею было установлено, что по жгутиковому антигену подвиды большей частью совпадают с группами, выделенными по серотипированию кристаллов и оценке спектра энтомоцидной активности.

В наших исследованиях штаммы испытывались только к непарному шелкопряду. Группа штаммов с антигенной формулой 4a оказалась низковирулентной (K_5 был меньше единицы), культуры, идентифицированные по антигенному строению как 4b, — высоковирулентными (K^* выше единицы). Однако для достоверных выводов необходимы более детальные исследования, включающие широкий спектр насекомых.

Нашими исследованиями установлено, что из 132 штаммов, выделенных из различных природных источников в Иркутской, Читинской областях, Бурятии, а также в МНР, 97 культур являются типичными представителями *dendrolimus* по серологическим и биохимическим признакам. Приуроченность распространения типичных штаммов *dendrolimus* к зоне Сибири подтверждается работой Талалаевой, Малаквасовой, Глуховской [15], посвященной изучению дальневосточных штаммов, выделенных из различных видов насекомых в Амурской области, Хабаровском и Приморском краях.

Изучение антигенного строения природных штаммов четвертого серотипа с помощью истощенных сывороток подтвердило наличие двух групп с антигенным составом: 4a-4c и 4a-4b [11, 19, 20]. Первую группу представляет биотип *kenyae*, вторую — разновидности *dendrolimus*, *sotto*, *tuviensis*. Однако на основании повышенного содержания антигенной фракции 4b в культурах *tuviensis* впервые показана возможность выделения его в самостоятельный биотип. С помощью истощенных H-антисывороток впервые выявлено существование природных штаммов с антигенным строением 4a и 4b. Таким образом, использование истощенных сывороток позволяет четко выявить среди набора штаммов одного серотипа группы, отличающиеся по антигенному составу жгутиков, и наметить пути их дальнейшего изучения с целью разработки эффективных методов направленного отбора штаммов с высокой энтомоцидной активностью.

Авторы статьи выражают благодарность Л. А. Чил-Акопян и Н. П. Лебедевой за помощь и содействие в работе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкян Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Африкян Э. К. Успехи микробиологии, 10, 1975.
3. Африкян Э. К., Чил-Акопян Л. А. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 355, 1980.
4. Зурабова Э. Р., Рыжкова А. С., Дубинина Т. П. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 374, 1980.
5. Красильников Н. А., Гикасян А. Б. Микробиология, 33, 4, 664, 1964.
6. Кулагин В. С., Лебедева Н. П., Гиль Т. А., Чумак В. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве 70, 75, Иркутск, 1980.
7. Кулагин В. С. В кн.: Природные условия и ресурсы некоторых районов МНР, Братислава, 218, 1984.
8. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М., 1978.
9. Малокацкова Т. С., Черышева Л. П. В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах. 84, Красноярск, 1980.
10. Ромашева Л. Ф., Балыкин А. В., Видомский Э. В., Шербак В. П. и др. Микробиологические методы борьбы с эктопаразитами птиц. Фрунзе, 1976.
11. Покровская Л. А. Автореф. канд. дисс., Иркутск, 1976.
12. Талалаева Г. Б., Покровская Л. А. В кн.: Микроорганизмы в защите растений от вредных насекомых, 51, Иркутск, 1978.
13. Талалаева Г. Б., Покровская Л. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их использование в народном хозяйстве, 110, Иркутск, 1979.
14. Талалаева Г. Б. В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах, 134, Красноярск, 1980.
15. Талалаева Г. Б., Малокацкова Т. С., Глуховская Е. В. В кн.: Энтомопатогенные микроорганизмы и их применение в сельском хозяйстве 57, Иркутск, 1982.
16. Чилингарян К. О. Биолог. ж. Армении, 33, 4, 398, 1980.
17. Barjac H. de, Bonnefoi A. Entomophaga, 7, 1, 5, 1962.
18. Barjac H. de, Bonnefoi A. Invert. Pathol., 11, 3, 335, 1968.
19. Barjac H. de, Bonnefoi A. Entomophaga, 18, 1, 5, 1974.
20. Ohba M., Atsuta K. J. Invert. Pathol., 32, 303, 1978.
21. Krywienszyk I., Dalmage H. T., Hall I. M. et al. J. Invert. Pathol., 47, 1, 62, 1981.
22. Purrini K. Anz. Schadlingskunde, Pflanzenschutz, Umweltsch., 59, 169, 1977.

НИИ биологии Иркутского государственного университета
и А. А. Жданова, Институт микробиологии АН
Армянской ССР

Поступило 3.III 1986 г.

УДК 575.24

ВЛИЯНИЕ ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ НА МУТАГЕНЕЗ И УФ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ

М. А. ТОПУЗЯН, Э. Г. МУТНЕЦИН, Н. П. БЕГЛАРИН

Показано снижение уровня спонтанных и индуцированных his⁺-his⁻ реверсий у шести штаммов тест-системы Эймса под влиянием фитогормона ГК, а также УФ-чувствительности трех штаммов *Escherichia coli*, несущих мутации по ферментам репарации (*E. coli*, AB1885, ДМ49, РЗ478, дефектные по и⁺gV, lex A3, polA1). Данная система рекомендуется для выявления антимутагенного эффекта химических соединений.

Յույ՞ն է տրված ֆիտոհորմոն ԳԿ-ի ազդեցության տակ էյմսի տեստ-համակարգի վեց շտամների մոտ his^- — his^+ լուրջում և մակածված ռեբրսիաների մակարդակի, ինչպես և բաց ռեպարացիայի ֆերմենտների մոտացիաներ կրող *Escherichia coli* երեք շտամների ՌՄ և տոպոլիմերի նկատմամբ զգայունության (*E. coli* AB1885, DM49, P3478, դեֆեկտա-վոր ըստ *uvrB*, *lexA3*, *polA1*) ինչպես Տվյալ համակարգը երաշխավորվում է քիմիական միացությունների հակամուտացիո էֆեկտի բացահայտման համար:

It has been shown that under the influence of phytohormone GA the level of spontaneous and induced his^- — his^+ reversions of six strains of Alm's test-system, as well as UV-sensitivity in three strains of *Escherichia coli* carrying mutations in reparation ferments (*E. coli* AB1885, DM49, P3478, defective of *uvrB*, *lexA3*, *polA1*) decrease. The given system is recommended for revelation of antimutagenic effect of chemical compounds.

Ключевые слова: микроорганизмы, гибберелловая кислота, мутагенез, УФ-чувствительность.

На большом числе видов высших растений, наряду с физиологической, выявлена также генетическая активность известного фитогормона гибберелловой кислоты (ГК). С ее помощью индуцированы многочисленные полезные мутации, выделены мутантные формы и линии, обеспечивается ускорение плодоношения и повышение урожайности ряда сельскохозяйственных культур как в первый год воздействия на семя, так и в последующих поколениях [1–6]. Предположение о физиологической и генетической активности ГК в организмах подтверждено результатами цитогенетического анализа действия этого фитогормона на семена разного срока хранения, а также электронномикроскопического анализа листьев обработанных растений [7–9].

В настоящей работе представлены результаты изучения молекулярных механизмов генетических эффектов ГК с использованием высокочувствительной микробной системы Эймса [10–12], позволяющей не только выявлять мутагенную активность того или иного соединения, но и судить о первичных молекулярных механизмах их действия, а также различных репарационных мутантов кишечной палочки с идентифицированными мутациями по ферментам репарации.

Материал и методика. Работа выполнена в 1982–1985 гг. на тестерных штаммах *Salmonella typhimurium* системы Эймса [11–13]; характеристики штаммов представлены в табл. 1. Использованы методы полуколичественного и количественного анализов индукции геновых мутаций [10]. Мутагенная активность 0,01–0,1%-ных ГК оценивалась по изменению уровня спонтанных и индуцированных азидом натрия и 2-нитрофлуореном his^- — his^+ реверсий у всех шести штаммов данной системы.

Использованы также репарационные мутанты *E. coli*, любезно предоставленные проф. В. Д. Жестяниковым (Институт цитологии АН СССР). Характеристики штаммов представлены в табл. 3. Выбор данных микробных тест-систем обоснован тем, что в настоящее время отсутствуют маркированные репарационные мутанты растительных систем.

Влияние ГК на УФ-чувствительность разных штаммов *E. coli* изучалось следующим образом. Бактериальные культуры инкубировали при 37°C до $4 \cdot 10^8$ клеток/мл, центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут. Осадок ресуспендировали в 0,1 М $MgSO_4$ и охлаждали в течение 3–5 мин для предотвращения дальнейшего роста. Бактериальные культуры титровали посевом из соответствующих разведений на полноценные среды. Такую культуру обрабатывали ГК в конечной концентрации

0,02% Контрольные и обработанные ГК культуры облучали двумя дозами УФ-лучей (250 и 750 эрг/мм²). О действии ГК на УФ-чувствительность культур судили по изменению выживаемости бактериальных культур.

Таблица 1. Генотипы индикаторных штаммов *S. typhimurium*

Штаммы	Мутация по гистидину		Дополнительные мутации	
	гис G ₄₄	гис D ₁₀₅₁	LPS	способность к эксцизионной репарации
ТА 1535	+	—	rfa ⁺⁺	uvr B ⁺⁺⁺
ТА 1538	—	—	rfa	uvr B
ТА 1950	+	—	дикий тип	uvr B
ТА 1534	—	+	дикий тип	uvr B

+ — наличие или отсутствие мутации; ++ — мутация, приводящая к нарушению комплекса клеточной стенки; +++ — мутация, приводящая к нарушению системы эксцизионной репарации. Использованы также штаммы *S. typhimurium* ТА 100 и ТА 98 — производные штаммов ТА 1535 и ТА 1538 с введенной плазмидой рКМ 101.

Таблица 2. Реверсии his[−] → his⁺ в спонтанном и индуцированном мутагенезе *S. typhimurium* с участием ГК

Штаммы	0,1% ГК	0,01% ГК	0,1% ГК — мутаген	0,01% ГК — мутаген
ТА 1534	44,4	61,1	66,3	86,4
ТА 1535	50,0	81,3	62,6	66,4
ТА 1538	55,5	77,7	50,0	53,2
ТА 1950	100	44,4	81,8	84,6
ТА 98	38,8	72,2	82,9	89,5
ТА 100	53,3	100	70,0	74,2

Спонтанный уровень ревертантов 25 кол/чаш при 3·10⁹ кл/мл—100%. Мутаген (5 мкг/чаш) при 1534, 1538, 98—2 НФ, и остальных случаях—азид натрия. Реверсии—%, при выживаемости не ниже 98,8%. Индуцированный уровень ревертантов при 3·10⁹ кл/мл—100%.

Статистическая обработка p<0,001.

Результаты и обсуждение. В табл. 2 представлены результаты исследования индукции генных мутаций у всех шести штаммов *S. typhimurium*—тест-системы Эймса с учетом изменения уровня спонтанных и индуцированных реверсий his[−]→his⁺. Ни у одного штамма ни в одном варианте экспериментов не обнаружено повышения уровня мутаций под влиянием ГК. Более того, выявлено статистически достоверное снижение уровня спонтанных и индуцированных мутаций уже при обработке культур 0,01%-ной ГК, а у отдельных культур—ТА 1534, ТА 98—при 0,1%-ной ГК уровень спонтанных реверсий his[−]→his⁺ снижается до 44,4 и 38,8% соответственно. Штаммспецифичности в этом процессе не обнаружено. Так, максимальное снижение спонтанного уровня реверсий выявлено у плазмидного штамма ТА 98 при обработке бактериальной культуры 0,1%-ной ГК, в то время как на другой плазмидный штамм—ТА 100—эта концентрация почти не оказала влияния.

Таблица 3. Влияние 0,02%-ной ГК на чувствительность различных штаммов *E. coli* к УФ-облучению

Штаммы	УФ-облучение				ГК + УФ облучение			
	10"		30"		10"		30"	
	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %	Титр	выживаемость, %
AB 1157 pur ⁻	$1.6 \cdot 10^8$	50	$1 \cdot 10^8$	25	$2 \cdot 10^8$	50	$1 \cdot 10^8$	25
AB 1686 pur ⁺ A	$1 \cdot 10^8$	25	$8 \cdot 10^7$	20	$1 \cdot 10^8$	25	$6 \cdot 10^7$	15
AB 1855 pur ⁺ B	$3 \cdot 10^8$	0.075	$1.6 \cdot 10^8$	0.0004	$5 \cdot 10^8$	0.125	$4 \cdot 10^8$	0.01
AB 1884 pur ⁺ C	$8 \cdot 10^7$	20	$2 \cdot 10^7$	5	$7 \cdot 10^7$	17.5	$8 \cdot 10^6$	2
JS 2926 rec ⁺ AB	$2 \cdot 10^8$	50	$4 \cdot 10^7$	10	$2 \cdot 10^8$	50	$4 \cdot 10^7$	10
DM 41 lex ⁺ A3	$6 \cdot 10^8$	0.15	$1 \cdot 10^8$	0.0025	$1 \cdot 10^8$	0.25	$1.5 \cdot 10^8$	0.0375
W 3110 pol ⁺	$4 \cdot 10^8$	95	$1.5 \cdot 10^8$	37.5	$2 \cdot 10^8$	50	$8 \cdot 10^7$	20
P 3478 pol ⁺ AI	$8 \cdot 10^7$	20	$1.5 \cdot 10^8$	0.0375	$1 \cdot 10^8$	25	$1.4 \cdot 10^8$	0.35

thr pro leu his thi arg

leu met his thi thy thr

Культура п титре $4 \cdot 10^8$ кл/мл обрабатывалась лампой ОК11-11 на расстоянии 65 см 10"—250 эрг/мм²; 30"—750 эрг/мм².

Статистическая обработка $p < 0.001$.

Таким образом, использование системы штаммов *S. typhimurium* выявило антимагнитный эффект фитогормона ГК на микроорганизмы. Однако данная система не в состоянии дать окончательную и полную картину антимутагенной активности, поскольку последняя может быть изменена в результате столь большого числа мутаций, искусственно введенных Эймсом для повышения чувствительности при конструировании штаммов.

Для проверки влияния ГК на репарационные процессы была поставлена серия опытов на УФ-чувствительность *E. coli*, диких и 6 штаммов, несущих повреждения по различным генам ферментов репарации (табл. 3). Результаты этих исследований представлены в табл. 3, согласно которой существует линейная зависимость между выживаемостью и дозой облучения. Наибольшую чувствительность к УФ-облучению проявили штаммы, несущие мутации по генам P3478—*polA1*, AB1885—*uvrB*, ДМ49—*lexA3*. Выживаемость этих штаммов при облучении УФ в дозе 750 эрг/мм² падает от двух раз до нескольких порядков соответственно.

У штаммов AB1885 *uvrA*, AB1881 *uvrC*, W3110 *pol⁺* ГК способствовала повышению УФ-чувствительности. При предварительной обработке 0,02%-ной ГК выживаемость штамма W3110 снижается до 50% (против 95% в контроле), а при дозе 750 эрг/мм² до 20% (против 37,5% в контроле), в то время как эта же доза у AB 1885, ДМ49, P3478 понижает УФ-чувствительность на 1 порядок.

Штаммы, проявившие указанный эффект, несут дефектные гены по регуляторным белкам, контролирующим работу специфических эндонуклеаз и гликозилаз—ключевых ферментов экзационной репарации, участвующих и в пострепликативной репарации.

Полученные данные свидетельствуют о влиянии фитогормона ГК на протекание репарационных процессов, возможно, в результате взаимодействия с регуляторными белками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бегларян Н. П. Автореф. докт. дисс., Ереван, 1971.
2. Бегларян Н. П. Генетика, 9, 6, 1970.
3. Бегларян Н. П. Цитология и генетика, 4, 6, 1970.
4. Бегларян Н. П. Тез. докл. III съезда ВОТИС, Л., 1977.
5. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Тез. докл. I Всесоюз. конф. по регуляторам роста и развития растений, М., 1981.
6. Бегларян Н. П. Тез. докл. юбил. сессии, посвящ. 60-летию образования СССР, Ереван, 1982.
7. Бегларян Н. П., Аветисян А. В. Биолог. ж. Армении, 28, 10, 1975.
8. Бегларян Н. П., Мигуничян Э. Г., Топузян М. А. Тез. докл. XIV ежегодн. конф. Европ. общ-ва по мутагенам внешней среды, 55, М., 1984 г.
9. Бегларян Н. П., Саркисян С. А., Галстян А. Уч. зап. ЕГУ, 1, 1981.
10. Фонштейн Л. М., Клиничин Л. М., Ползунова Г. Н., Абилов С. К., Шапиро Л. А. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella* (методическое указание), М., 1977.
11. Ames B. N. Plenum Press, 1, 267, 1971.

12. Ames B. N., Lee F. D. and Dunston W. E. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 782, 1973a.

13. Ames B. N., McCann Y., Yamasaki E. Mut. Res., 31, 347, 1975.

Ереванский государственный университет,
кафедра цитологии и генетики

Поступила 7.11.1985 г.

УДК 579.64.631+581.133.1

ПОЛУЧЕНИЕ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ АССОЦИАЦИИ КАЛЛЮСА ЛЮЦЕРНЫ СО СПЕЦИФИЧНЫМИ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Ю. Г. ПОПОВ, М. Г. ШАМЦЯН, Дж. А. АГАДЖАНИН, Т. А. ЗАКАРЯН

Получены азотфиксирующие ассоциации каллюса люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий. Хорошая выживаемость растительных клеток в указанных ассоциациях позволяет получать первичные ассоциативные культуры.

Ստացված են պարարակոերիաների սպեցիֆիկ շտամներով առվելուի կալլուսի ազոտ-
ֆիքսող ասոցիացիաներ: Ստացված ասոցիացիաներում բուսական բջիջների կենսունակությու-
նը պահպանվել է նախափորձյուն է ստեղծում ստանալու թիթեռնաձագկափորների և պարարակ-
ոերիաների տեսակն փոխանցողների ընթացքում պահպանվող համատեղ կուլտուրաներ:

Nitrogen-fixing associations of alfalfa callus with specific nodule bacteria have been obtained. The high rate of plant cells viability in associations obtained permits to create well-subcultured associative systems.

Ключевые слова: люцерна, симбиотическая азотфиксация, каллюс, клубеньковые бактерии, нитрогеназная активность.

При моделировании симбиотической азотфиксации в культуре ткани перед исследователями встает множество трудноразрешимых проблем, к числу которых относятся ингибирование роста клеток растительного компонента бактериальным и низкая азотфиксирующая активность создаваемых ассоциаций по сравнению с природными системами. Решению этих вопросов посвящено небольшое число работ [1, 2, 5, 8, 9, 11—17]. Установлено, что ацетилредуктазная активность ассоциаций значительно варьирует в зависимости от исходного титра бактериальной нагрузки, возраста ткани к моменту инокулирования, сроков совместного культивирования компонентов ассоциации, состава среды, видовых и штаммовых различий клубеньковых бактерий, генотипических особенностей растительного компонента и др.

Целью наших исследований являлось получение азотфиксирующих ассоциаций культуры ткани люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий и определение условий, оптимальных для проявления их нитрогеназной активности.

Материал и методика. Объектами исследований служили штаммы *Rhizobium meliloti* 21/67 и 132/64, полученные из Института микробиологии АН АрмССР, и каллюсная культура люцерны сорта Апэранская 40 корневого происхождения [6]. Каллюс люцерны пассировался на среде МН-5 [4]. На этой же среде создавались и бобо-

во-ризобияльные ассоциации. Выживаемость бактерий определялась как на среде МВ-5, так и на бобовом агаре. С целью изучения влияния культивирования на нитрогеназную активность испытывалась обедненная среда МВ-5 без ауксина и кинетина и с 0,2 нормы минерального азота. Нитрогеназная активность определялась азетиленовым методом на хроматографе марки «Цвет-110». Подробно методика описана ранее [7]. Необходимо указать, что исследуемая каллюсная культура выделяла этилен, уровень которого подвержен заметным колебаниям. Титр бактерий определялся нефелометрически. Соотношение живых и мертвых клеток в каллусе устанавливалось путем прижизненного окрашивания растительных клеток раствором метиленового синего (1×10^{-5}). Индекс роста определялся по соотношению веса паренхимной каллюсной ткани к первоначальному весу трансплантата.

Результаты и обсуждение. Рост каллуса люцерны при инкубировании на среде МВ-5 в результате адаптации интенсифицировался, и в испытанных посевах его индекс достигал 20. Для создания ассоциации культивируемой *in vitro* ткани люцерны с клубеньковыми бактериями испытано два способа инокуляции. В одном случае клубеньковые бактерии вносились в расплавленную и охлажденную агаризованную среду из расчета 10^3 и 10^5 клеток на 40 мл среды и после застывания агара на него пересаживались кусочки растительной ткани. Во втором случае суспензия клубеньковых бактерий вносилась на подросший в течение двух недель каллус из расчета 10^5 — 10^6 клеток на 1—3 г сырого веса ткани. Одновременное внесение в среду симбионтов компонентов приводило к угнетению каллуса, что проявлялось в побурении, ослаблении его и прекращении роста. Инокуляция же изолированных тканей после двух недель культивирования с клубеньковыми бактериями не подавляла их роста ризобиями даже при наибольшем из испытанных титров. Прирост растительной биомассы во втором варианте был в 10 раз выше, чем в первом. Поэтому в дальнейших экспериментах бактериализация каллуса проводилась после двухнедельного предварительного культивирования его, что соответствовало логарифмической фазе роста. При этом в инфицированных каллусах люцерны в первые 15 дней совместной инкубации каких-либо внешних морфологических изменений, по сравнению с неинфицированной тканью, не обнаруживалось. Высев смыва с каллусов на чашки Петри с бобовым агаром или средой МВ-5 выявлял, однако, большое количество клубеньковых бактерий. Их слизистые колонии визуально обнаруживались на каллусах только на третьей неделе совместного культивирования.

Влияние исходного титра клубеньковых бактерий и сроков совместного культивирования на состояние растительного компонента и ассоциациях проверялось по приросту каллюсной ткани, соотношению живых и мертвых клеток, а также «меристематических» и «паренхимных» клеток, поскольку по этому показателю также можно судить о степени влияния инфекционного агента. Испытывались следующие исходные титры *Rh. meliloti*, шт. 21/67 и шт. 132/64: 10^3 , 10^5 и 10^6 клеток на 1,2—3,0 г растительной ткани, при двух сроках совместного культивирования (7 и 15 суток). Инокуляцию тканей проводили 4-суточными культурами бактерий.

Как свидетельствуют полученные результаты (табл. 1), увеличение титра инфекционной нагрузки не отражается существенным образом на

Таблица 1. Влияние исходного титра бактериального инокулята на рост биомассы, содержание в ней сухого вещества и жизнеспособность растительных клеток в ассоциации каллюса люцерны с *Rh. meliloti*

Сроки культивирования	Исходный титр бактерий (клеток каллюса)	Ассоциация со шт. 21 67					Ассоциация со шт. 132 64					
		сырой ^а вес, г	сухое вещество, %	число растительных клеток			сырой ^а вес, г	сухое вещество, %	число растительных клеток			
				меристематических, %	мертвых, %	общее число подсчитанных клеток			меристематических, %	мертвых, %	общее число подсчитанных клеток	
Перед инокуляцией (14-е сутки)	—	3.15	3.03	69.2	4.6	683	1.21	3.64	70.5	22.5	825	
Совместное культивирование	7 суток	0	5.99	3.51	79.1	8.4	1039	1.64	4.31	70.2	20.1	857
		10 ²	4.17	3.79	76.5	13.4	846	1.60	4.34	65.5	20.4	774
		10 ³	6.84	3.51	76.9	8.6	1285	1.80	4.29	63.1	17.9	856
		10 ⁴	3.97	3.45	—	—	—	2.27	4.15	63.9	23.9	461
	15 суток	0	7.29	3.00	53.3	8.6	883	4.19	4.07	67.7	16.8	1120
		10 ²	12.34	2.98	55.0	4.0	390	1.73	4.28	50.6	16.9	665
		10 ³	8.93	3.01	61.1	8.6	567	3.66	3.95	58.6	12.7	458
		10 ⁴	11.79	2.94	55.5	8.4	516	5.89	3.85	52.5	12.3	437

* Исходный сырой вес каллюса—0,46 г

урожае биомассы (сырой вес и содержание сухого вещества). Закономерные изменения происходят только в зависимости от возраста ассоциации: на 15-е сутки сырой вес биомассы больше в 2—3 раза по сравнению с 7-суточной ассоциацией даже при максимальной инфекционной нагрузке. Нет резких различий между вариантами опыта и по числу мертвых и процентному содержанию «меристематических» клеток.

Следует отметить, что в ассоциациях с клубеньковыми бактериями, особенно быстрорастущими, рост каллюсной ткани и жизнеспособность растительных клеток в ней, как правило, сильно угнетаются [5, 11, 12]. Отсутствие отрицательного влияния бактериального компонента на растительный иногда наблюдается при условии, если ассоциация создается со специфичными штаммами клубеньковых бактерий [10]. Высокая выживаемость растительных клеток в созданной нами аналогичной ассоциации—каллюс люцерны корневого происхождения со специфичными штаммами *Rh. meliloti*—объясняется, по всей вероятности, сортовыми особенностями люцерны, использованной для введения в изолированную культуру, штаммовыми различиями ризобий и условиями культивирования, в первую очередь, составом питательной среды.

Азотфиксирующая активность полученных ассоциаций проверялась в разные сроки совместного культивирования каллюса люцерны со штаммами 21/67 и 132/64 на среде МВ-5. Поскольку в литературе имеются сообщения об ингибирующем влиянии минерального азота и гормональных соединений на нитрогеназную активность [9, 14—16, 18],

ее определение проводилось также в ассоциациях, культивируемых в течение 48 ч перед определением на обедненной среде МВ-5 с 0,2 нормы минерального азота, без НУК, 2,4-Д и кинетина. Результаты определения нитрогеназной активности *Rh. meliloti* в ассоциации с каллусом люцерны приведены в табл. 2.

Таблица 2. Динамика нитрогеназной активности *Rh. meliloti* в ассоциации с каллусом люцерны на полноценной и обедненной среде МВ-5 (иМ C_2H_4 /г сухого вещества за 24 ч)

Варианты культур	Среды	Время совместного культивирования				
		12 ч	24 ч	2 сут	3 сут	7 сут
Ассоциация с <i>Rh. meliloti</i> шт. 21/67	полноценная	5193	1364	934	1175	185
	обедненная	-762	-330	265	185	-73
Ассоциация с <i>Rh. meliloti</i> шт. 132/61	полноценная	613	176	228	758	-120
	обедненная	-961	1830	509	120	-110

Как видно из приведенных данных, наибольшая нитрогеназная активность наблюдалась в 12-часовой ассоциации. Другой пик ее отмечался на 3-и сутки совместного культивирования. В 7- и 10-суточных ассоциациях нитрогеназная активность снижалась вплоть до полного исчезновения; к этому сроку существенно нарастало количество эндогенного этилена. Что касается влияния исключения гормональных соединений из среды и снижения в ней содержания минерального азота, то, как видно из таблицы, ожидаемого увеличения уровня ацетиленвосстанавливающей активности не наблюдалось. Только в вариантах одно- и двухсуточных ассоциаций со шт. 132/64 отмечалось значительное повышение нитрогеназной активности на обедненной среде по сравнению с полноценной. Следует отметить, что и в опытах Ничик и Старченкова [6], изучавших влияние трофических и гормональных факторов среды культивирования на нитрогеназную активность *Rh. lupini* в ассоциации с изолированными культурами пшеницы и табака, получены неоднозначные результаты.

На величину нитрогеназной активности оказывает влияние доза инокулюма [3]. Испытание различных титров показало, что увеличение инфекционной нагрузки не всегда сопровождается повышением нитрогеназной активности. Максимальная активность для шт. 21/67 отмечалась при нагрузке 2×10^8 клеток на г сырого веса каллуса. Дальнейшее повышение титра в 10 и 100 раз снижало, соответственно, уровень ацетиленвосстанавливающей активности в 1,5–2 раза. Таким образом, увеличение дозы инокулюма сильнее отражалось на уровне нитрогеназной активности клубеньковых бактерий, чем на жизнеспособности растительного компонента в ассоциации. Для получения жизнеспособных бобово-ризобияльных ассоциаций *in vitro* с максимальной нитрогеназой активностью необходимо подбирать определенные соотношения бактериальных и растительных клеток, оптимальные как для роста

последних, так и для проявления азотфиксирующей способности клубеньковых бактерий.

В доступной нам литературе мы не встречали сведений о влиянии возраста бактериального инокулята на азотфиксирующую активность бобово-ризобиальных ассоциаций. Однако общезвестно, что ферментативная активность микроорганизмов различна в разные фазы развития культуры и зависит от их физиолого-биохимического состояния. Изучение влияния возраста клубеньковых бактерий на нитрогеназную активность шт. 21/67 в ассоциации с каллюсом люцерны показало, что после 12-часового совместного культивирования ассоциации, бактериализованные 12-суточными культурами ризобий, обладают несколько более высокой ацетиленредуктазной активностью, чем бактериализованные 4- или 8-суточными культурами.

Во всех опытах нитрогеназная активность шт. 21/67 была значительно выше таковой шт. 132/64.

Итак, получены жизнеспособные азотфиксирующие ассоциации каллюсной ткани люцерны со специфичными штаммами клубеньковых бактерий. Хорошая выживаемость растительных клеток в таких ассоциациях позволяет получать перевиваемую ассоциативную культуру. Максимальная нитрогеназная активность наблюдается в ранние сроки культивирования ассоциаций. Особенно высокий уровень нитрогеназной активности наблюдается у *Rh. meliloti*, шт. 21/67 в ассоциации с каллюсом люцерны, в которой, по всей вероятности, создаются условия взаимозависимости обоих компонентов системы друг от друга. Стабильные различия в уровне нитрогеназной активности между испытанными штаммами *Rh. meliloti* в ассоциациях *in vitro* свидетельствуют о том, что метод культуры ткани может быть использован для дифференциации штаммов клубеньковых бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян Дж. А., Попов Ю. Г., Шамцян М. Г., Акопян Г. Я. Уч. записки ЕГУ, 2, 1985.
2. Бокарецва Г. А., Шемаханова Н. М. Микробиология, 47, 5, 849—853, 1978.
3. Каладжян Н. Л., Арутюнян Р. Ш., Чайлахян М. Х. ДАН СССР, 242, 1, 252—255, 1978.
4. Мамедов К. Ю., Шильникова В. К., Хайлова Г. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 849—855, 1978.
5. Мириавино З. Б., Севрюк О. Г., Щербакови Е. Н., Тоникян Э. С., Заргарян О. Н. Биолог. ж. Армении, 32, 6, 13—18, 1979.
6. Ничик М. М., Старченко Е. П. Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 691—697, 1981.
7. Попов Ю. Г., Агаджанян Дж. А., Казарян Ф. Р. Уч. записки ЕГУ, 2, 111—117, 1982.
8. Хайлова Г. Ф., Культура клеток растений и биотехнология: Тез. докл. IV Всесоюз. конф., 180—181, Кишинев, 1983.
9. Хайлова Г. Ф., Шильникова В. К., Мамедов К. Ю. Физиол. растений, 26, 5, 1103—1109, 1979.
10. Шамцян М. Г., Левакумова Е. Н., Чайлахян М. Х. ДАН СССР, 222, 3, 740—743, 1975.
11. Шемаханова Н. М., Бокарецва Г. А. Изв. АН СССР, сер. биол., 1, 151—153, 1977.
12. Шильникова В. К., Мамедов К. Ю., Хайлова Г. Ф. Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 778—780, 1978.

13. Юркова Г. Н., Ничик М. М., Левенко Б. А., Старченков Е. Г. ДАН СССР, 230, 4, 1006—1008, 1976.
14. Child J. J., Za Rue T. A. Plant Physiol., 53, 1, 88—90, 1974.
15. Holsten R. D., Burns R. C., Hardy R. W. F., Herbert R. R. Nature, 232, 5307, 173—176, 1971.
16. Phillips D. A. Plant Physiol., 53, 1, 67—72, 1974.
17. Phillips D. A. Plant Physiol., 54, 4, 654—655, 1974.
18. Scofield N. R. Nature, 253, 5490, 351—352, 1974.

Ереванский государственный университет,
кафедра физиологии и анатомии растений

Поступило 8.IV 1985 г.

УДК 577.15.591.8

ИЗОЭНЗИМНЫЙ СПЕКТР ТРАНСАМИНАЗЫ РАЗВЕТВЛЕННЫХ АМИНОКИСЛОТ В ПРОЦЕССЕ РОСТА ДРОЖЖЕЙ - РОДА *CANDIDA*

И. В. ГОГНИЯН, М. А. ДАВТЯН

Обнаружено резкое снижение активности трансаминазы разветвленных аминокислот бесклеточного экстракта дрожжей при выращивании их в течение 12, 18 и 24 часов. Выявлены некоторые количественные сдвиги в изоэнзимном спектре трансаминазы разветвленных аминокислот: активность ФIII с увеличением продолжительности выращивания падает (активность ФI и ФII при этом не меняется).

Խնորանկերի ամսան 12, 18 և 24 ժամվա ընթացքում դիտվել է նրանց ակտիվ էնսիմների հսկայաժամանակ ամինաթթուների տրանսամինազայի ակտիվության խիստ նվազում: Այդ դեպքում հայտնաբերվել են որոշ քանակական տեղաշարժեր ճյուղավորված ամինաթթուների տրանսամինազայի իզոէնզիմային պակերում՝ ФIII-ի ակտիվությունը ամսան ընթացքում զգալի նվազում է (ФI և ФII ակտիվությունը փոփոխության չի ենթարկվում):

The activity of transaminase of yeasts branched amino acids cellfree extract decreases quite sharply during the growth of yeasts in course of 12, 18 and 24 hours. Some quantitative changes in the isoenzyme spectrum of branched amino acids transaminase are detected: during the growth the activity of ФIII decreases (the activity of ФI and ФII is not changed).

Ключевые слова: дрожжи, трансаминаза разветвленных аминокислот, изоферменты.

Ранее нами было установлено, что дрожжи *Candida guilliermondii* ВКМ У-42 содержат, по крайней мере, три изофермента трансаминазы разветвленных аминокислот, два из которых (ФI и ФIII) специфичны ко всем трем разветвленным аминокислотам (валин, лейцин, изолейцин), а один (ФII)—лишь к лейцину [1]. Выделенные изоэнзимы по своей субстратной специфичности и некоторым кинетическим свойствам напоминают соответствующие ферменты животного происхождения [2].

Следует отметить, что физиологическая роль каждого из изоферментов до настоящего времени неясна. Очевидно, в выяснении этого вопроса определенную роль могут сыграть результаты исследования возможных сдвигов в изоферментном спектре при различных физиологических состояниях живого организма.

В литературе имеются данные, согласно которым спектр изоферментов трансаминазы разветвленных аминокислот претерпевает определенные качественные и количественные изменения в зависимости от физиологического состояния животных (в онтогенезе крыс, в нормальных и опухолевых клетках различных животных, в регенерирующей печени крысы и т. д.) [4—6].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении изоферментного спектра трансаминазы разветвленных аминокислот в течение роста дрожжей.

Материал и методика. Выращивание дрожжей, разделение изоферментов и определение ферментативной активности осуществляли по ранее описанному методу [1]. Урожай дрожжей собирали через 12 (середина экспоненциальной фазы), 18 (конец экспоненциальной фазы) и 24 (стационарная фаза) часа. В качестве донора аминогруппы использовали лейцин, акцептора— α -кетоглутаровую кислоту.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследований изучалась общая активность ферментов переаминирования разветвленных аминокислот в бесклеточном экстракте дрожжей (табл. 1).

Таблица 1. Лейцин— α -кетоглутараттрансаминазная активность бесклеточного экстракта дрожжей в зависимости от продолжительности выращивания

Продолжительность выращивания, ч	Активность, мг глу	
	на 100 мг сухих дрожжей	удельная
12	14.4	0.85
18	4.2	0.63
24	2.0	0.76

Как видно из таблицы, наивысшей активностью трансаминамирования лейцина дрожжевые клетки обладают в середине экспоненциальной фазы роста. Далее активность процесса падает и достигает минимального значения в стационарной фазе. Интересно отметить, однако, что удельная активность переаминирования лейцина в процессе роста дрожжей почти не меняется.

В этих опытах нами была замечена определенная закономерность в изменении количества водорастворимого белка в зависимости от продолжительности выращивания дрожжей. Как видно из табл. 2, наи-

Таблица 2. Количество биомассы и водорастворимого белка в зависимости от продолжительности выращивания дрожжей

Продолжительность выращивания, ч	Количество сухих дрожжей, мг	Общее количе- ство белка, мг	Количество белка в 100 мг сухих дрожжей
12	152.0	25.9	17.0
18	422.0	26.1	6.2
21	422.0	11.1	2.6

большее количество его обнаруживается в дрожжах, выращиваемых в течение 12 часов. К 18-му часу оно заметно снижается, а к 24-му достигает минимального значения.

Подобные результаты были получены Рачинским и его сотрудниками [3], которые вели систематические исследования изменения белковых фракций дрожжей рода *Candida* в течение их роста. Наибольшее количество белка оказалось в водорастворимой и щелочерастворимой фракциях, причем в течение роста количество водорастворимого белка заметно падает, а щелочерастворимого — увеличивается [3].

Далее мы провели разделение изоэнзимов трансаминазы разветвленных аминокислот по разработанному в нашей лаборатории методу [1].

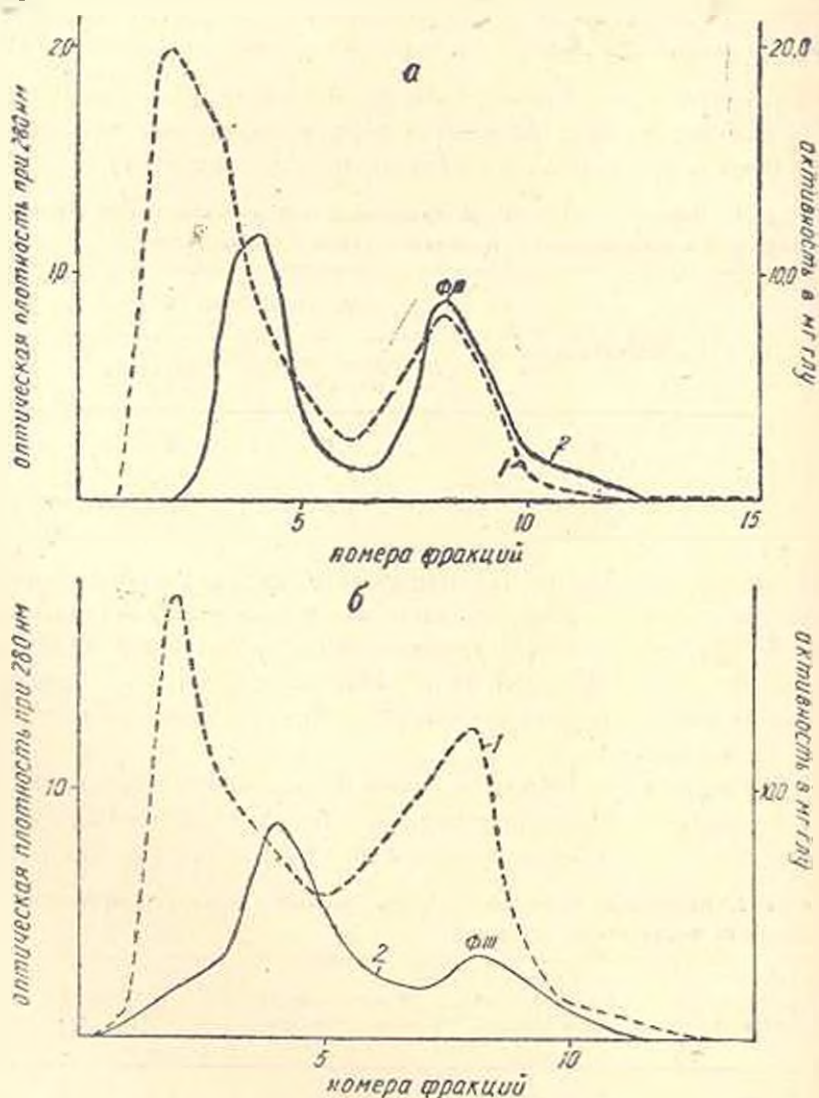


Рис. 1. а) Гельфильтрация бесклеточного экстракта 12-часовой культуры на сефадексе G-200; б) гельфильтрация бесклеточного экстракта 18-часовой культуры на сефадексе G-200. Белок — — — Активность —

Данные гельфильтрации бесклеточного экстракта дрожжей на сефадексе G-200 свидетельствуют о том, что активность переаминирования лейцина в вариантах с 12-часовой культурой фильтруется в виде двух почти одинаковых пиков во фракциях 3—5 и 7—10, в то время как основная часть исследуемой активности 18-часовой культуры фильтруется в виде одного большого пика, заметно уступающего первому, во фракциях 7—10. (рис. 1, а, б).

Данные, полученные нами ранее в опытах с 24-часовой культурой (дрожжи собирались в стационарной фазе роста), выявили более низкий уровень второго пика активности изучаемого фермента, полученного при гельфильтрации на сефадексе G-200 [1]. Следует напомнить

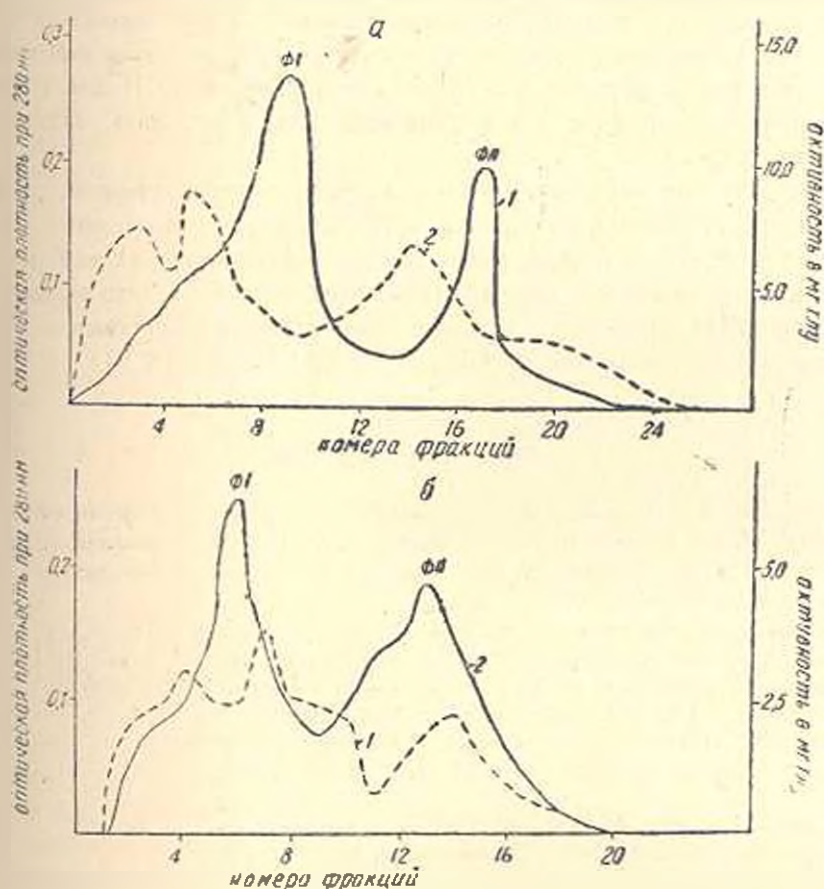


Рис. 2 а) Ионообменная хроматография фракций I пика (сефадекс G-200) 12-часовой культуры на ДЭАЭ целлюлозе; б) Ионообменная хроматография фракций I пика (сефадекс G-200) 18-часовой культуры на ДЭАЭ целлюлозе. Белок — — — —. Активность — — — —.

также, что первый пик активности трансаминазы разветвленных аминокислот, полученный гельфильтрацией, при ионообменной хроматографии на ДЭАЭ целлюлозе разделяется на два пика, один из которых (ФI) специфичен ко всем трем разветвленным аминокислотам, а второй (ФII)—лишь к лейцину. Второй же пик активности, полученный гельфильтрацией (ФIII), дальнейшему разделению на ДЭАЭ целлюлозе не

подвергается; подобно ФI он специфичен ко всем трем разветвленным аминокислотам [1].

Подобные результаты были получены нами при ионообменной хроматографии соответствующих фракций 12- и 18-часовой культур, о чем свидетельствуют данные, приведенные на рис. 2, а, б.

Обобщая, можно заключить, что при выращивании дрожжей в течение 12, 18 и 24 ч качественных сдвигов в изотипном спектре трансаминазы разветвленных аминокислот не происходит. Во всех вариантах обнаруживается наличие трех изоферментов трансаминазы разветвленных аминокислот, два из которых (ФI и ФIII) специфичны ко всем трем разветвленным аминокислотам, а один (ФII) — лишь к лейцину. Однако с увеличением продолжительности выращивания дрожжей активность ФIII заметно снижается до минимального значения в 24-часовой культуре. Таким образом, максимальная активность ФIII достигается в экспоненциальной фазе роста дрожжей, т. е. в молодых, активно делящихся клетках.

Полученные нами данные коррелируют с литературными, согласно которым активность ФIII в почках новорожденных крыс и хомячков выше, чем у взрослых особей, равно как и в печени и почках эмбриона человека, по сравнению с таковой взрослого. Интересно, что высокая активность ФIII характерна для всех исследованных опухолевых тканей человека и животных, по сравнению с нормальными [8, 9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Гогинян Н. В., Багдасарян Е. Г., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 29, 1, 1976.
2. Давтян М. А., Гогинян Н. В., Багдасарян Е. Г. Биол. ж. Армении, 30, 1, 1977.
3. Рачинский В. В., Давидови Е. Г., Корчак О. Б. Прикладная биохимия и микробиология, 6, 621, 1971.
4. Carpuccio C., Kadizaki H., Knox W. Enzyme, 23, 5, 328, 1978.
5. Goto M., Shinno H., Ichihara A. Gion. Jap. Cancer. Res., 68, 5, 663, 1977.
6. Ichihara A., Takahashi H. Biochem. et Biophys. Acta, 497, 274, 1968.
7. Ogawa K., Ichihara A. Cancer. Res., 32, 1257, 1958.
8. Ogawa K., Yokojima A., Ichihara A. J. Biochem., 68, 50, 1970.
9. Roth S., Delotto R., Kaji A. Cancer. Res., 37, 1147, 1977.

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

Поступило 23.I 1984 г.

СИНТЕЗ БЕТА-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА

Е. Р. АЛЕКСАНИАН, М. Н. МАЛАТЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Исследовано влияние возраста посевного материала на синтез бета-фруктофуранозидазы, пуллулана, внеклеточного белка, а также изменение pH среды в культуральной жидкости и морфологию клеток в динамике роста *Aureobasidium pullulans*.

Отмечено, что использование более свежего посевного материала (3-суточного) приводит к сокращению срока достижения максимального синтеза как бета-фруктофуранозидазы, так и пуллулана.

Անվանադրվել է ցանքանյութի փոփոխականի ազդեցությունը բետա-ֆրուկտոֆուրանոզիդազայի, պուլլուլանի, արտաբջջային սպիտակուցի սինթեզի վրա, ինչպես է կուլտուրայի մեդիումի pH-ի փոփոխության և բջջերի մորֆոլոգիայի վրա *Aureobasidium pullulans*-ի աճի զինամիջոցով:

The influence of sowing material age on the beta-fructofuranosidase synthesis, pullulan, extracellular protein, as well as change of medium pH in cultural liquid and morphology of cells in dynamics of *Aureobasidium pullulans* growth has been studied. It has been stated that by the use of a fresher sowing material (of 3 days age) it is possible to provide the highest yield of beta-fructofuranosidase and pullulan synthesis in a shorter period of time.

Ключевые слова: бета-фруктофуранозидаза, пуллулан.

При культивировании микроорганизмов с целью получения различных биологически активных веществ весьма существенное значение имеет возраст посевного материала [4—6]. *Aureobasidium pullulans* отличается изменчивой сложной морфологией. В процессе роста культуры обнаруживаются мицелиальные и дрожжеподобные клетки — бластоспоры, способные к почкованию [10, 14—16].

Известно, что синтез меланинового пигмента и пуллулана *A. pullulans* зависит от условий выращивания и возраста культуры [4, 10]. Ранее нами было показано, что уровень синтеза бета-фруктофуранозидазы [КФ 3.2.1.26], белка, пигмента, полисахарида в процессе роста культуры может сильно варьировать в зависимости от культивирования [1—3]. В данной работе приводятся результаты изучения влияния возраста посевного материала на биосинтез белка, пигмента, пуллулана, накопление биомассы и изменение pH в динамике роста культуры.

Материал и методика. Дрожжеподобный гриб *A. pullulans* выращивали в среде следующего состава (%): K_2HPO_4 —0,5; NaCl—0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ —0,02; $(NH_4)_2SO_4$ —0,06; дрожжевой экстракт—2; сахароза—10 [7]. Твердая среда для посевного материала имела аналогичный состав с добавлением 2% агар-агара.

Посевной материал выращивали на косяках в течение 3, 7 и 10 суток при температуре 26°. Затем культурами указанного возраста засевали жидкую питательную среду (200 мл) в колбах Эрленмейера. Культивирование проводили на круговой скалке (180 об/мин) в течение 7 суток при 26°. Пробы отбирали на 1-, 2-, 3-, 4- и 7-е сутки. Культуральную жидкость после удаления клеток и спор центрифугированием при 10 000 г в течение 20 мин использовали для определения в ней пуллулана, вне-

клеточного белка и бета-фруктофуранозидазы, а также изменения pH в динамике роста культуры. Абсолютно сухую биомассу определяли методом Малестга [12].

Активность бета-фруктофуранозидазы определяли в инкубационной среде, состоящей из 0,7 мл 0,5% -ной сахарозы, 0,3 мл ферментного буфера, pH 5,7 при 50° и течение 15 мин по степени гидролиза сахарозы. Редуцирующие вещества определяли методом Сомоджи-Нельсона [13, 17], белок — по Лоури [11]. Удельную активность фермента (Еуд) рассчитывали по количеству образовавшихся редуцирующих веществ (по глюкозе) на мг белка за одну минуту (мкмоль глюкозы/мг белка/мин).

Морфологические особенности культуры изучали в динамике роста с помощью фазово-контрастного микроскопа.

Результаты и обсуждение. Полученные результаты (рис. 1) свидетельствуют о том, что возраст посевного материала *A. pullulans* ока-

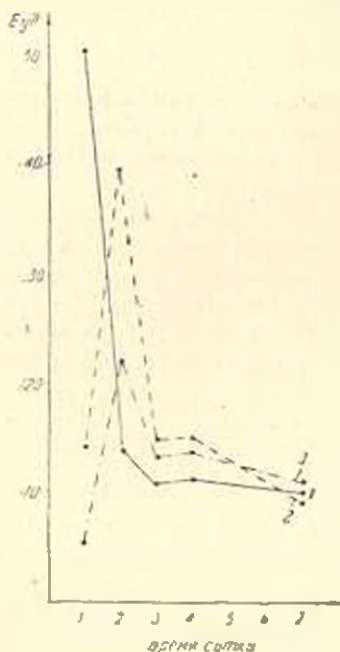


Рис. 1. Влияние возраста посевного материала на активность бета-фруктофуранозидазы. Условные обозначения:

- 1 — 3-суточный посевной материал,
- 2 — 7-суточный посевной материал,
- 3 — 10-суточный посевной материал

зывает существенное влияние на уровень и скорость синтеза бета-фруктофуранозидазы. Наиболее высокие показатели активности и скорости синтеза фермента отмечаются при использовании 3-суточного посевного материала. Максимальная активность выявляется уже в первые сутки роста культуры. В дальнейшем она резко падает и с 3 по 7 сутки находится почти на одинаковом уровне. Инкуляция 7- и 10-суточным посевным материалом приводит к задержке достижения максимальной активности фермента.

Аналогично бета-фруктофуранозидазной активности отмечено определенное сходство между культурами, выращенными из 7- и 10-суточного посевного материала, в отличие от культуры, выращенной при засеве 3-суточным материалом, в процессе синтеза биомассы, пуллулана, внеклеточного белка, а также pH. 3-суточный посевной материал способствует более эффективному биосинтезу пуллулана и лучшему росту культуры, особенно заметному на 4—7-е сутки (табл.). С большей интенсивностью протекает процесс накопления внеклеточного белка в культуральной жидкости. И, наконец, в этом случае зафиксиро-

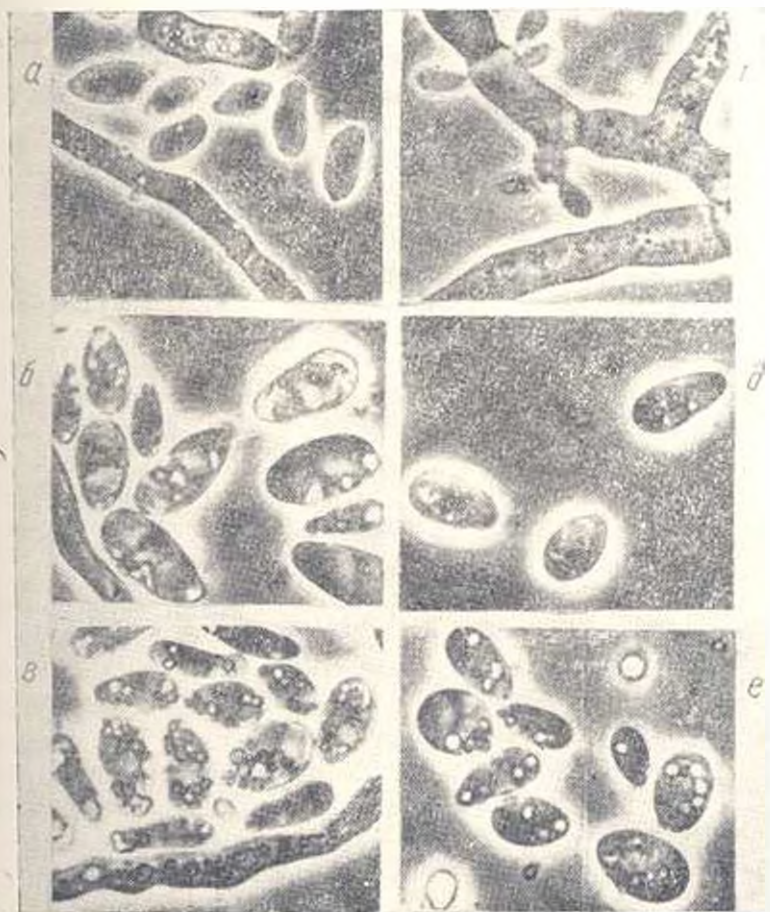


Рис. 2. Морфологические изменения культуры *A. pullulans* в процессе роста. Фазовый контраст. Об. 90X, гомаль 5X. а) 3-суточная культура на агаризованной среде, б) 7-суточная культура на агаризованной среде, в) 10-суточная культура на агаризованной среде. г) 1-суточная культура в жидкой среде, д) 2-суточная культура в жидкой среде, е) 7-суточная культура в жидкой среде.

Таблица. Влияние возраста посевного материала на биосинтетическую активность *A. pullulans*.

Возраст посевного материала, сутки	Время культивирования, сутки				
	1	2	3	4	7
гуанидин, мг/мл					
3	0.23	2.68	10.11	15.50	25.41
7	0.04	0.41	6.25	12.51	20.03
10	0.03	0.17	6.61	12.51	20.90
белок, мг/мл					
3	0.33	0.30	0.46	0.88	0.90
7	0.27	0.37	0.45	0.77	0.82
10	0.25	0.39	0.48	0.76	0.82
биомасса (абсолютно сухая), мг/мл					
3	0.25	1.97	3.11	3.68	5.45
7	0.65	1.34	2.74	3.28	4.05
10	0.28	1.48	2.97	3.25	4.22
pH					
3	7.44	6.89	6.55	5.92	5.02
7	7.51	6.99	6.91	6.83	6.42
10	7.68	7.11	6.84	6.70	6.22

вано сравнительно более сильное подкисление pH питательной среды к концу ферментации.

Результаты исследований показали также, что независимо от возраста посевного материала постепенно усиливается пигментация. Изучение морфологии клеток культур, выращенных на агаризованной среде, также выявило зависимость от возраста (рис. 2). Культура 3-суточного возраста (рис. 2а) представлена в основном дрожжеподобными клетками—бластоспорами и небольшим количеством мицелиальных форм. Цитоплазма бластоспор в условиях фазового контраста выглядит гомогенной. Обнаруживаются единичные почкующиеся бластоспоры. В цитоплазме мицелия наблюдаются светопреломляющие гранулы. В 7-суточной культуре (рис. 2б) присутствуют как дрожжеподобные клетки, так и мицелиальные формы. В бластоспорах обнаруживаются крупные вакуоли. Как дрожжеподобные клетки, так и мицелиальные содержат светопреломляющие гранулы различной величины.

В 10-суточной культуре (рис. 2в) соотношение количества дрожжеподобных и мицелиальных форм такое же, как и в 7-суточной, однако ее клетки отличаются наличием большого количества зерен запасных веществ в цитоплазме.

В первые сутки после пересева 3-суточной агаровой культуры в свежую жидкую питательную среду она переходит в мицелиальную стадию. В этот период свободных дрожжеподобных клеток в ней очень мало, но гифы активно почкуются (рис. 2г). Однако уже на вторые сутки количество дрожжеподобных клеток сильно увеличивается (рис. 2д), а мицелиальных форм становится значительно меньше. 3-суточная жидкая культура представлена в основном дрожжеподобными клетками и еди-

ничными мицелиальными формами. В дальнейшем (4–7-е сутки) подобное соотношение сохраняется. Однако сами клетки заметно меняются. В цитоплазме появляются вакуоли и зерна запасных веществ (рис. 2е).

При использовании 7- и 10-суточного посевного материала культура развивается аналогичным образом, но с некоторой задержкой по сравнению с 3-суточным посевным материалом.

Сопоставление морфологической картины развития культур с динамикой бета-фруктофуранозидазной активности и синтеза пуллулана показывает, что пик активности фермента (рис. 1) совпадает с увеличением количества мицелиальных форм. На вторые сутки бета-фруктофуранозидазная активность культуры из 3-суточного посевного материала резко падает, что совпадает с уменьшением количества мицелиальных форм и значительным увеличением дрожжеподобных. При этом усиливается и синтез пуллулана (табл.). Аналогичные результаты были описаны в работах Катлея [8, 9].

При использовании 7- и 10-суточного посевного материала максимум бета-фруктофуранозидазной активности по сравнению с 3-суточным сдвигается на вторые сутки, а ощутимый синтез пуллулана начинается на третьи сутки.

Проведенные исследования показывают, что биосинтез бета-фруктофуранозидазы и полисахарида *A. pullulans* существенно зависит от физиолого-морфологического состояния культуры. Подбором возраста инокулята возможно регулировать скорость и уровень биосинтеза бета-фруктофуранозидазы и полисахарида при культивировании *A. pullulans*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Микробиология, 1, 49, 1985.
2. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С. Биол. ж. Армении, 37, 10, 892, 1984.
3. Алексанян Е. Р., Маркосян Л. С., Хачатурян А. А. Биол. ж. Армении, 39, 4, 1986.
4. Грачева Н. М. Фермент. и спирт. пром., 8, 31, 1982.
5. Орлов И. А., Толстиков В. Г. В кн.: Мат-лы науч. конф., посвящ. итогам научно-исслед. работы ин-та за 1970 г., 10, 1971.
6. Серова Ю. Э., Добролюбовская Г. М. Прикл. биохим. и микробиол., 2, 207, 1975.
7. Bender H., Wallenfels K. Biochem. Z., 324, 79, 1961.
8. Catley B. J. J. Gen. Microbiol., 78, 33, 1973.
9. Catley B. J. Microbial polysaccharides and polysaccharases, 12, 69, 1980.
10. Crang R. E., Pechak D. G. J. of Coatings Technology, 50, 639, 36, 1978.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall L. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
12. Malette M. F. Methods in Microbiology, 1, 539, 1969.
13. Nelson N., G. J. Biol. Chem., 53, 1, 375, 1944.
14. Pechak D. G., Crang R. E. Mycologia, 69, 773, 1977.
15. Ramos S., Garcia-Acha J. Trans. Brit. Mycol. Soc., 61, 129, 1975.
16. Ramos S., Garcia-Acha J., Peberdy J. F. Trans. Brit. Mycol. Soc., 61, 283, 1975.
17. Somoji M. J. Biol. Chem., 197, 1, 19, 1952.

МОДЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРУКТУРЫ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В РАСТВОРАХ ПОЛИЭТИЛЕНГЛИКОЛЯ

А. Г. ГАБРИЕЛЯН, Н. А. ГУКАСЯН, А. Г. АРАКЕЛЯН

Изучены особенности гидратации различных групп нуклеиновых кислот в условиях компактизации молекул ДНК в присутствии ПЭГ. Наибольшее влияние ПЭГ оказывает на фосфатные группы: происходит сильная дегидратация фосфатов нуклеозидов и значительно изменяются термодинамические параметры переноса этих соединений из растворов, не содержащих ПЭГ, в ПЭГ-содержащие растворы.

Ընկերակցության էն հետազոտությունները տարբեր խմբերի հիդրատացիայի առանձնահատկությունները ՊԷԳ-ի ներկայությամբ: ՊԷԳ-ի առկայությանը կոմպակտիզացիայի պայմաններում ՊԷԳ-ը առանձնապես ազդեցություն է բաղկում ֆոսֆատային խմբերի վրա՝ տեղի է ունենում նուկլեոզիդների ֆոսֆատների ուժեղ դեհիդրատում և ՊԷԳ-չպարունակող լուծույթներից ՊԷԳ-պարունակող լուծույթներ այդ միացությունների տեղափոխմանը թերմոդինամիկական պարամետրերի զգալի փոփոխություն:

Peculiarities of hydration of nucleic acids various groups have been studied under conditions of DNA molecules compactization in the presence of PEG. PEG influences greatly on phosphate groups: strong dehydration of phosphate nucleosides and significant changes in thermodynamic parameters of transfer of these combinations from solutions, not containing PEG into PEG-containing solutions take place.

Ключевые слова: компоненты нуклеиновых кислот, растворимость, полиэтиленгликоль

В последние годы экспериментально и теоретически исследуется переход двухцепочечной ДНК на уровне третичной структуры в компактную горообразную форму [3-6, 9, 15, 18, 19]. Интерес к этой структуре объясняется тем, что для ДНК многих биологических объектов характерна аналогичная специфическая третичная структура. Процесс конденсации—деконденсации хромосом эукариот также является обратимым переходом в компактную форму. Переход может быть вызван полиаминами (спермидин, гистон H1, полилизин). Исследование процесса компактизации *in vivo* затруднено из-за наличия усложняющих факторов в клетке. Поэтому переход этот изучают в основном *in vitro*, пользуясь тем, что он происходит и в растворах нейтральных полимеров, гидрофобно-гидрофильных, подобно полиаминам, например, в водно-солевых растворах полиэтиленгликоля (ПЭГ) [3, 5, 19].

Двухспиральные молекулы ДНК упорядоченно укладываются в форму торов постоянного размера (~ 1000 Å в диаметре) при определенных «критических» значениях pH, концентраций соли и ПЭГ, а также молекулярных масс ПЭГ. Показано, что этот внутримолекулярный переход обратим. Экспериментально подробно изучены интервалы условий компактизации и свойства компактных молекул ДНК [7, 11, 17, 21]. В теоретических работах последних лет показано, что в растворе ПЭГ при определенных условиях минимуму свободной энергии одиночной молекулы ДНК соответствует именно компактная форма. При компактизации полимеров, жесткость которых сопоставима с жесткостью ДНК,

должны получаться частицы торообразной формы [3, 4, 9]. Фриш и Фесциан показали [15] отрицательное взаимодействие ДНК с ПЭГ, приходящее как к компактизации молекул ДНК, так и к конкурентному процессу агрегации их с приобретением свойств, характерных для холестерических жидких кристаллов [8, 10].

Нами предпринята попытка выяснения деталей механизма действия ПЭГ на структуру ДНК и системе ПЭГ—соль—вода. Представлялось интересным изучить влияние ПЭГ на гидратацию компонентов нуклеиновых кислот и выяснить, имеются ли в условиях, соответствующих компактизации ДНК, сколько-нибудь значительные изменения во взаимодействии молекул оснований, нуклеозидов и нуклеотидов с водой. С этой целью мы провели модельные эксперименты по измерению растворимости оснований, нуклеозидов и их фосфатов. Как известно, такое изучение растворимости соответствующих модельных соединений (пептидов, азотистых оснований и т. д.) дает большую информацию о механизмах воздействия растворителя или его составляющих на биополимеры [16, 22, 23]. Измерение температурной зависимости растворимости позволяет вычислить термодинамические параметры переноса этих модельных соединений из одного растворителя в другой (свободную энергию, а также энтальпийную и энтропийную составляющие процесса переноса) [1, 20, 22].

Материал и методика. Изучалась растворимость следующих азотистых оснований, нуклеозидов и их фосфорных эфиров: аденина, тимина, цитидина, гуанина, урацила, дезоксиаденина, тимидина, цитидина, гуанозина, аденозин-фосфата, цитидинфосфата, уридинфосфата, гуанозинфосфата и аденозин-трифосфата (все фосфаты взяты в виде натриевых солей). Коэффициенты экстинкции и характеристические длины волн этих соединений брались из литературы [12].

Избыточное количество исследуемого вещества помещалось в 0,02 М фосфатный буфер (рН 7,18), содержащий NaCl определенной концентрации 0,01; 0,1; 0,3; 1,0 М; ПЭГ (фирмы «Мерк») следующих молекулярных масс и концентраций: 300, 400, 600, 1000, 4000, 6000, 40000, 25, 50, 75, 100, 125, 145 мг/мл. Эта смесь, помещенная в плотно закрытый сосуд, в течение трех суток размешивалась при постоянной температуре (25, 35, 45, 55°) и затем оставлялась стоять при данной температуре на сутки для разделения фаз. Проверялось постоянство твердой фазы.

Измерение содержания вещества в надосадочной жидкости производилось спектрофотометрически (СФ-4а) после разбавления раствора до концентраций вещества, отвечающих оптимальной оптической плотности (10^{-1} М). Известно, что основания, нуклеозиды и нуклеотиды в растворах способны к самоассоциациям, стеккинг-взаимодействиям, однако константы ассоциации, вычисленные Робинсоном, Грантом [22], оказались настолько малы для подобных экспериментов, что можно пользоваться законом Бера. Полученная нами зависимость амплитуды сигнала ПМР (атомы C_2 и C_4 аденозина) также свидетельствует об отсутствии заметной самоассоциации при использованных концентрациях $\sim 0,1$ М. Заметьного отклонения от прямолинейной зависимости величины химического сдвига от объемной доли добавляемого растворителя не наблюдалось. ПМР-исследования проводились на спектрометре марки «Тесла Б-167».

Результаты и обсуждение. Подробнее других соединений был изучен аденозин по причинам, изложенным ранее [2]. Показано, что растворимость аденозина мало зависит от концентрации ПЭГ (25—145 мг/мл) при постоянной молекулярной массе последнего и неизменной ионной силе раствора и лишь несколько возрастает при концентрации ПЭГ 100 мг/мл. Далее были зафиксированы ионная сила (0,3) и концентрация ПЭГ (100 мг/мл), а молекулярная масса ПЭГ варьировалась. В этом слу-

час изменения растворимости аденозина при переходе через критическую молекулярную массу ПЭГ были незначительны. Изменение концентрации NaCl (0,01; 0,1; 0,3; 1,0 М) при постоянных значениях молекулярной массы и концентрации ПЭГ также не оказывало существенного влияния на относительную растворимость аденозина [2, 14, 17, 22].

При изучении других соединений мы ограничились лишь оптимальными условиями, соответствующими компактизации ДНК: ионной силой раствора—0,3; концентрацией ПЭГ—100 мг/мл, молекулярной массой ПЭГ—40000.

В табл. сведены данные о растворимости (в молях на литр) нуклеозидов и азотистых оснований при наличии (С) и отсутствии (С₀) ПЭГ. Растворимость всех соединений увеличивалась с повышением температуры от 25 до 55°. Известно, что действие этих соединений на воду, с одной стороны, разрушающее, с другой —упорядочивающее. Преобладание разрушающего действия связано с несоответствием формы и размеров молекул этих веществ и воды, а также с различием во взаимодействии молекул нуклеозида и воды. С увеличением температуры структура воды разрушается, и гидратация растворенного основания или нуклеозида увеличивается как в растворах с ПЭГ, так и без него.

Для большинства азотистых оснований и нуклеозидов значения относительной растворимости С/С₀ близки к единице. В присутствии ПЭГ

Таблица. Растворимость компонентов нуклеиновых кислот в растворах с ПЭГ и без него и термодинамические параметры переноса в ПЭГ-содержащие растворы

Соединение	Т°К	С ₀ , М л	С, М л	ΔF _{tr} , кал/М	ΔH _{tr} , кал/М	ΔS _{tr} , кал/Мград
1	2	3	4	5	6	7
Адезин	298	0.0073	0.0133	-354.0	114.3	1.57
	308	0.0107	0.0196	-369.2		1.57
	318	0.0161	0.0320	-421.2		1.68
	328	0.0224	0.0403	-382.4		1.51
Тимин	298	0.0327	0.0331	-11.7	0	0.04
	308	0.0388	0.0445	-81.2		0.26
	318	0.0560	0.0389	-32.5		0.13
	328	0.0687	0.0775	-69.0		0.21
Цитозин	298	0.0668	0.0680	-10.6	0	0.03
	308	0.1047	0.1054	-4.2		0.01
	318	0.1461	0.1504	-18.6		0.06
	328	0.1482	0.2223	-90.9		0.28
Урацил	298	0.0290	0.0280	16.2	0	-0.054
	308	0.0380	0.0420	-57.7		0.187
	318	0.0530	0.0560	-35.7		0.122
	328	0.0750	0.0770	-16.63		0.049
Гуанин	298	0.0010	0.0001	1230.6	11404	44.21
	308	0.0070	0.0031	129.79		44.72
	318	0.0140	0.0120	17.36		44.69
	328	0.0140	0.0110	197.097		43.44

1	2	3	4	5	6	7
Аденозин	298	0.0910	0.0290	-247.1	150.9	0.32
	308	0.0288	0.0413	-219.7		0.22
	318	0.0523	0.0737	-211.7		0.19
	328	0.0562	0.0862	-278.0		0.39
Дезоксиаденозин	298	0.0226	0.0309	-184.3	0	0.62
	308	0.0476	0.0619	-159.8		0.52
	318	0.1626	0.1276	-166.4		0.52
	328	0.0980	0.2176	-189.5		0.58
Тимидин	298	0.2080	0.2080	-23.7	0	0.08
	308	0.2928	0.3288	-70.9		0.23
	318	0.4614	0.4701	-11.9		0.04
	328	0.6187	0.7004	-80.7		0.25
Цитидин	298	0.8061	0.7930	9.59	-1629.1	-6.17
	308	0.8202	1.0030	126.66		-6.35
	318	0.8077	1.0618	-167.6		-5.22
	328	1.0839	1.4092	-150.356		-5.09
Гуанозин	298	0.0020	0.0030	-336.14	-3118	-9.34
	308	0.0030	0.0050	-274.04		-9.23
	318	0.0100	0.0110	-89.1		-9.52
	328	0.0210	0.0235	-87.90		-9.30
Аденозинфосфат	298	0.0834	0.0334	513.6	609.6	3.77
	308	0.2473	0.0976	567.9		3.82
	318	0.2760	0.1086	588.3		3.77
	328	0.3210	0.1188	646.7		3.83
Уридинфосфат	298	0.9340	0.8790	35.97	-685.9	-2.42
	308	1.2310	1.0400	103.24		-2.56
	318	1.3010	1.1330	88.41		-2.435
	328	1.5060	0.8990	404.97		-3.63
Цитидинфосфат	298	0.0460	0.0360	157.2	-2057.8	-7.433
	308	0.0064	0.0470	189.5		-7.296
	318	0.0950	0.0610	279.3		-7.035
	328	0.1420	0.0820	354.9		-7.356
Гуанозиндифосфат	298	0.0520	0.0310	301.84	-2658.4	-13.26
	308	0.0770	0.0460	333.94		-12.96
	318	0.0950	0.0440	485.39		-13.03
	328	0.2240	0.0730	728.64		-13.37
Аденозинтрифосфат	298	0.5352	0.7630	53.8	-4572.8	-15.53
	308	1.0620	0.6840	268.9		-15.72
	318	1.4060	0.7550	396.6		-15.63
	328	1.9910	0.6900	730.0		-16.10

наблюдается лишь некоторое увеличение растворимости при данной температуре, что соответствует результатам изучения растворимости других циклических органических соединений (нафталина и бифенила) в водных растворах различных полимеров, в том числе ПЭГ [13].

При сравнении растворимости дезоксиаденозина, аденозина и аденина, а также тимидина и тимина, цитидина и цитозина (таблица) не обнаружено значительного влияния ПЭГ на гидратацию как оснований, так и остатков рибозы и дезоксирибозы.

Аномальное поведение гуанина и гуанозина (см. табл.) может быть вызвано дополнительными эффектами, связанными со способностью гуаниновых соединений к сильной самоассоциации в растворах, в связи с чем закон Бера оказывается неприменимым, и возникает необходимость введения поправки на самоассоциацию. Как видно из таблицы, относительная растворимость при повышении температуры приближается к единице, что закономерно, так как с увеличением температуры эффект самоассоциации сходит на нет.

Результаты изучения температурной зависимости позволяют оценить термодинамические функции переноса соединений из растворов без ПЭГ в растворы, содержащие ПЭГ, согласно формулам:

$$\left\{ \begin{aligned} \Delta F_{tr} &= RT \ln \frac{C}{C_0}, \\ \lg \frac{C}{C_0} &= \frac{\Delta H_{tr}}{2,303 RT} + \frac{\Delta S_{tr}}{2,303 R}, \\ \Delta S_{tr} &= \frac{\Delta H_{tr} - \Delta F_{tr}}{T}, \text{ где} \end{aligned} \right.$$

$\frac{C}{C_0}$ — относительная растворимость: отношение растворимости вещества (в М/л) в растворе, содержащем ПЭГ (C), к растворимости в растворе, не содержащем ПЭГ (C_0), при той же температуре, ΔF_{tr} — свободная энергия переноса 1 моля вещества из раствора вода—соль в раствор вода—соль—ПЭГ, ΔS_{tr} — энтропия переноса, ΔH_{tr} — энтальпия переноса, определяемая по наклону кривой Вант-Гоффа зависимости $\lg \frac{C}{C_0}$ от $\frac{1}{T}$ [20]. Иногда графики Вант-Гоффа оказываются искривленными,

что свидетельствует о зависимости величины ΔH_{tr} от температуры и существенности вклада теплоемкости в определяемые термодинамические величины. В таких случаях можно говорить лишь о тенденциях параметров ΔH_{tr} и ΔS_{tr} , а для более точного определения требуются микрокалориметрические измерения. Такие кривые приведены на рис. 1. Для азотистых оснований и нуклеозидов, как и можно было предвидеть из исходных данных по растворимости, значительных термодинамических эффектов не наблюдается (за исключением соединений с гуанином, о чем сказано выше).

Свободные энергии переноса, энтальпийные и энтропийные изменения во всех случаях невелики. Энтропия перехода характеризуется небольшими отрицательными или положительными значениями, что свидетельствует об отсутствии эффекта ПЭГ на гидрофобные и стеклинга-взаимодействия оснований, ибо в противном случае имели бы место зна-

чительные энтропийные эффекты. Поэтому нельзя согласиться с интерпретацией некоторых авторов [13], согласно которой увеличение срока циклических соединений к растворителю объясняется возрастанием гидрофобности растворителя в присутствии ПЭГ.

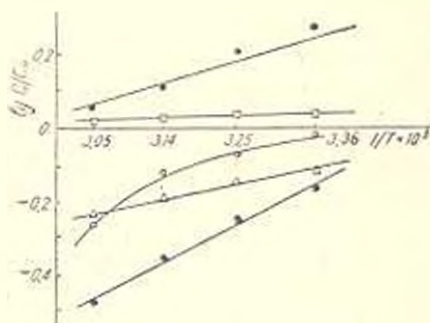


Рис. 1. Кривые Вант-Гоффа для (●) гуанозина, (□) урацила, (○) уридинмонофосфата, (Δ) цитидинмонофосфата, (⊗) гуанидиндифосфата.

Отсутствие влияния ПЭГ на гидрофобные взаимодействия азотистых оснований неудивительно, так как укладка в компактную структуру, по-видимому, происходит без нарушения спаривания и стеклинга оснований и не сопровождается разворачиванием внутренних групп ДНК (оснований) в растворитель. Поэтому и не должно быть простой корреляции между процессом компактизации и изменением растворимости азотистых оснований, как это имеет место при денатурации двуспиральной ДНК, когда основания полностью контактируют с растворителем.

Отсутствие влияния ПЭГ на гидратацию аденозина подтверждается также ПМР-исследованиями растворов аденозина. ПЭГ не влияет на пики протонов C_8 и C_2 аденозина. Сигналы от C_H_2 и C_H протонов ПЭГ также не меняются в присутствии аденозина.

По-видимому, наиболее существенным является влияние ПЭГ из фосфатные группы [1], значение которых обусловлено не только экранировкой их противоположами. При используемых ионных силах, необходимых для компактизации, фосфаты ДНК оказываются экранированными. Как явствует из таблицы, ПЭГ вызывает ощутимое уменьшение растворимости всех нуклеотидов. Увеличение количества фосфатных групп в соединениях приводит к усилению эффекта дегидратации.

Как видно из рис. 2, величины свободной энергии переноса фосфатов нуклеозидов в растворы, содержащие ПЭГ, положительны, что указывает на энергетическую невыгодность процесса переноса фосфатов в ПЭГ-содержащие растворы.

На рис. 3 даны графики энтропий переноса с отрицательными значениями ΔS_{tr} , говорящими о структурировании воды и дегидратации растворенных соединений.

Таким образом, ПЭГ оказывает сильное дегидратирующее действие на фосфатные группы, что согласуется со способностью макромолекул ДНК к сворачиванию в компактную глобулу и к межмолекулярной агрегации в водно-солевых растворах в присутствии ПЭГ. ПЭГ-содержащие растворы являются θ-растворителями для ДНК. Явления компак-

таши и межмолекулярной агрегации являются конкурентными, движущей силой которых является стремление двойной спирали к минималь-

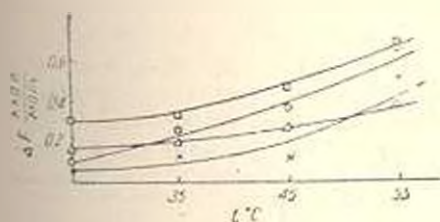


Рис. 2.

Рис. 2. Величины свободной энергии переноса фосфорных эфиров нуклеозидов из водно-солевых в ПЭГ-содержащие растворы как функция температуры: (X) уридинмонофосфат, (Δ) пиримидинмонофосфат, (□) гуанидиндифосфат, (o) аденозинтрифосфат.

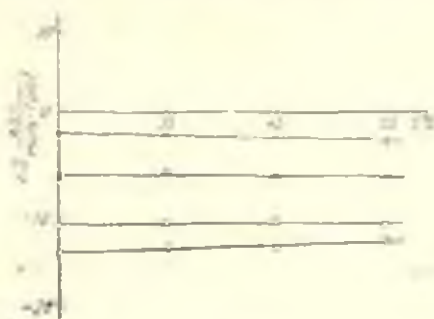


Рис. 3.

Рис. 3. Температурная зависимость величины энтропий переноса фосфатов нуклеозидов в ПЭГ-содержащие растворы: (X) уридинмонофосфата, (▲) пиримидинмонофосфата, (□) гуанидиндифосфата, (o) аденозинтрифосфата

но возможному числу контактов с растворителем (водой). По-видимому, в клетке реализуются оба эти пути.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян А. Г. В сб.: Международный симпозиум по биофизике нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов, 198, Таллин, 1981.
2. Габриелян А. Г. Биофизика, 22, 5, 1977.
3. Гросберг А. Ю., Ерихмилович И. Я., Шахнович Е. И. Биофизика, 26, 415, 1981.
4. Гросберг А. Ю. Докл. АН СССР, 253, 1370, 1980.
5. Евдокимов Ю. М., Акименко Н. М., Глухова Н. Е., Варшавский Я. М. Мол. биол., 8, 396, 1974.
6. Евдокимов Ю. М., Салаянов А. М. Мол. биол., 11, 303, 1977.
7. Евдокимов Ю. М., Скуридин С. Г., Варшавский Я. М. Докл. АН СССР, 246, 2, 1979.
8. Жем П. де. Физика жидких кристаллов. М., 1977.
9. Лифшиц Н. М., Гросберг А. Ю., Хохлова А. Р. Успехи физ. наук, 127, 353, 1983.
10. Минц Р. И., Кононенко Е. В. Жидкие кристаллы в биологических системах. Итоги науки и техники, Биофизика, ВИНИТИ, 13, 1982.
11. Пятигорский Т. Н., Евдокимов Ю. М., Варшавский Я. М. Мол. биол., 12, 404, 1978.
12. Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A. The Nucleic Acids, I. Academic press, Inc. New-York, 1963, ed. by Chargaff E., I. N. Davidson.
13. Okamoto T., Ise N. J. Phys. Chem., 73, 5, 1969.
14. Farster S., Johnson J. K. J. Polymer Sci., 50, 379, 1961.
15. Frish L. H. L., Feshtyan S. J. Polymer Sci., Polymer Letters Edition, 17, 309, 1979.
16. Herzkovits T. H., Harrington J. B. Biochemistry, 11, 486, 1972.
17. Jordan C. F., Lerman L. S., Venable J. H. Nature New Biology, 226, 67-70, 1972.
18. Lerman L. S. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 8, 1886, 1977.
19. Lerman L. S., Wilkerson L. S., Venable J. H., Robinson B. H. J. Mol. Biol., 108, 271-293, 1977.
20. Long F. A., McDevitt W. F. Chem. Rev., 51, 119, 1952.
21. Post C. B., Zimm B. H. Biopolymers, 18, 1487, 1979.
22. Robinson D. K., Grant M. E. J. Biol. Chem., 4030, 1966.
23. Stokx J., Aert A., van Clewarrty. Bull. Soc. Chem., Belges, 75, 673, 1966.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСЛА SH-ГРУПП И ГИСТИДИНОВЫХ ОСТАТКОВ В ДРОЖЖЕВОЙ АРГИНАЗЕ

С. В. ЧУБАРИН, Л. Р. ТУМАНИН, Р. О. ТОРЧАНИ

Обнаружен восстанавливающий эффект восстановленного глутатиона и меркаптоэтанол-этанола на дрожжевую аргиназу при предынкубировании ферментного препарата с парахлормеркурибензоатом. Установлено наличие 24,5 быстрореагирующих SH-групп в молекуле выделенной нами дрожжевой аргиназы. Диэтилпирокарбонат в концентрации $4,2 \times 10^{-4}$ М подвергает модификации 6—7 остатков гистидина, что сопровождается падением ферментативной активности.

Հայտնաբերվել է վերականգնված գլուտաթիոնի և մերկապտոլթանոլի վերականգնիչ ա-
րեցույթյունը խմորաանկալին արգինազայի ակտիվության վրա՝ ֆերմենտային պրեպարատը
պարաքլորմերկուրիբենզոատի հետ ինկուբացիայի ենթարկելու դեպքում: Հաստատվել է արագ
անկցվող 24,5 SH-խմորի ակտիվությունը մարդված խմորաանկալին արգինազայի մոլեկուլում:
Դիէթիլպիրոկարբոնատը $4,2 \times 10^{-4}$ М կոնցենտրացիայի դեպքում մոդիֆիկացիայի է ենթար-
կում 6—7 իստիդինային մնացորդ, որի հետևանքով տեղի է ունենում արգինազայի ակտիվու-
թյան նվազում:

The recovering effect of the recovered glutathion and mercaptoethanol on the yeast arginase during preincubation of enzyme preparation with parachloromercuribenzoate has been found. The presence of 24.5 transitory reacting SH-groups in the molecule of the isolated yeast arginase has been established. 6—7 histidine residues are modulated by 4.2×10^{-4} M diethylpyrocarbonate, what is followed by the decrease of enzymatic activity.

Ключевые слова: аргиназа дрожжей, SH-группы, гистидиновые остатки.

Для получения информации о механизме действия фермента необходимы исследования по выявлению функциональных групп, участвующих в проявлении его активности. Аргиназа в этом отношении изучена недостаточно.

Ранее с помощью реагентов на тиоловые группы—иодацетата, иодацетамида, парабензохинона и парахлормеркурибензоата (ПХМБ)—и специфического модификатора гистидиновых остатков диэтилпирокарбоната (ДПК) нами было показано наличие SH-групп и гистидиновых остатков в аргиназе *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* [3], необходимых для проявления активности фермента. Восстанавливающие агенты—глутатион восстановленный и меркаптоэтанол—в различной степени предохраняли активность фермента от действия ПХМБ.

В настоящем исследовании приводятся результаты изучения возможности восстановления аргиназной активности указанными реагентами после воздействия ПХМБ, а также определения числа SH-групп и гистидиновых остатков в молекуле фермента.

Материал и методика. Объектом исследования служили дрожжи *Candida guilliermondii* var. *membranaefaciens* ВКМ У-43. Выращивание и разрушение клеток, очистку фермента, определение аргиназной активности и белка проводили по ранее описанным методикам [2, 4]. ПХМБ и восстанавливающие реагенты, восстановленный глутатион и меркаптоэтанол, добавляли в концентрациях 10^{-4} — 10^{-8} М. Ци-

для *SH*-групп определяли спектрофотометрическим методом Бойера [6]. При химической модификации гистидиновых остатков, проводимой по описанному ранее методу [3], использовали ферментный препарат в фосфатном буфере, рН 6,0. Число модифицированных гистидиновых остатков определяли измерением оптической плотности на спектрофотометре СФ-16, используя $E_{240} = 3,2 \times 10^3$ л/Мхсм.

Результаты и обсуждение. Результаты изучения восстанавливающего эффекта меркаптоэтанола и восстановленного глутатиона приводятся в табл. 1. Восстанавливающий эффект глутатиона при предын-

Таблица 1. Восстановление аргиназной активности меркаптоэтанолом и восстановленным глутатионом после предынкубирования дрожжевой аргиназы с ПХМБ

Концентрация, М	Активность, %					
	Предынкубирование с аргинином			Предынкубирование без аргинина		
	ПХМБ	ПХМБ+МЭ	ПХМБ+Глут- -SH	ПХМБ	ПХМБ+МЭ	ПХМБ+Глут- -SH
10^{-4}	0	0	0	0	0	0
10^{-5}	0	41.7	0	0	0	0
5×10^{-6}	0	67.9	1.2	0	43.0	0
10^{-6}	0	71.8	10.0	0	77.0	0
5×10^{-7}	24.7	67.3	32.7	31.5	69.0	28.6
10^{-7}	25.7	73.7	94.0	79.6	91.0	80.0
10^{-8}	92.7	103.5	100.0	91.2	94.0	94.8

кубировании ферментного препарата с ПХМБ без аргинина начинает проявляться лишь с концентрации 5×10^{-7} М, а в среде с аргинином он обнаруживается уже с концентрации 5×10^{-6} М, что согласуется с результатами изучения действия его при одновременном добавлении его с ПХМБ [3]. Восстанавливающий эффект меркаптоэтанола при предынкубировании ферментного препарата с ПХМБ в присутствии аргинина также начинает проявляться с той же концентрации, что и его защитный эффект [3], а при предынкубировании без него, как и в случае с глутатионом, он обнаруживается при более низких концентрациях: 10^{-5} М и 5×10^{-6} М. В присутствии аргинина активность равна 41,7 и 67,9%, а без него—0 и 43% соответственно. По всей вероятности, присутствие аргинина при предынкубировании с ПХМБ способствует более быстрому восстановлению активности.

Поскольку результаты вышеприведенных и более ранних наших исследований [3] указывают на роль *SH*-групп в проявлении активности дрожжевой аргиназы, мы попытались определить число сульфгидрильных групп в молекуле нашего фермента.

Для спектрофотометрического определения числа быстро реагирующих сульфгидрильных групп к 3 мл раствора фермента (0,17 мг белка в 1 мл) в кварцевой кювете добавляли по 0,02 мл 10^{-3} М раствора ПХМБ, стандартизованного при длине волны 232 нм. После перемешивания измеряли изменение поглощения при длине волны 250 нм.

Из рис. видно, что дальнейшее добавление раствора ПХМБ после 0,09 мл не сопровождается изменением в поглощении. Подсчитанное на основе этого число свободных быстрореагирующих SH-групп в молекуле фермента (молекулярный вес 151 000 [5]) было равно 25,4.



Число быстрореагирующих SH-групп в молекуле дрожжевой аргиназы.

В следующей серии экспериментов нами исследовалось влияние разных концентраций ДПК на активность дрожжевой аргиназы. Поскольку, согласно данным Давтяна и Геворкян [1], L-аргинин, L-лизин и L-орнитин частично предохраняют аргиназу от инактивирования путем уменьшения числа модифицированных остатков гистидина, исследования проводились также в присутствии указанных аминокислот, которые брались в количестве 50 мкМ на пробу. Данные, представленные в табл. 2, показывают, что при наимышей из использованных нами

Таблица 2. Зависимость инактивации аргиназы от концентрации ДПК и влияние аргинина, орнитина и лизина на процесс инактивации

Варианты	А к т и в н о с т ь, %					
	4.2×10^{-2}	$2.1 \cdot 10^{-2}$	4.1×10^{-3}	8.4×10^{-4}	2.1×10^{-4}	10^{-4}
ДПК	1.7	9.3	41.4	70.5	76.0	101.0
ДПК + Арг	2.2	2.8	56.3	90.0	98.6	101.0
ДПК + Орн	1.7	2.2	36.0	49.8	61.5	67.7
ДПК + Лиз	2.0	4.9	41.3	51.0	69.5	72.0

концентраций реагента— 4.2×10^{-2} М активность аргиназы фактически полностью подавляется, независимо от присутствия аминокислот. С уменьшением концентрации модификатора наблюдается постепенное восстановление активности фермента. Полное восстановление наступает при концентрации 10^{-4} М. Начиная с концентрации 4.2×10^{-3} М заметно некоторое предохраняющее от действия модификатора влияние аргинина. Трудно объяснить действие конкурентных ингибиторов выде-

Таблица 3. Влияние $4,2 \times 10^{-3}$ М ДПК на активность и модификацию гистидиновых остатков дрожжевой аргиназы. Активность в контрольном варианте (без ДПК)—100%

Время, мин	Без аргинина		С аргинином	
	активность, %	число модифицированных остатков	активность, %	число модифицированных остатков
0.5	74.2	7.5	92.5	6.5
10	27.6	8.5	54.0	10.0
20	20.5	11.0	50.4	13.0
30	13.4	13.5	49.0	15.0
40	12.0	14.0	44.3	15.5
50	10.2	16.5	41.2	17.0
60	9.4	17.0	41.5	17.0

ленной нами аргиназы—орнитина и лизина [5], которые не только не предохраняют фермент от отрицательного действия модификатора, но и несколько снижают его активность по сравнению с вариантом с одним ДПК.

Определение количества гистидиновых остатков в молекуле выделенного нами фермента проводилось спектрофотометрическим методом при длине волны 240 нм. Увеличение поглощения вследствие модификации гистидиновых остатков с образованием карбоксигистидина прослеживалось с интервалом по 10 мин; параллельно брались пробы для определения аргиназной активности.

Из данных, представленных в табл. 3, видно, что при концентрации ДПК $4,2 \times 10^{-3}$ М сразу по его добавлении в среду без аргинина модификации подвергаются 7.5 остатков гистидина, что сопровождается падением активности аргиназы на 26%. Хотя и в присутствии аргинина число модифицированных остатков почти такое же (6.5), активность падает всего на 8%. Подобный фон сохраняется на протяжении всего периода опыта (60 мин), и к концу его в присутствии аргинина сохраняется 41% активности, а без него—9%. Предохраняющее от инактивирования модификатором действие аргинина, по всей вероятности, связано с благоприятным воздействием его на конформацию фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М. А., Геворкян М. Л. Биолог. ж. Армении, 33, 9, 1980.
2. Давтян М. А., Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Биолог. ж. Армении, 32, 9, 1979.
3. Туманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мовсесян А. С. Биолог. ж. Армении, 35, 6, 1983.
4. Чубарян С. В., Тер-Карапетыан М. А., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 24, 8, 1971.
5. Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О., Биолог. ж. Армении, 35, 3, 1983.
6. Boyer P. D. J. Am. Chem. Soc., 76, 4331, 1954.

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

Получено 27.IV 1984 г.

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ СВОЙСТВ ДРОЖЖЕВОЙ И ПЕЧЕНОЧНОЙ АРГИНАЗ

М. Л. ГЕВОРКЯН, С. В. ЧУБАРИН, Л. Р. ТУМАНЯН, Р. О. ТОРЧЯН

Изучались некоторые физико-химические и кинетические свойства аргиназ, выделенных из печени крупного рогатого скота и дрожжей *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43. Существенные различия в свойствах позволили предположить, что дрожжевой фермент представляет собой одну из неуротелических форм аргиназы.

Արգինազի և օրգանիզմի ֆունկցիոնալ առանձնահատկությունները և *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43 խմորամսկների արգինազաների որոշ ֆիզիկա-քիմիական և կինետիկ նյութաբանական, շատկությունների մեջ եղած նշանակալի տարբերությունները նախադրություն են տվել ենթադրելու, որ խմորամսկների ֆերմենտը նախադրում է արգինազի որոշ առանձնահատկությունները:

Some physico-chemical and kinetic properties of arginases, isolated from the liver of big-horned cattle and yeasts *Candida guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43 have been studied. Essential differences in properties have allowed to assume that the yeast enzyme is one of the nonureotelic forms of arginase.

Ключевые слова: аргиназа, физико-химические и кинетические свойства

Известно, что аргиназы, выделенные из различных организмов, отличаются по физико-химическим, кинетическим, иммунохимическим и регуляторным свойствам [16, 18, 20]. Наиболее существенные различия наблюдаются между уреотелической—печеночной аргиназой млекопитающих и неуротелической, выделенной из разных организмов и не участвующей в процессах нейтрализации аммиака [12, 22]. Очевидно, эти ферменты имеют неодинаковое происхождение и возникли на разных этапах эволюционного развития организмов [5].

Исследования, проведенные в нашей лаборатории, показали, что у дрожжей рода *Candida* имеются все ферменты орнитинового цикла [1]. Однако пока трудно утверждать, что эти ферменты функционируют в едином механизме биосинтеза мочевины. В равной мере остается открытым вопрос о том, является ли аргиназа дрожжей уреотелическим ферментом. В этой связи представляло интерес провести сравнительное изучение некоторых физико-химических и кинетических свойств аргиназы печени млекопитающих и дрожжевой аргиназы.

Материал и методика. В работе использовали препараты аргиназы печени крупного рогатого скота (Реанал, ВНР), трипсина (Снофа, ЧССР), уреазы (Олапский завод), N-этилмаленимид, (НЭМ) (Серва, ФРГ), L-лизин HCl, L-орнитин HCl, L-пролин, L-треонин, L-лейцин, L-глутамин, ГАМК (Реанал, ВНР). Дрожжевую аргиназу выделяли из культуры дрожжей *C. guilliermondii* var. *membranifaciens* ВКМ-У-43, как описано ранее [6]. Препарат в среде три-ацетатного буфера (рН 8) с 1 mM $MnCl_2$ и 5 mM L-треонина был очищен в 79 раз.

Растворы аргиназы в концентрации $1,5-7,5 \cdot 10^{-4}$ M готовили на 0,05 M глициновом буфере (рН 9,5). Трипсин перед употреблением выдерживали в кислой среде в течение 16 ч при 37° для инактивации примесей химотрипсина [7]. Затем фильтровали, с помощью добавок 1 N NaOH доводили pH до 8-9,5. Концентрацию белка определяли по методу Лоурин [17].

Обработку трипсином проводили при 37° в течение 20—25 мин при весовом соотношении фермент:субстрат—1:1 или 1:3. Аргиназную активность определяли по методу Ратнер с некоторыми изменениями, как описано ранее [2]. Перед определением активности пробы разбавляли в 40—50 раз. При исследовании влияния на протеолиз аминокислот растворы их добавляли к раствору аргиназы, выдерживали в течение 15 мин, затем проводили протеолиз. Конечная концентрация аминокислот в пробках— 10^{-2} — $5 \cdot 10^{-3}$ М. Аргинин добавляли к раствору аргиназы непосредственно перед началом реакции протеолиза.

При исследовании термостабильности растворы ферментов выдерживали на водяной бане при соответствующей температуре в течение 10 мин, затем определяли аргиназную активность при 37°, разбавив пробу 0,05 М глициновым буфером (рН 9,5) в 50 раз.

Величины ингибиторных констант определяли по методу Диксона [8]. В опытах по изучению влияния НАМ растворы аргиназы (рН 7,8) с реагентом инкубировали в течение 40 мин при комнатной температуре (20°C), затем определяли остаточную активность, предварительно разбавив пробу в 6 раз.

Результаты и обсуждение. Протеолитическая чувствительность растворимых ферментов является важным свойством, определяющим время полужизни их в живых клетках. Факторы, которые влияют на это свойство, могут играть в организме существенную роль. Как показано в ряде работ [14, 23], аргиназа очень чувствительна к изменению метаболических условий в организме. Нами была исследована кинетика инактивации аргиназы печени крупного рогатого скота и дрожжевой аргиназы при протеолизе трипсином.

Как видно из рис. 1, аргиназа печени крупного рогатого скота теряет активность под действием трипсина. В течение 20 минут инкубации при 37°C и соотношении фермент:субстрат—1:4 активность снижается на 90%. Это свидетельствует о том, что чувствительные к трипсину сайты расположены вблизи от активного центра и играют важную роль в проявлении активности фермента.

В одной из работ [11] было показано, что протеолитическая чувствительность аргиназы печени быка в присутствии ионов марганца (1—50 мМ) увеличивается. Другие авторы обнаружили, что добавление этих ионов приводит к значительному снижению степени инактивации аргиназы печени крыс при взаимодействии с лизосомальными ферментами [15]. В наших экспериментах, однако, предварительная инкубация аргиназы печени крупного рогатого скота при 37° в течение 20 мин с 2,5 мМ $MnCl_2$ не влияла на степень инактивации фермента трипсином (рис. 1А).

Исследование влияния разных аминокислот на инактивацию аргиназы трипсином (рис. 1), показало, что некоторые из них замедляют этот процесс в указанных условиях. Наиболее эффективно предохраняют аргиназу от потери активности аргинин и орнитин: через 20 мин инкубации с трипсином в присутствии этих аминокислот активность аргиназы снижается только на 40%. Лизин, лейцин и пролин, которые являются ингибиторами аргиназы [13, 19, 21], значительно менее эффективны, а глутамин совсем не влияет на процесс инактивации аргиназы.

Как показано в работе [11], ни используемые аминокислоты, ни ионы марганца не влияют на активность трипсина.

Дрожжевая аргиназа также инактивируется под действием трипсина (рис. 1 Б). При соотношении фермент:субстрат—1:3 и pH 8 активность этого фермента полностью подавляется уже через 5 мин после начала реакции. Аргинин и орнитин в этом случае также оказывают частичное защитное влияние: через 5 мин инкубации дрожжевой аргиназы

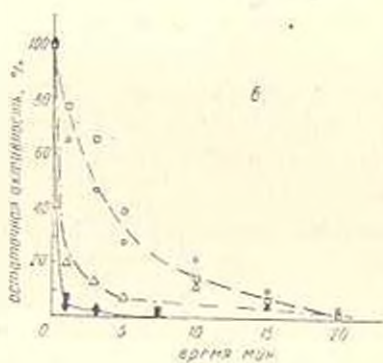
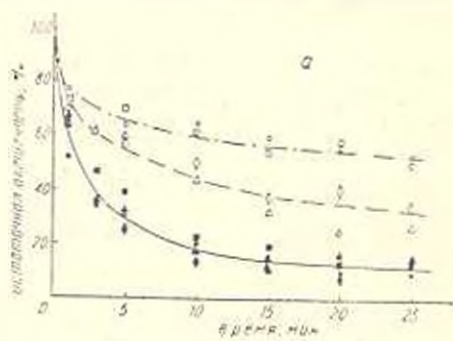


Рис. 1.

Рис. 1. Кинетика инактивации аргиназы печени крупного рогатого скота (а) и дрожжевой аргиназы (б) при взаимодействии с трипсином (●) и влияние на этот процесс аргинина (□), лизина (△), орнитина (○), пролина (■), лейцина (■), глутамина (▲) и ионов марганца (◆).

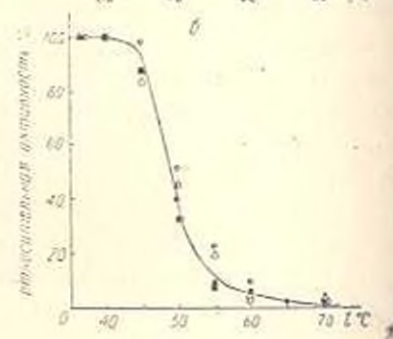
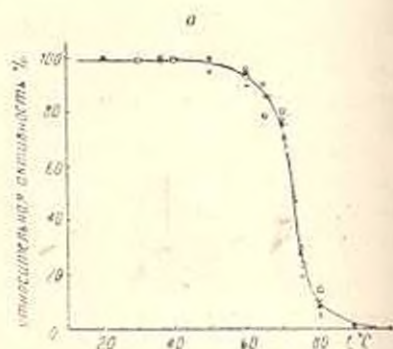


Рис. 2.

Рис. 2. Терминализация печеночной (а) и дрожжевой (б) аргиназы и влияние на нее орнитина (○), лизина (х), треонина (△), пролина (■) и ионов марганца (□). Время инкубации—10 мин.

с трипсином в присутствии этих аминокислот сохраняется около 40% исходной активности. Защитное влияние лизина выражено слабее, а лейцин и пролин не оказывают влияния на процесс инактивации фермента. Таким образом, аргинин и орнитин в одинаковой мере частично предохраняют аргиназу печени крупного рогатого скота и дрожжевую аргиназу от инактивации в присутствии трипсина. Наличие этих аминокислот в клетке в достаточной концентрации, возможно, оказывает влияние на скорость деградации аргиназы под действием протеолитических ферментов.

Изучение термостабильности аргиназы показало, что печеночный фермент сохраняет активность при нагревании до 60–65° (рис. 2А). Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фермента. При 80° в течение 10 мин она снижается на 90%. Кинетика инактивации печеночной аргиназы при 75° показана на рис. 3. Дрожже-

вая аргиназа оказалась более термолабильной. Инкубация ее при 60° в течение 10 мин приводит к почти полной потере активности (рис. 2Б). Кинетика инактивации этого фермента при 55° приведена на рисунке 3.

Те же эксперименты были проведены в присутствии некоторых аминокислот (рис. 2). Из рисунка видно, что присутствие орнитина, лизина, пролина и треонина не отражается на скорости инактивации печеночной и дрожжевой аргиназ в данных условиях. Присутствие ионов марганца в концентрации $0,25 \text{ M}$ в растворе также не влияет на чувствительность печеночной аргиназы к нагреванию.

Реагент на сульфгидрильные группы в белках—НЭМ не влияет на активность аргиназы печени крупного рогатого скота даже при использовании его в высоких концентрациях, что хорошо согласуется с литературными [18], а также нашими данными, полученными при изучении влияния на этот фермент парахлормеркурибензоата [4]. Дрожжевая аргиназа эффективно ингибируется НЭМ (рис. 4). Наличие существен-

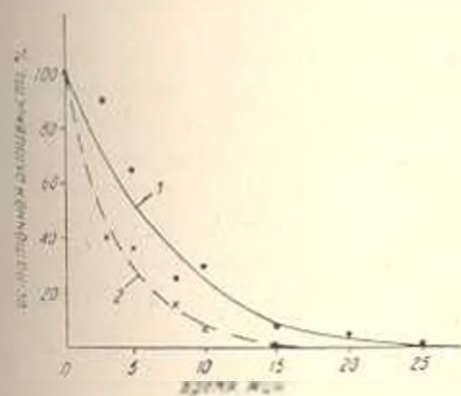


Рис. 3.

Рис. 3. Кинетика термодинамической инактивации печеночной (1) и дрожжевой (2) аргиназ при температурах 55° и 55° соответственно

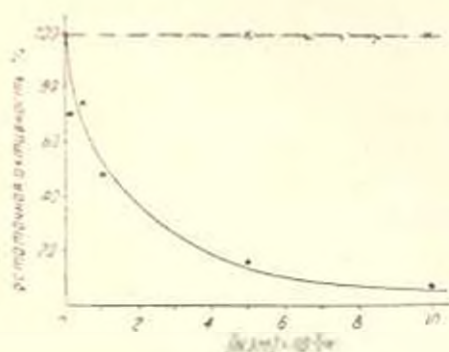


Рис. 4.

Рис. 4. Зависимость остаточной активности дрожжевой аргиназы от концентрации НЭМ. Концентрация аргиназы в пробах— $2,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$

ных для активности сульфгидрильных групп у этого фермента было показано нами ранее с помощью ПХМБ [9]. Данные, полученные при химической модификации дрожжевой аргиназы НЭМ, подтверждают эти результаты. Таким образом, эти ферменты отличаются друг от друга и по чувствительности к сульфгидрильным реагентам.

Определение величин констант ингибирования аргиназы некоторыми аминокислотами показало, что и в этих свойствах имеются различия (табл.). Так, хотя орнитин и лизин для обоих ферментов являются конкурентными ингибиторами, однако значения ингибиторных констант у них различны. Кроме того, пролин не ингибирует дрожжевую аргиназу, но является конкурентным ингибитором для печеночного фермента ($K_i = 2,4 \text{ mM}$). ГАМК не влияет на активность обоих ферментов.

Величина K_m для аргиназы печени крупного рогатого скота при pH 9,5 равна $2,5 \text{ mM}$ [4], а для дрожжевой аргиназы— $5,6 \text{ mM}$ [10]. Отличаются они и по молекулярной массе: у дрожжевого фермента—

Таблица. Величины констант ингибирования аргиназы аминокислотами (рН 9,5)

Фермент	K_i (мМ)			
	L-орнитин	L-лизин	L-пролин	ГАМК
Дрожжевая аргиназа	1.3	1.4	—	—
Аргиназа печени крупного рогатого скота	18	6	24	—

151000 Да [10], а у аргиназы печени крупного рогатого скота—120000 Да [3].

Таким образом, в свойствах исследуемых нами ферментов имеются существенные различия. Дрожжевая аргиназа, в отличие от печеночной, чувствительна к сульфгидрильным реагентам, имеет большую молекулярную массу и значительно менее термостабильна. Имеются различия и в кинетических свойствах: сравнительно низкое сродство к субстрату у аргиназы из дрожжей, существенная разница в величинах констант ингибирования аминокислотами (табл.). Отличаются они и чувствительностью к протеолизу трипсином. Полученные данные указывают на то, что у этих ферментов имеются существенные различия в структуре, что отражается на их физико-химических и кинетических свойствах. Это позволяет предположить, что дрожжевая аргиназа представляет собой одну из неурегулируемых форм аргиназы. Дальнейшие исследования, возможно, выявят и другие различия в структуре и свойствах этих ферментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Габриелян Г. А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1980.
2. Геворкян М. Л., Закарян А. Е., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 27, 9, 44—49, 1974.
3. Геворкян М. Л., Закарян А. Е. В сб.: Вопросы биологии, 2, 90—100, 1981.
4. Геворкян М. Л. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1985.
5. Давтян М. А., Буянтян Г. Х. Биохимия, 35, 412—417, 1970.
6. Давтян М. А., Чубарян С. В., Туманян Л. Р. Биолог. ж. Армении, 32, 9, 906—911, 1979.
7. Девени Г., Гергей Я. Аминокислоты, пептиды, белки. М., 1976.
8. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. М., 1982.
9. Туманян Л. Р., Чубарян С. В., Торчян Р. О., Мовсисян А. С. Биолог. ж. Армении, 36, 6, 485—489, 1983.
10. Чубарян С. В., Туманян Л. Р., Торчян Р. О. Биолог. ж. Армении, 36, 3, 233—238, 1983.
11. Bond J. S. Biochem. Biophys. Acta, 327, 1, 157—165, 1973.
12. Gratz E., Magri E. Biochem. J., 126, 3, 667—674, 1972.
13. Greenberg D. M., Mohamed M. S. Arch. Biochem., 4, 1, 365—375, 1945.
14. Greenberg D., Sahib M. K., Kline W. E. Arch. Biochim. Biophys., 2, 137, 477—482, 1970.
15. Halder M., Segal H. L. Arch. Biochim. Biophys., 148, 1, 228—237, 1972.
16. Hirsch-Kolb H., Heine J. P., Kolb H. J., Greenberg D. M. Comp. Biochem. Physiol., 37, 3, 345—359, 1970.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 1, 265—275, 1951.

18. Muszynska G., Severina L. O., Lobyeva L. W. Acta biochim. polon., 19, 2, 109—116, 1972.
19. Palk W. K., Nochumson S., Sangduk K. Biochem. Med., 19, 1, 39—46, 1978.
20. Porembska Z. Post. Biochem., 17, 3, 451—452, 1971.
21. Rau R. V. R., Reddi R. R., Swami K. S. Int. J. Biochem., 4, 19, 62—70, 1973.
22. Reddi S. R. R., Campbell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 28, 515—534, 1969.
23. Schimke R. T. J. Biol. Chem., 237, 6, 1921—1927, 1962.

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

Поступило 5.X 1985 г.

УДК 582.287.238:581.19

АНТИФУНГИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ШЛЯПОЧНОГО ГРИБА *NEMATOLOMA FASCICULARE* (HUDS.: FR.) KARST.

С. М. БАДАЛЯН

Изучение антифунгальной активности штаммов *Nematoloma fasciculare* по отношению к 21 виду микромицетов выявило 2 типа взаимоотношений. Существует корреляция между географической распространенностью вида, породой субстрата, скоростью роста мицелия и формой проявления антагонизма.

Nematoloma fasciculare-ի շտամերի անտիֆունգալ ակտիվության ուսումնասիրությունը 21 տեսակի միկրոմիցետների նկատմամբ բացահայտեց փոխադարձաբնույթների 2 տիպ: Գոյություն ունի կորելյացիա՝ տեսակի աշխարհագրական տարածվածության, սուբստրատի տեսակի, միջնայի աճման արագության և անտագոնիզմի դրսևորման ձևի միջև:

The study of antifungal activity of *Nematoloma fasciculare* strains in connection with 21 species of micromycetes has revealed 2 types of interrelation. There exists a correlation between the geographical spreading of the species, the kind of substratum, the growth rate of micelle and the form of display of antagonism.

Ключевые слова: шляпочный гриб, микромицеты, антифунгальная активность.

В настоящее время в связи с поисками новых фармакологических препаратов интерес к базидиальным грибам как продуцентам биологически активных соединений заметно повысился [5—8].

Объект наших исследований — *Nematoloma fasciculare* — в этом аспекте изучен недостаточно, хотя единичные литературные данные свидетельствуют о высокой физиологической активности этого гриба.

В настоящей работе приводятся результаты изучения антифунгальных свойств *N. fasciculare*.

Материал и методика. Изучение антифунгальной активности штаммов, выделенных в культуру тканевым методом, приводили в совместной культуре с 5-ю видами микромицетов: *Aspergillus versicolor* (Vahl.) Tex., *A. niger* v. *Tiegh.*, *Penicillium verrucosum* (Dier.), *Alternaria chartarum* (Fr.), *Trichoderma viride* Pers.

Стерильные чашки Петри с агаризованным суслом одновременно инокулировали мицелием *N. fasciculare* и микромицета в 20 возможных вариантах (табл.), после чего помещали их в термостат при 20°. Наблюдения проводили в течение 50 суток начиная с первых дней совместного роста культур. Для оценки антифунгальной (антагониз-

стической) активности *N. fasciculare* был рассчитан индекс антагонизма по формуле $ИА = С (п-3) + Д (п-4)$, где С и Д—типы реакций между *N. fasciculare* и микромицетами, п—частота встречаемости данной реакции, 3 и 4—оценка данного типа (в баллах) в соответствии со шкалой Джонсона и Карла в модификации Симонини и Маммиконы [2].

Результаты и обсуждение. Исследование антифунгиальной активности *N. fasciculare* по отношению *A. versicola*, *A. niger*, *P. verrucosum*, *Al. chartarum*, *T. viride* выявило 2 типа реакций: образование стерильной зоны после взаимоподавления (рис., 1); дистанционная остановка роста микромицета и дальнейшее нарастание *N. fasciculare* на него (рис., 2). В зависимости от характера роста контактирующих видов имели место особые случаи их поведения. Например, образование стерильной зоны между *N. fasciculare* и *A. niger* иногда происходило после явно выраженного взаимоподавления. Однако на 20–30 сутки наблюдалось нарастание *N. fasciculare* (шт. Г-г) на *A. niger* с помощью редких мощных тяжей. При этом стерильная зона сохранялась. Нарастание штаммов Б-0395 и Е-2-г после образования зоны на колонии *P. verrucosum*, *Al. chartarum* и частично *A. versicola* наблюдалось и без формирования тяжей. Такие типы взаимоотношений, видимо, можно считать промежуточными между выявленными основными типами.

Таблица. Типы взаимоотношений штаммов *N. fasciculare* с некоторыми микромицетами

Штамм	Место сбора плодовых тел	Субстрат	Радикальный		Тип взаимоотношений				
			скорость роста штаммов, мм/ч	индекс антагонизма	<i>A. versicola</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. verrucosum</i>	<i>Al. chartarum</i>	<i>T. viride</i>
				ИА	14	14	14	14	14
				ИА					
Б-0395	Ленинградская область		0,09	15	I	I	I	I	I
Е-2-г	Московская область	ель	0,04	15	I	I	I	I	I
0/19-г	АрмССР	бук	0,14	20	II	II	II	II	II
Г-г	АрмССР	бук	0,12	20	II	II	II	II	II

Примечание: I—тип реакции с образованием стерильной зоны, II—реакция нарастания (обратная).

Следует особо отметить, что при I типе взаимоотношений, когда после взаимоподавления обоих организмов образуется стерильная зона, активным оказался *N. fasciculare* (ИА=15), который, угнетая микромицет (ИА=14), может нарастать на него.

Второй тип взаимоотношений—нарастание *N. fasciculare* на все изученные виды микромицетов с образованием мощных тяжей—характерен для быстрорастущих штаммов из Армении (0/19-г и Г-г). В первые



Рис. 1. Первый тип взаимоотношений между *N. fasciculare* (штамм Б-0395) и *P. verrucosum*; 2. второй тип взаимоотношений между *N. fasciculare* (шт. Г-г) и *A. versicola*; 3. нарастание *N. fasciculare* (шт. О/19-г) на *T. viride*; 4. нарастание *N. fasciculare* (шт. Г-г) на *Fusarium* sp.

сутки происходит резкая дистанционная остановка роста микромицета. В дальнейшем колонии приближаются только за счет быстрого роста *N. fasciculare*, и происходит полное образование колонии микромицета с помощью мощных тяжей (рис., 2).

При совместном росте штаммов 0/19-г. Г-г с *P. verrucosum* наблюдалась дистанционная остановка роста микромицета, затем временное позавление *N. fasciculare* и дальнейшее небольшое нарастание микромицета. В итоге *N. fasciculare* образовывал мощные тяжи и происходило полное обрастание колонии *P. verrucosum*.

Следует заметить, что при взаимоотношениях II типа антагонистическая активность *N. fasciculare* выше (ИА—20), чем при I типе.

Отдельно следует остановиться на взаимоотношениях *N. fasciculare* с *T. viride*. В основе механизма действия видов *Trichoderma Pers.* лежит свойство выделения антибиотических веществ (виридин, дерматин, триходермин и т. д.). Некоторые виды рода *Trichoderma* в связи с их биоактивностью используются в биологических методах борьбы против фитопатогенных микромицетов, сосновой и слововой губок и т. д. [1, 3, 4].

При одновременной инокуляции штаммов *N. fasciculare* и *T. viride* наблюдалась блокада инокулята *N. fasciculare* из-за большой скорости роста *T. viride*. При этом были обнаружены следующие закономерности поведения обоих организмов. Инокуляты медленнорастущих штаммов *N. fasciculare* с начинающимся вегетативным ростом с *T. viride* также образовывали стабильную зону (тип I), которая сохранялась до конца наблюдений. Быстрорастущие штаммы (0/19-г и Г-г) вели себя иначе. После блокады инокулятов *N. fasciculare* рост грибов продолжался с периодическим взаимонарастанием друг на друга. К концу наблюдений штамм 0/19-г образовывал тяжи и нарастал на *T. viride* (рис., 3), тогда как штамм Г-г полностью подавлялся микромицетом. Таким образом, штамм 0/19-г оказался более активным по отношению к *T. viride*, чем штамм Г-г, выделенный из сухих плодовых тел *N. fasciculare*.

Учитывая то обстоятельство, что штаммы *N. fasciculare* значительно отставали в росте от *T. viride*, в результате чего происходила блокада инокулятов *N. fasciculare*, был поставлен повторный опыт: инокуляция микромицета проводилась после того, как диаметр колонии *N. fasciculare* достигал определенных размеров (не менее 20 мм). Результаты опытов с многочисленными штаммами (более 50) *N. fasciculare* и *T. viride* привели к заключению, подтверждающему наши предположения: медленнорастущие штаммы с *T. viride* образуют реакцию I типа, а быстрорастущие—II типа (рис., 3).

Дальнейшее исследование антифунгивальной активности *N. fasciculare* в совместной культуре с другими микромицетами [*Aspergillus flavus* Link, *A. fumigatus* Fres., *A. micro-virido-citrinus* Cost., а также *Penicillium raciborskii* Zales., *P. chrysogenum* T., *P. itidum* Westl., *Alternaria tenuis* Nees., *Ulocladium alternatide* (Couke) Simm., *Chrysosporium* sp., *Cladosporium herbarum* (Pers.) Link., *C. sphaerospermium* Penz., *Aureobasidium pullulans* (de Bary) Arn.,

Fusarium sp.] также выявило два вышеописанных типа взаимоотношений. Из перечисленных микромицетов необходимо отметить *Fusarium sp.*, в случае с которым особое значение для проявления антифунгициальной активности *N. fasciculare* имел диаметр колонии. Видимо, это можно объяснить тем, что количество биоактивных метаболитов, вырабатываемых мицелием *N. fasciculare* в начальные сроки роста, не было достаточным для проявления необходимой активности. Немаловажную роль играют и биологические свойства изученных микромицетов, некоторые из которых (*Penicillium chrysogenum*) известны как активные продуценты антибиотиков, биоактивных пептидов и т. д.

Подытоживая полученные результаты и доступные нам литературные данные о биологически активных соединениях *N. fasciculare*, можно прийти к заключению о перспективности использования этого вида в фармакологических целях.

Работа была выполнена на кафедре низших растений Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Автор выражает глубокую благодарность д. б. н. Л. В. Гарибовой, доцентам Т. П. Сизовой и Л. М. Лёвахиной за ценные советы и консультации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морцилина Т. М. Автореф. канд. дисс. 21, Минск, 1983.
2. Симонян С. А., Мамиконян Т. О. Микол. и фитопатол., 16, 3, 219—221, 1982.
3. Сычев П. А., Шапошник Ю. А. Микол. и фитопатол., 16, 2, 154—159, 1982.
4. Тарунина Т. А., Маслова Т. Ю. Микол. и фитопатол., 16, 5, 536—538, 1982.
5. Chung L. O., Chil C. E., Kak B. K. Arch. Pharmacol. Res., 4, 2, 117—122, 1981.
6. Ito J., Kiritu H. et al. Chem. Pharm. Bull., 15, 12, 2009—2010, 1968.
7. Seeger R. Z. Naturforsch., 34, 330—333, 1979.
8. Silva P. Bol. Soc. Bot. Mex., 24, 1—13, 1959.

Ереванский государственный университет, кафедра
экологии и охраны природы

Поступило 3.IV 1984 г.

УДК 599.735.5.591.2

АНАЭРОБНЫЕ ИНФЕКЦИИ У ДИКИХ КОПЫТНЫХ, СОДЕРЖАЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ НЕВОЛИ, И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАРЕНХИМАТОЗНЫХ ОРГАНОВ

А. А. ОВСЕПЯН

Описываются клиника и патоморфологические изменения в паренхиматозных органах при заболеваниях, вызванных анаэробными микроорганизмами. Делается заключение о том, что и эти заболевания приводит перекрмливание животных кормами, богатыми белком (конcentратами), а также сочной травой.

Նկարագրվում են պարենխիմալ օրգանների կենսական և պաթոմորֆոլոգիական փոփոխությունները շահերոգ միկրոօրգանիզմների կողմից առաջացված անօրոգյությունների դեպքում: Պարզվում է, որ կենդանիների կենսագոյանը լիարժեք և սոճի ձրակեր սնտրոպիզմի հետևանքով (խտաշրտ կեր), ինչպես նաև քաղց զրկանքի:

The clinics and pathomorphological alterations in the parenchymatous organs in some of diseases, caused by anaerobic microorganisms were described. It was established that such diseases can be caused by the overfeeding of animals with protein-rich fodder and fresh grass.

Ключевые слова: муфлон, безоаровый козел, анаэробная инфекция.

Известно, что анаэробные микроорганизмы, будучи широко распространены в почве, а также в желудочно-кишечном тракте животных, в некоторых случаях совершенно безвредны, в других, интенсивно размножаясь, вызывают интоксикацию со смертельным исходом [5].

Эпизоотические вспышки энтеротоксемии и браздота вызываются группой патогенных клостридий: *Cl. perfringens*, *Cl. oedematiens*, *Cl. septicum*. Установлено, что к заболеванию анаэробными инфекциями приводит перекармливание животных, особенно кормами, богатыми белком, а также свежей травой. Определенное значение в клиническом проявлении заболеваний, вызванных анаэробными микроорганизмами, имеют факторы, снижающие резистентность организма (стресс, гиподинамия, перегревание и переохлаждение организма и др.). В дождливое время года энтеротоксемия встречается чаще, сезонность браздота строго не выражена [1, 6].

Сведений относительно заболеваний, вызванных анаэробными микроорганизмами (энтеротоксемия, браздот), среди диких копытных в доступной нам литературе очень мало [5, 6]; что касается муфлонов и безоаровых коз, то такого рода сведения вообще отсутствуют. В этой связи изучение и описание этих заболеваний среди армянских муфлонов и безоаровых коз представляет несомненный интерес.

В течение 1981–1982 гг. в Центре прикладной зоологии АН Арм. ССР было зарегистрировано 5 случаев падежа от анаэробной инфекции среди диких копытных. Большую часть павших животных (4 гол) составляли безоаровые козы, что противоречит мнению, согласно которому исключительно восприимчивы к этим заболеваниям овцы [3, 8].

Муфлон пал в апреле 1982 г. от перекармливания концентрированным кормом. Через несколько часов после кормления появились первые признаки болезни: беспокойство животного, тимпания и болезненность рубца, скрежетание зубами. Позже наблюдалась вялость, перешедшая в депрессию. Вечером животное пало. При вскрытии трупа был выделен возбудитель браздота.

Безоаровые козы погибли в осенне-зимний период, что также связано с перекармливанием концентрированным кормом и зеленой массой. Почти все павшие животные были хорошо упитаны, а средний возраст не превышал года.

В декабре 1981 года неожиданно ухудшилось состояние одной безоаровой козы. У нее появилась одышка, сильное беспокойство, особенно при пальпации в области живота, расширение зрачков. Рубец сильно вздулся. Вечером животное пало. Микробиологическим анализом внутренних органов, проведенным Московской ветеринарной клиникой, была выделена культура, относящаяся к группе *Bac. perfringens* типа C. При вскрытии трупа были обнаружены следующие патологоанатомические изменения: труп был сильно вздут, подкожная клетчатка

ка усеяна точечными кровоизлияниями, точечные кровоизлияния имелись также во всех внутренних органах; легкие были отечны, гиперемированы; в сердечной сорочке содержалась мутная жидкость; желчный пузырь был сильно увеличен; тонкий и толстый отделы кишечника сильно гиперемированы; рубец был сильно вздут и заполнен кормовыми массами; кровь не сворачивалась; все сосуды были кровенаполнены. Такая же картина наблюдалась у остальных павших животных.

Для более глубокого изучения процессов, происходящих при анаэробных инфекциях, внутренние органы павших животных были подвергнуты патоморфологическому анализу.

Материал фиксировался в 10%-ном растворе нейтрального формалина. Срезы толщиной 5—6 мк окрашивались гематоксилин-эозином по Гейденрайну [4].

При гистологическом исследовании легких было отмечено полнокровие сосудов, отечность. Альвеолы были наполнены серозным экссудатом (рис. 1, а). В селезенке было очень мало фолликулов, они были лишены светлых центров, ответственных за иммунный статус организма. Ядра многих лимфоцитов пикнотичны. Орган кровенаполнен, что подтверждает наличие анаэробной инфекции (рис. 1, б). В почках отмечался дистрофический процесс. Кроме клеток, формирующих клубочки, содержался экссудат белковой природы. Отсутствие клеточных элементов указывало на наличие дегенеративно-дистрофического процесса. Ядра эпителия канальцев полиморфны, пикнотичны. Часть канальцев лишена ядер. Дистрофия некробиотического характера, с изменением клеток и ядер. Большая часть клубочков имела форму лопастей, свидетельствующих о наличии хронического гломерулонефрита. Клубочки различной величины, что также характерно для гломерулонефрита. Сосуды кровенаполнены (рис. 2а). Печень также кровенаполнена, по ходу сосудов имелась пролиферация лимфоидных клеток. Процесс здесь не острый, анаэробная инфекция, видимо, имела основу, так как известно, что лимфоидные пролифераты не могут образоваться в течение нескольких часов (рис., 2б).

Примерно такого же характера изменения отмечались у остальных животных.

Ввиду очень острого течения болезней, вызванных анаэробными микроорганизмами, лечение практически невозможно. Поэтому наши усилия были направлены на сохранение поголовья животных путем улучшения условий содержания и кормления, а также тщательной дезинфекцией зимников и вольеров. Была ограничена дача животным концентрированного корма; он задался в утреннее время для ускорения процесса переваривания, в период наибольшей активности животных. Безодровые козы были переведены в загон без растительного покрова и кормились исключительно подсушенной травой и сеном. Хороший эффект был получен вакцинацией животных поливалентным аватоксеном против клостридозов овец, выпущенным Краснодарской биофабрикой. Таким образом, установлена некоторая связь между клиническими проявлениями болезни и морфологическими изменениями органов и тканей при анаэробных инфекциях.

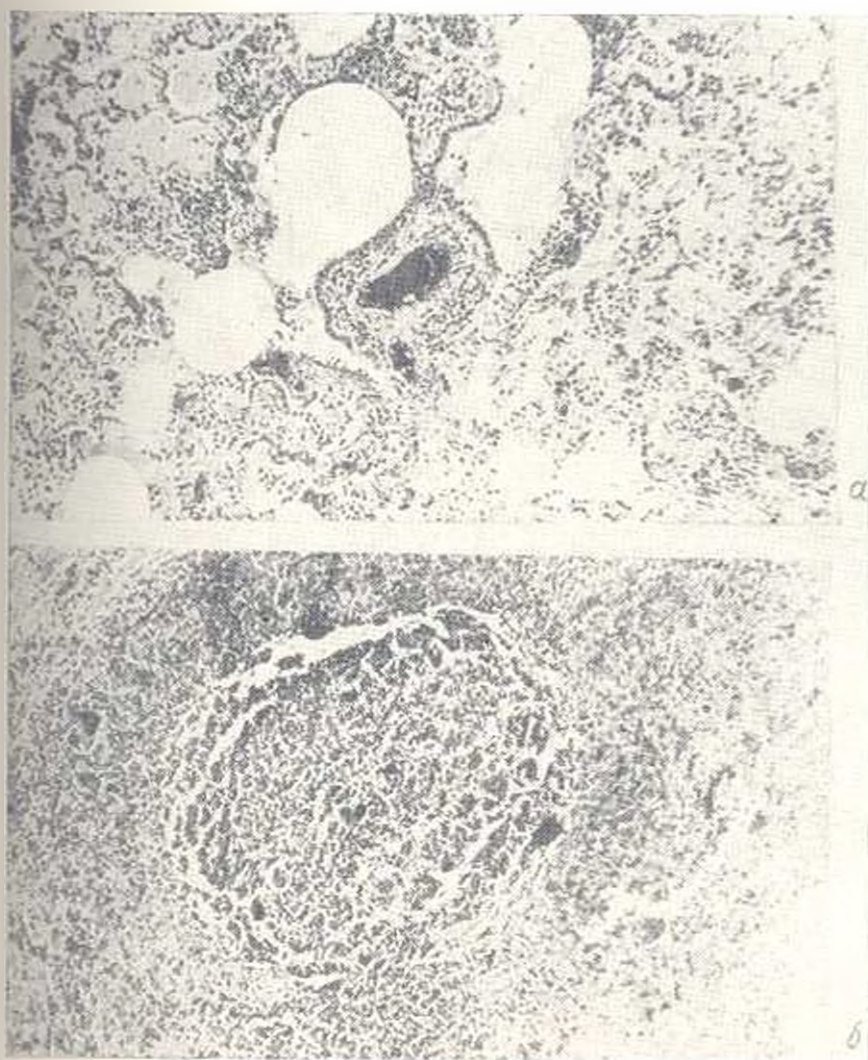


Рис. 1. а. Полнокровие, отечность легких; б. кровенаполнение селезенки, отсутствие светлых центров фолликул.

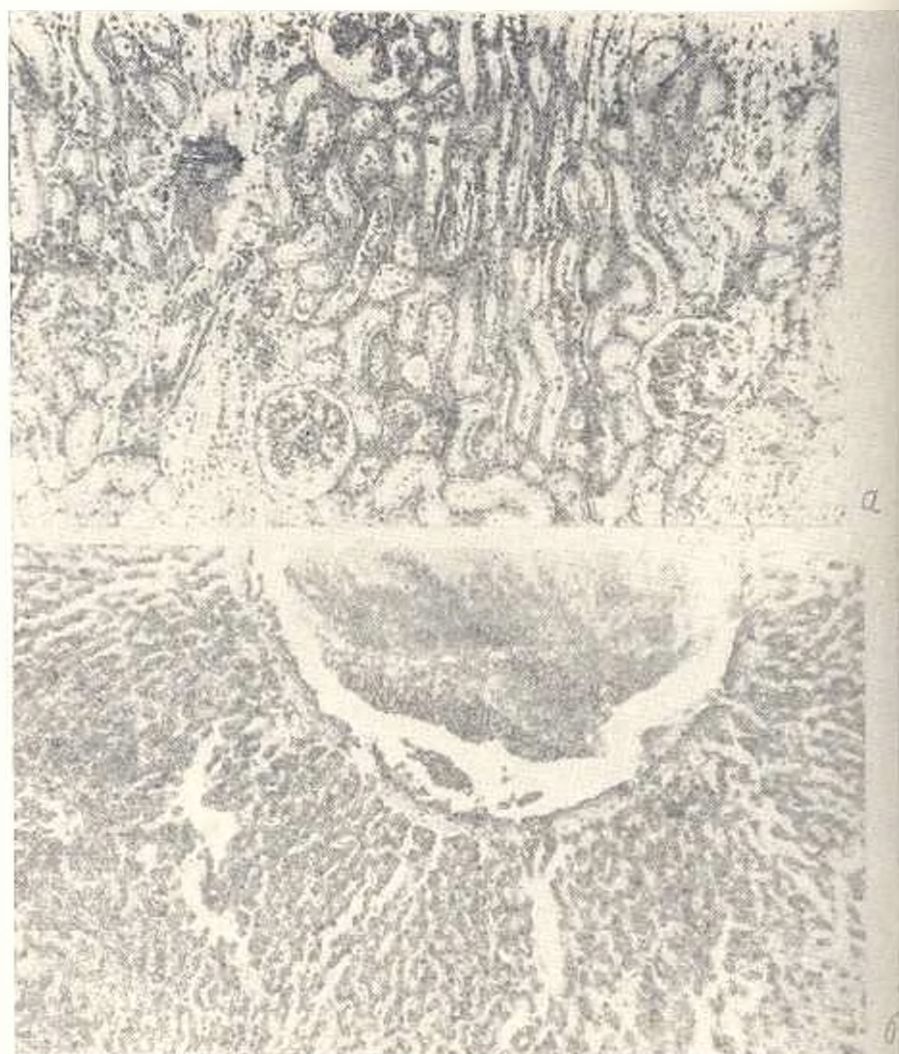


Рис. 2 а. Кровенаполнение почек, дистрофия канальцев, большая часть клубочков в форме лопастей; б. кровенаполнение печени, пролиферация лимфоидных клеток.

При одинаковых условиях содержания безоаровых коз и муфлонгов большая предрасположенность к анаэробным инфекциям отмечена у первых, что, по-видимому, связано со спецификой физиологии данного вида диких копытных в условиях неволи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лавов В. М. Анаэробные инфекции и борьба с ними. М., 1971.
2. Поляковский М. Д. Болезни овец и коз. 3-е изд. М., 1973.
3. Протасов А. И. Болезни жвачных. Справочник по ветеринарии. М., 1968.
4. Ромейс В. Микроскопическая техника. М., 1955.
5. Семенчук К. Л., Байкин В. Ф. Анаэробные инфекции у пятнистых оленей зоопарка «Аскания-Нова». Научн. тр. Укр. Ин-та животноводства степных районов. 13. 1968.
6. Урзев К. Р. Клостридозы овец. М., 1977.
7. Урзев К. Р. Болезни овец, 3-е изд., М., 1973.
8. Russell W. C. J. Amer. Vet. Med. Ass., 157, 5, 1970.

Институт зоологии АН Армянской ССР

Поступило 15 III 1985 г.

УДК 577.352

ФОСФАТНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ И СТЕХИОМЕТРИЯ H^+ -НАСОСА И K^+ -НАСОСА У БАКТЕРИИ *SERRATIA MARCESCENS*

А. Ж. ХАЧАТРЯН, М. В. БОГДАНОВ, С. С. ДУРГАРЬЯН

Измерены внутриклеточные стационарные концентрации АТФ, АДФ и фосфата у *S. marcescens* и рассчитан фосфатный потенциал $\Delta\psi$ в период элиминации, равный 45 кДЖ у анаэробных и 47 кДЖ у аэробных клеток*. Функционирующий в присутствии глюкозы осмочувствительный K^+ -насос создает распределение ионов калия, соответствующее равновесному калиевому потенциалу 200 мВ. Проведено сравнение мембранного заряда клеток в различных физиологических состояниях. Подсчитаны стехиометрии калиевого и водородного насосов, равные соответственно 2,2 и 3,0. Показано, что в присутствии ионов калия увеличивается скорость дыхания клеток *S. marcescens*, по-видимому, в ответ на функционирование K^+ -насоса, создающего электрический шунт на мембране дышащих клеток.

S. marcescens-ի մոտ չափված են ԱՅՖ-ի և ֆոսֆատի պոստդիֆոսֆոր կոնցենտրացիաները և հաշված է քիմիոդիֆերենցիալը $\Delta\psi$ ը ֆոսֆատային պոտենցիալը, որը համասար է 45 և 47 անաերոբ և 17 կՋ* աերոբ բջիջներում: Փյոսիլոդայի ներկայությամբ դորմոլ օսմոզոզային K^+ -պոմպը ստեղծում է կայունի իոնների բաշխում, որը համապատասխանում է 200 մՎ համասարակչիկ կայունային պոտենցիալին: Կատարված է բջիջների աղնիկայային լիցքի համեմատություն տարրեր ֆիզիոլոգիական պայմաններում: Հաշված են կայունային և գրաժույին պոմպերի հաբարերակցությունները, որոնք համապատասխանաբար համասար են 2,2 և 3,0:

Ցույց է տրված, որ կայունի իոնների ներկայությամբ աճում է *S. marcescens* բջիջների շնաթույլան արագությունը, բայց երևույթին, ի պատասխան K^+ -պոմպի դորմոնոլիյանը, որը առկում է էկկարական շունտ* շնաղ բջիջների մեմբրանի վրա:

* Здесь и далее «анаэробные и аэробные клетки» означают клетки, выращенные в анаэробных и аэробных условиях соответственно [3].

Stationary intracellular concentrations of ATP, ADP and phosphate in *S. marcescens* were measured and phosphate potential ΔG_p was calculated during the glycolysis, equal to 45 kJ and 47 kJ in anaerobic and aerobic cells, respectively. The osmosensitive K^+ -pump operating in the presence of glucose generates potassium ion distribution corresponding to the equilibrium K^+ potential of 200 mV. The adenylate energy charge of the cells was compared according to their physiological condition. The stoichiometries of potassium and hydrogen pumps were calculated to be 2.2 and 3.0, respectively. The respiration rates of *S. marcescens* increased in the presence of potassium ions, perhaps in response to K^+ pumping which creates an electrical shunt on the membranes of the respirating cells.

Ключевые слова: бактерии *S. marcescens*, фосфатный потенциал, аденилатный заряд, стехиометрия, H^+ /ATФ и K^+ /ATФ.

Наиболее важными факторами, регулирующими гликолиз и дыхание, а также ряд других процессов, связанных с запасанием и расходом энергии в клетке, являются относительные внутриклеточные концентрации нуклеотидов. Согласно Аткинсону, энергетическое состояние клетки может быть охарактеризовано степенью «заполнения» системы АТФ—АДФ—АМФ высокоэнергетическими фосфатными связями. Чем больше в клетке АТФ, тем больше заполнена она энергией и, наоборот, чем ниже ее энергетический заряд, тем меньше в ней высокоэнергетических связей. Энергетический заряд клетки можно оценить по уравнению Аткинсона:

$$\text{энергетический заряд} = \frac{1}{2} \frac{[\text{АДФ}] + 2[\text{АТФ}]}{[\text{АМФ}] + [\text{АДФ}] + [\text{АТФ}]}, \quad (1)$$

где АМФ, АДФ и АТФ внутриклеточные концентрации нуклеотидов. Энергетический заряд равен 1 в максимально энергизированном состоянии и 0, когда система энергетически пуста [1]. Эрчинская показала [10], что регуляция дыхания и генерация НАД·Н₂ обусловлены не энергетическим зарядом Аткинсона (1), а соотношением

$$\text{аденилатный заряд} = \frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}]}, \quad (2)$$

определяющим степень фосфорилирования клетки. Это соотношение используется для расчета фосфатного потенциала клетки ΔG_p [25]:

$$\Delta G_p = \Delta G_p^\circ - RT \ln \frac{[\text{АТФ}]}{[\text{АДФ}] \cdot [\text{Ф}]}, \quad (3)$$

где R—газовая постоянная, T—абсолютная температура, ΔG_p° —стандартная энергия Гиббса реакции:



Фосфатный потенциал определяется как изменением стандартной энергии Гиббса, зависящей только от температуры, так и внутриклеточными концентрациями АТФ, АДФ и Ф [25]. Ни один из этих параметров в отдельности не несет полной информации об энергетическом состоянии клетки. Для характеристики электрохимических процессов, развивающихся на мембране, очень важное значение имеет величина

фосфатного потенциала ΔG_p , характеризующая свободную энергию АТФ-синтетазной реакции [2]. Чем меньше величина ΔG_p , тем ближе реакция к равновесию. Таким образом, величина ΔG_p является функцией отклонения системы от равновесия. Однако, когда фосфатный потенциал достаточно высок и, следовательно, система находится в состоянии, далеко от термодинамического равновесия, внутриклеточное содержание АТФ может оказаться довольно низким. Аденилатный заряд (2) в некотором смысле более информативен, хотя пул нуклеотидов является только одной из форм накопления энергии клеткой, поскольку метаболическая энергия может накапливаться также и в виде редокс-потенциала, трансмембранного электрохимического потенциала и т. д.

В настоящей статье приведены энергетические характеристики $K^+ - H^+$ обмена у бактерий *Serratia marcescens*, для которого нами изучены кинетические и электрохимические характеристики [3, 4].

Материал и методика. Бактерии *S. marcescens*, дикий тип, выращивали и подготавливали к опыту как описано [3, 4, 9]. Внутриклеточные концентрации K^+ определяли по количеству ионов калия, вышедшему из бактерий после толуольной обработки [11]. У предварительно обработанных ЭДТА клеток измеряли разность электрических потенциалов по описанному методу [12, 16]. В каждой указанной точке отбирали пробы на содержание АТФ, АДФ, белка и фосфата.

Для определения содержания фосфата 10–20 мл пробы дважды отмывали дистиллированной водой с чернильным (1%), ресуспендировали в 6%-ном растворе $HClO_4$ и инкубировали в течение 30 мин на водяной бане при 3–4°C. После удаления осадка супернатант нейтрализовали раствором 2М КОН+0,1М MOPS и в нем определяли количество ортофосфата по методу Беренблума и Чейна [6] в модификации Вебб-Малербе [26]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре СФ-4А при длине волны 670 нм. Чувствительность метода 0–30 мкг фосфора.

Приготовление люциферин-люциферазного экстракта светлячков описано в работе [27]. Экстракт использовали в течение 8 ч после приготовления.

Экстракцию АТФ и его количественное определение проводили по методу Баккера и Малербе [5] в нашей модификации. Тушение люминесценции, пропорциональное количеству АТФ, регистрировали на люцинометре LKB-1250 в смеси 50 мкл экстракта АТФ и 1 мл люциферин-люциферазного экстракта.

Количественное определение АДФ проводили путем конвертирования в АТФ по разности конечного его количества и измеренного до конверсии как описано выше.

Скорость поглощения кислорода определяли полярографическим методом из установке, собранной и любезно предоставленной нам для работы Ильченко А. П. (ИБФМ АН СССР, г. Пушкино). Показания полярографа LP-7 регистрировали самозписью EZ-7. Скорость дыхания рассчитывали по предварительно снятой калибровочной кривой в мл/мин.

Для определения количества белка к 3 мл бактериальной суспензии приливали 3 мл 20%-ной ТХУ, выдерживали 10 мин в кипящей водяной бане и осаждали в течение 10 мин при 5000 об/мин. К растертому осадку прибавляли 100 мкл концентрированного и 3 мл разбавленного в отношении 1:10 аммиака. Далее количество белка определяли по Лоури [17].

В работе использованы следующие реактивы: ФЭП—фосфоэтилпирuvat, тринариевая соль кристаллическая (Сигма); ПК—пируваткиназа (Сигма); MOPS—3-(N-морфолли)пропансульфокислота (Сигма); Трис-HCl (Серва); АТФ—аденозин-5-трифосфат, динатриевая соль (Сигма); KCl перекристаллизованный (Сигма); арабиноза (Реанал); трицин (Сигма); ЭДТА—этилендиамин-N,N,N',N'-тетрауксусной кислоты динатриевая соль (Серва); ДТТ—дитиотритол (Серва); альбумин (Кох-Лайт); остальные реактивы—осн.

Результаты и обсуждение. В предыдущей работе [3] было показано, что бактерии *S. marcescens* в присутствии экзогенного источника

энергии способны осуществлять электрогенный транспорт K^+ внутрь клеток, выращенных как на минимальной солевой среде с сукцинатом натрия и принудительной аэрацией, так и на пептонной среде с глюкозой без принудительной аэрации. В настоящей работе измерены скорость дыхания, концентрация нуклеотидов АТФ, АДФ и неорганического фосфата у аэробных и анаэробных клеток в условиях ранее описанного эксперимента. В обоих случаях в присутствии глюкозы введение в среду ионов калия резко усиливает дыхание (рис. 1). Этот эффект

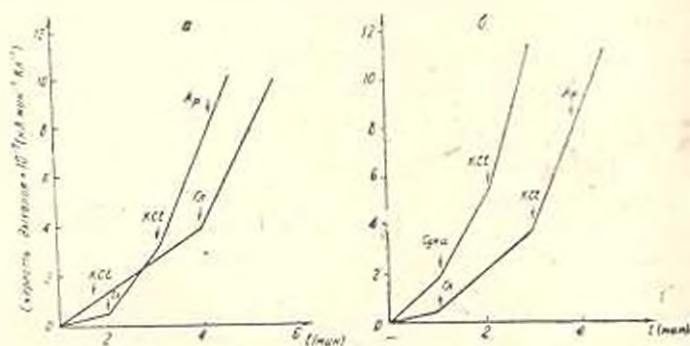


Рис. 1. Зависимость скорости дыхания от присутствия ионов K^+ у анаэробных (а) и аэробных (б) клеток. Гл—глюкоза, 10 мМ; Ар—арабиноза, 200 мМ; KCl—100 мМ; Суц—сукцинат натрия, 10 мМ.

можно объяснить, предположив, что энергозависимый транспорт K^+ внутрь бактерий шунтирует дыхательную цепь и для поддержания мембранного потенциала необходимо усиление дыхания. Клетки, выращенные различными способами, обладают одинаковой интенсивностью дыхания. Различие между ними проявляется по их реакции на введение ДЦКД (N,N'-дициклогексилкарбодимид)—ингибитора протонной АТФ-азы BF_0F_1 (рис. 2 а). В случае аэробов ДЦКД увеличивает вели-

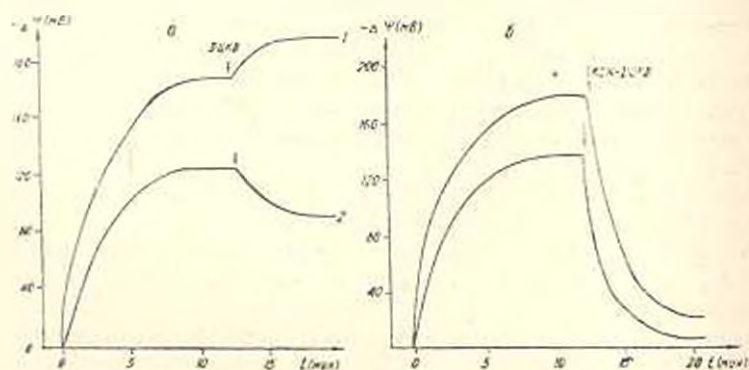


Рис. 2 а) Влияние ДЦКД на величину мембранного потенциала у аэробов (1) и анаэробов (2). ДЦКД— $5 \cdot 10^{-4}$ М. б) Влияние KCN и ДЦКД на величину мембранного потенциала у аэробов (1) и анаэробов (2). KCN—10 мМ; ДЦКД— $5 \cdot 10^{-4}$ М.

чину мембранного потенциала, так как в его присутствии блокируется шунтирующий ток ионов водорода через комплекс BF_0F_1 , работающий

в режиме синтеза АТФ. У клеток, выращенных без принудительной аэрации с глюкозой, ДЦКД, наоборот, снижает $\Delta\psi$, так как в этом случае подавляется работа H^+ -АТФ-азы, транспортирующей H^+ из клетки в среду и генерирующей мембранный потенциал за счет гидролиза АТФ. Роль дыхательной цепи в данном случае у анаэробных клеток, по-видимому, заключается в стабилизации величины мембранного потенциала, так как ДЦКД снижает $\Delta\psi$ у них всего на 25–30 мВ, в то время как у строго анаэробных клеток ДЦКД полностью блокирует его. Совместное присутствие KCN + ДЦКД почти полностью снижает величину мембранного потенциала у клеток обоих типов (рис. 2б). Как видно из рис. 2, отличие анаэробных клеток от аэробных проявляется и в более низких значениях мембранного потенциала, как у *E. coli* [22]. Для *S. marcescens* это соответственно 130 и 175 мВ.

На рис. 3 приведены данные о внутриклеточной концентрации АТФ, АДФ и фосфата у *S. marcescens* в различных условиях опыта. Обращает на себя внимание тот факт, что аэробные и анаэробные клетки резко различаются по внутриклеточному содержанию нуклеотидов. У первых пул АТФ в среде роста значительно выше, чем у анаэробных, хотя разница во внутриклеточной концентрации АДФ у них значительно меньше. Аэробные и анаэробные клетки по-разному реагируют и на внесение в экспериментальный раствор источника энергии глюкозы и увеличение осмотического давления с помощью арабинозы. Аэробные клетки намного чувствительней анаэробных: пул АТФ в этих условиях у них возрастает быстрее. В модельном опыте, когда изучались потоки ионов, анаэробные клетки практически все это время сохраняли пул АТФ на уровне 5–7 мМ, а у аэробных клеток в течение всего эксперимента не прекращался рост внутриклеточной концентрации АТФ (от 2 до 8 мМ) (рис. 3). Эти результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными о том, что пул АТФ у отмытых клеток *E. coli* составляет

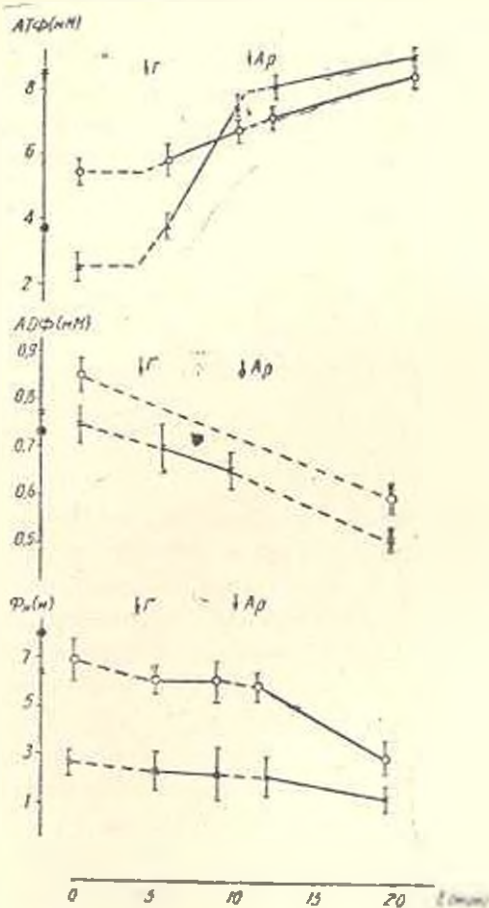


Рис. 3. Изменение внутриклеточных концентраций АТФ, АДФ и неорганического фосфата у *S. marcescens*. Гл—глюкоза, 10 мМ; Ар—арабиноза, 200 мМ. х—аэробные, о—анаэробные клетки.

3 мМ [18]. В отличие от аэробов, у которых энергия АТФ поставляется главным образом за счет окислительного фосфорилирования, у анаэробных клеток, хотя и функционирует дыхательная цепь (рис. 1 и 2), основным ее назначением в условиях нашего опыта, по-видимому, является не накопление АТФ, а стабилизация мембранного потенциала.

По формуле (2) нами рассчитан аденилатный заряд клеток *S. marcescens*. В бактериальной суспензии он равен 0,5 и 1,7 для анаэробов и аэробов соответственно, в чем проявляется еще одно различие между ними. После перенесения бактерий в экспериментальный раствор, содержащий глюкозу, аденилатный заряд возрастает в течение 5 мин до 3,3 у анаэробов и 4,8 у аэробов. В точке максимального накопления ионов калия, вызванного в присутствии глюкозы положительным осмотическим шоком, аденилатный заряд достигает 7,3 и 5,9 у анаэробов и аэробов соответственно. Таким образом, возрастание аденилатного заряда в обоих случаях коррелирует с поглощением ионов калия.

Принимая в формуле (3) $\Delta G_p = 30,6$, по данным рис. 3, рассчитав фосфатный потенциал ΔG_p , равный 46,7 кДж/моль для аэробных клеток *S. marcescens* в присутствии глюкозы и арабинозы. Отношение ΔG_p к протондвижущей силе $\Delta \mu H^+$ определяет стехиометрию $H^+/\text{АТФ-насоса}$. Так как в условиях нашего эксперимента измеренное салициловым электродом значение $\Delta pH = 0$, то $\Delta \mu H^+ = F \cdot \Delta \Psi$. Таким образом, число протонов n , переносимых через мембрану *S. marcescens* при гидролизе одной молекулы АТФ, равно:

$$n = \frac{\Delta G_{p \text{ АТФ}}}{\Delta \mu H^+} = \frac{\Delta G_{p \text{ АТФ}}}{F \cdot \Delta \Psi} = 3,0, \quad (5)$$

где значение $\Delta \Psi$ для аэробных клеток в присутствии глюкозы и арабинозы принято равным 160 мВ [4]. Значение $H^+/\text{АТФ} = 3$, полученное нами для *S. marcescens*, хорошо согласуется со значениями, приводимыми в литературе для хлоропластов, митохондрий и бактериальных везикул [2]. С помощью различных методов для целого ряда микроорганизмов было установлено, что значения стехиометрии $H^+/\text{АТФ}$ лежат в области от 2 до 5 [8, 13, 23]. Оценка $H^+/\text{АТФ}$ стехиометрии ранее проводилась для молочнокислых бактерий *St. lactis* [19].

Было показано, что это соотношение равно 2 в условиях искусственной энергизации мембраны либо с помощью индуцированного калийом калиевого потенциала, либо искусственно созданным трансмембранным pH градиентом [20, 21]. Для гликолизующих клеток *St. lactis* при pH 5 стехиометрия $H^+/\text{АТФ} = 3$ [19]. На клетках *E. coli* стехиометрия $H^+/\text{АТФ}$ определялась при различных pH: при pH 6,25 $H^+/\text{АТФ} = 2,5$, а при pH 8,25 $H^+/\text{АТФ} = 4$ [14]. Позже тот же автор показал, что при нейтральных значениях pH среды у анаэробных *E. coli* $H^+/\text{АТФ} = 3$ [15]. Аналогичные исследования на клетках *Streptococcus cremoris* показали, что стехиометрия $H^+/\text{АТФ}$ близка к 2, но может достигать 5 у растущих клеток [7, 24].

Мы оценили также стехиометрию предполагаемого K^+ -насоса у анаэробных клеток. Равновесный калиевый потенциал E_K , рассчитанный по калиевому градиенту, определяемому толуольным методом, оказался равным 200 мВ. Таким образом, $K^+ / \text{АТФ} = \frac{\Delta Q}{F \cdot E_K} = 2,2$.

Нами показано, что ионы калия поглощаются против градиента концентраций, используя либо энергию электрического поля, либо АТФ [4]. На основании приведенных данных следует предположить, что в бактериях *S. marcescens* оперирует электрогенный конститутивный насос, трансформирующий энергию гидролиза АТФ в работу по транспорту калия, со стехиометрией переноса $K^+ / \text{АТФ}$ близкой к 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ливинджер А., Биохимия. М., 1974.
2. Николс Д. Дж. Биоэнергетика. М., 1985.
3. Хачатрян А. Ж. Биолог. ж. Армении, 39, 3, 1986.
4. Хачатрян А. Ж., Дургарьян С. С., Мартиросов С. М. Биофизика, 1986 (в печати).
5. Bakker E. P., Mangerich W. E. Biochem. Biophys. Acta, 730, 379, 1983.
6. Berenblum J., Chain E. Biochem. J., 32, 295, 1938.
7. Brink B., Konings W. N. J. Bacteriol., 152, 2, 682, 1982.
8. Dawson M. J., Jones C. W. Arch. Microbiol., 133, 55, 1982.
9. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenergetics, 5, 554, 1978.
10. Ereclinska M., Wilson D. F. Trends in Biochem. Sci., 8, 219, 1978.
11. Eisenstadt E. J. Bacteriol., 12, 264, 1982.
12. Grinvalene B., Chmelianskaite V., Grintus L. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56, 206, 1974.
13. Guffanti A. A., Susman P., Blanco R., Krulwich T. A. J. Biol. Chem., 253, 708, 1978.
14. Kashket E. R. Biochemistry, 21, 22, 5534, 1982.
15. Kashket E. R. FEBS Lett., 154, 2, 343, 1983.
16. Liberman E. R., Topuly V. P. Biochem. Biophys. Acta, 103, 125, 1968.
17. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
18. Maloney P. C., Kashket E. R., Wilson T. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71, 3896, 1974.
19. Maloney P. C. J. Bacteriol., 153, 3, 1461, 1983.
20. Maloney P. C. J. Bacteriol., 132, 3, 564, 1977.
21. Maloney P. C., Hansen F. C. J. Membran. Biol., 66, 63, 1982.
22. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Bioelectrochem. Bioenergetics, 12, 25, 1985.
23. Mitchell H., Osterholt D. Biochemistry, 19, 4507, 1980.
24. Otto R., Klont B., van Brink B., Konings W. N. Arch. Microbiol., 139, 4, 338, 1984.
25. Slater E. C. Methods in Enzymology, 55, 235, 1979.
26. Weil-Malherbe H., Green R. Biochem. J., 49, 286, 1951.
27. Zech H. J. Appl. Biochem., 3, 473, 1981.

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики,
Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР, г. Пушкино,
Научно-исследовательский технологический институт
аминокислот, Ереван

Поступило 5.XI 1985 г.

ЭКОЛОГИЯ И ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ СЕРОТИПА 14 *BACILLUS THURINGIENSIS*

ЛЕ ТЬЕН ФЫОНГ, Э. К. АФРИКЯН

Ключевые слова: энтомопатогенные бациллы, микробиометод, микрофлора

Среди микробиологических средств борьбы с вредоносными насекомыми большой интерес представляет разновидность *Bacillus thuringiensis* в. *israelensis*, трактуемая как серотип 11. Бактерии данного вида продуцируют токсины, обладающие высокой активностью против личинок комаров и мошек [1, 5]. В литературе имеются данные по экологии энтомопатогенных бацилл *B. thuringiensis* [2—4], однако вопросы их эколого-географического распространения освещены крайне слабо. Недостаточность такого рода сведений затрудняет выявление закономерностей экологии бактерий указанной группы в природе и направленный поиск наиболее вирулентных штаммов для получения высокоэффективных продуцентов ларвицидных препаратов.

Материалом для исследований являлись 103 природных субстрата, в том числе—57 образцов различных насекомых из разных эколого-географических районов (табл.). Анализ микрофлоры проводился высевом суспензий субстратов на агаризованные среды. Все колонии спорообразующих бактерий, сходные по культуральным особенностям с *B. cereusthuringiensis*, микроскопировались и при наличии кристаллоидных вклю-

Распространение бактерий серотипа 14 *B. thuringiensis* в. *israelensis*

Наименование образцов и их происхождение	Кол-во об- следованных образцов	Обнаружено образцов с культурами	
		<i>B. thuringiensis</i>	в том числе <i>B. thuringiensis</i> <i>v. israelensis</i>
п о ч в ы			
Тропические почвы, Центральная Америка	2	7	7
Тропические почвы, Вьетнам	46	9	9
н а с е к о м ы е			
Личинки комаров, Тюменская область	9	10	1
Личинки комаров, АрмССР	1	1	1
Паук, АрмССР	1	3	3
Слепки, АрмССР	8	17	4
Б. еловый дубоед, Груз.ССР	1	1	1
Короеды, лес, Груз.ССР	3	1	0
Шляпильники, лес, Груз.ССР	3	10	5
Неидентифицированные насекомые	12	3	1
Тля, Новосибирская обл.	7	21	0
Пауки, Вьетнам	7	0	0
Комары, Вьетнам	3	0	0
Всего:	103	83	39

культуры выделялись в чистую культуру. Идентификация культур серотипа 14 *B. thuringiensis* проводилась на основании изучения комплекса морфофизиологических свойств и серотипизации с гомологичной интисывороткой, полученной к 11-антигену данной разновидности.

В результате выполненных работ, подытоженных в таблице, культуры серотипа 14 *B. thuringiensis* выявлены в 12 образцах из 103 обследованных. Число культур серотипа 14 составляет 39.

Характерно, что в образцах почв их число было незначительным и в основном из местообитаний комаров (лесные и болотные почвы). Что касается энтомопатогенной приуроченности культур серотипа 14, то определенной закономерности в этом отношении не обнаружено. Они выявлены как в личинках комаров, так и у различных насекомых—слепней, пилильщиков и др. Подобное явление отмечается и в целом в отношении представителей других разновидностей *B. thuringiensis*. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что преимущественная приуроченность культур данного вида к насекомым должна определить направленный поиск новых штаммов именно энтомогенного происхождения.

На основании полученных данных можно заключить, что *B. thuringiensis* и *B. israelensis* имеют широкое эколого-географическое распространение и выявляются в основном у насекомых.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкан Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Кулагин В. С., Лебедева Н. П., Гиль Т. А., Чумак Б. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их исследование в народном хозяйстве. 70—75, Иркутск, 1980.
3. Ромашева Л. Ф., Балыкин А. В., Видемский Э. В., Шербак В. П. и др. Микробиологические методы борьбы с эктопаразитами птиц. Фрунзе, 1975.
4. Тадалаева Г. Б., Покровская Л. А. В кн.: Биология микроорганизмов и их исследование в народном хозяйстве. 110, Иркутск, 1980.
5. Barjac de H. C. R. Acad. Sci. (Paris), 286D: 797—800, 1978.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 3.III 1986 г.

УДК 616.34—036.11+575.1+576.8+1.48

ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ПЛАЗМИД ПАТОГЕННОСТИ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

С. Т. МНАЦАКАНОВ

Ключевые слова: плазмиды патогенности, энтеробактерии.

Наличие плазмид, детерминирующих патогенность, установлено у ряда представителей семейства кишечных бактерий [1, 2, 6, 8].

Однако до настоящего времени практически отсутствуют сведения о сочетании носительстве некоторых плазмидных факторов патогенности у различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

В настоящей работе приведены результаты изучения сочетанного носительства штаммами таких плазмидных факторов, как энтеротоксигенность (Ent), антигены адгезии (K 88, K 99, Vir, CFAI, CFaII), гемолитическая активность (Hly) у ряда представителей семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из различных источников—от детей раннего возраста и домашних животных, страдавших диареей.

Материал и методика. Было исследовано 192 культуры различных представителей семейства кишечных бактерий: *Shigella sonnei* (4 культуры), *Salmonella typhimurium* (16), *Citrobacter spp.* (12), *Arizona spp.* (3), *Klebsiella pneumoniae* (56), *Hafnia alvei* (8), *Enterobacter cloacae* (1), *Serratia sp.* (1), *Proteus vulgaris* (17), *P. mirabilis* (13), *P.morganii* (16), *P. rettgeri* (3), *Yersinia enterocolitica* (37 культур).

Плазмиды патогенности определяли по их фенотипическому проявлению. Энтеротоксигенность определяли на лигированных отрезках тонкой кишки кролика [7], факторы колонизации типа CFA—в реакциях D-маннозрезистентной гемоглютинаши [4], а антигены K 88, K 99, Vir—в реакциях микроагглютинации на стекле с антисыворотками к этим антигенам. Данные о наличии у штаммов антигенов адгезии приведены в работе суммирно и обозначены символом Adh. Гемолитическую активность проверяли на специально разработанной среде [3].

Считаем необходимым отметить, что хотя в ряде случаев возможна хромосомная детерминация этих факторов, данные мировой литературы говорят о том, что в данном случае, в первую очередь, речь идет о плазмидном характере вышеуказанных факторов патогенности.

Результаты и обсуждение. Из 192-х изученных культур у 130 (67,7±3,4%) были выявлены плазмиды патогенности, а у 62-х культур (32,3±3,4%) ни одна из названных плазмид не была обнаружена.

Из общего числа штаммов у 80 (41,7±3,6%) была одна из этих плазмид, а у 50 (26,0±3,2%)—от 2 до 5 плазмидных факторов патогенности (Ent, K 88, K 99, Vir, CFAI, CFaII, Hly) в самых различных сочетаниях: *S. sonnei*—Adh, Hly; Ent, Adh; *S. typhimurium*—Ent, Hly; Ent, Adh, Hly; Ent, Adh; *Citrobacter spp.*—Ent, Hly; Ent, Adh, Hly; Ent, Adh; *K. pneumoniae*—Ent, Adh; Adh, Hly; Ent, Hly; *H. alvei*—Ent, Adh; Adh, Hly; *E. cloacae*—Adh, Hly; *Serratia sp.*—Adh, Hly; *P. vulgaris*—Ent, Adh; *P. mirabilis*—Ent, Adh; Ent, Hly; *P.morganii*—Ent, Adh; Ent, Hly; *P. rettgeri*—Ent, Adh; Ent, Hly; *Y. enterocolitica*—Ent, Adh; Ent, Hly. У штаммов *Arizona spp.* сочетанного носительства плазмидных факторов патогенности не было обнаружено.

Как видно из приведенных данных, у штаммов семейства *Enterobacteriaceae* выявляются самые различные сочетания плазмидных факторов патогенности, т. е. у штаммов энтеробактерий, выделенных от детей и домашних животных с кишечными расстройствами, довольно широко распространено явление полиплазмидности, т. е. носительство одной бактериальной клеткой нескольких плазмид, детерминирующих патогенность. Излапая материал, мы неоднократно отождествляли каждый фактор патогенности с отдельной плазмидой, имея на то веские основания, так как литературные данные говорят о том, что за исключением комплексной плазмиды Ent-R такие факторы патогенности, как антигены K 88, K 99, Vir, CFAI, CFaII, энтеротоксигенность (Ent), кодируются разными плазмидами [5].

Таким образом, у штаммов семейства кишечных бактерий, выделяемых при инфекционном процессе, наблюдается явление полиплазмидности — носительство одной клеткой нескольких плазмидных факторов патогенности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мнацаканов С. Т. ЖМЭН, 6, 53—55, 1983.
2. Мнацаканов С. Т. ЖМЭН, 3, 46—48, 1984.
3. Мнацаканов С. Т., Коцинян М. Е., Лиходед В. Г., Раскин Б. М., Акопян Р. Г., Лобова Е. А., Денисова С. В. Методические рекомендации по определению гемолитической активности кишечных бактерий. Ереван, 1982.
4. Мнацаканов С. Т., Коцинян М. Е., Арутюнян Н. М., Тарвердян Н. А., Лиходед В. Г., Раскин Б. М. Методические рекомендации по определению факторов колонизации у кишечных бактерий. Ереван, 1984.
5. Broda P. Плазмиды. М., 1982.
6. Csrok E., Csik M., Börzönyi M. Acta Microbiol. Ac. Sci. hung., 28, 119, 1981.
7. De S. N., Chatterjee D. K. J. Pathol. Bacteriol., 66, 559, 1953.
8. Wadström T., Kettis A. A., Hult D., Holmgren J., Meeuwde G., Möllby R., Söderlund O. Brit. Med. J., 1, 6022, 1401, 1976.

Армянский ордена Трудового Красного Знамени
НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А. Б. Алексаняна

Поступило 6.XII 1985 г.

УДК 576.851.5:632.937.15

ОБ ЭНТОМОПАТОГЕННОЙ МИКРОФЛОРЕ НАСЕКОМЫХ И ПОЧВ

ЛЕ ТЬЕН ФЫОНГ

Ключевые слова: микрофлора насекомых и почв, энтомопатогенные бактерии.

Изучение микрофлоры составляет основу выяснения природы взаимодействия микроорганизмов с насекомыми и их роли в жизнедеятельности этих организмов. Оно в значительной мере определяет роль энтомопатогенных микроорганизмов в становлении характерных биоценозов и в природных эпизоотиях. Знание особенностей энтеропатогенной микрофлоры применительно к специфическим эколого-географическим условиям является основой направленных поисков различных видов микроорганизмов для практического применения их в борьбе с вредоносными насекомыми [1]. Ряд авторов выявили закономерности в эколого-географическом распространении некоторых разновидностей *Bacillus thuringiensis* [2—4].

В настоящем сообщении представлены данные о микрофлоре различных насекомых и почв и распространении в них энтомопатогенных бактерий.

Материал и методика. Микробиологический анализ качественного и количественного состава микрофлоры проводился высевом разводов образцов исследуемых субстратов на разные агаризованные среды. Учитывая возможно малое содержание энтомопатогенных бацилл в организме насекомых, образцы последних рассевались без разведения. Использовались мясопептонный агар, рыбный агар, сусло-агар с добавлением мясопептонного агара (1:1) и среда Эшби (для олигонитрофилов). Идентификация культур *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* проводилась путем микроскопии препаратов всех выросших на средах колоний, схожих по культуральным особенностям с указанными видами бактерий.

Результаты и обсуждение. В таблице обобщены данные о преобладающей микрофлоре и обнаружении отмеченных групп энтомопатогенных бацилл в обследованных образцах насекомых и почвы. Как пра-

Характеристика микрофлоры и энтомопатогенных бацилл насекомых и почвы

Исследованные образцы и их происхождение	Кол-во образцов	Доминантная бациллярная флора	Кол-во штам- мов	
			БТ	БС
п о ч в ы				
Тропические почвы, Центральная Америка	3	БТ	7	0
Тропические почвы, Вьетнам	45	БТ, БС	8	6
н а с е к о м ы е				
Личинка комаров, Тюменская обл.	9	БТ	11	0
Имаго комаров	1	БТ	3	0
Личинки слепней, Армения	48	БТ	13	0
Неидентифицированные насекомые	12	БТ, кокки, грибы	3	0
Ясневый шиловатый пилильщик, Груз.ССР	1	БТ	4	0
Б. еловый дубоед, Груз.ССР	1	БТ	1	0
Короед-типограф, Груз.ССР	2	БТ, БС, грибы	1	1
Шестизубчатый короед, Груз.ССР	1			
Рыжий сосновый пилильщик, Груз.ССР, АрмССР	2	БТ	6	0
Гля, Новосибирская обл.	7	БТ, бактерии	16	0
Паук, АрмССР	1	БТ	10	0
Паук, Вьетнам	7		0	0
Имаго комаров, Вьетнам	3	бактерии	0	0

Условные сокращения: БТ — *Bacillus thuringiensis*,

БС — *Bacillus sphaericus*.

вило, природным очагом распространения энтомопатогенных бацилл являются насекомые, обнаружение их в почве, очевидно, является результатом попадания их из остатков погибших насекомых. Важно подчеркнуть, что источником выделения *B. thuringiensis*, *B. sphaericus* могут быть здоровые насекомые, не подвергнутые инсектицидному действию этих бактерий. Сказанное особенно отчетливо проявляется на экологии культур *B. thuringiensis* v. *israelensis*.

Штаммы этой разновидности выделены из таких насекомых, как дубоед, пилильщики, слепни и т. п., которые полностью резистентны в отношении этих бактерий. Таким образом, насекомые — основной резервуар выделения новых перспективных штаммов энтомопатогенных бацилл, независимо от видовой и родовой принадлежности и состояния насекомого.

Особый интерес в настоящее время представляют культуры *B. sphaericus*, обладающие высокой вирулентностью к особо опасным видам комаров. По нашим данным, культуры данного вида не столь редки в почве и микрофлоре насекомых. Среди выделенных 6 штаммов 3 обладали ларвицидной активностью против личинок *A. aegypti*. Ниже приводится описание штаммов *B. sphaericus*, идентифицированного как представитель серотипа 5 данного вида. Штамм ИНМИА-Ф183 на МПА образует колонии желтовато-кремового цвета, округлые, с гладкой блестящей поверхностью и ровными краями. Вегетативные клетки палочковидные, подвижные, размер 0,5—1,2×2—4 мк. Расположение споры терминальное или субтерминальное, клетку раздувает. Споры округлой формы с диаметром 0,6—1,5 мк. Рядом со спорой выявляется мелкое кристалловидное включение. Штамм выделен из погибшего имаго короеда типографа, обладает вирулентностью к личинкам комаров родов *Culex*, *Anopheles*, *Aedes*. Величина $ЛК_{50}$ для личинок *A. aegypti* 0,5—1,0×10⁴ спор/мл.

ЛИТЕРАТУРА

1. Африкан Э. К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973.
2. Ромашева Л. Ф., Балькин А. В., Видомский Э. В., Щербак В. П. и др. Микробиологические методы борьбы с эктопаразитами птиц, Фрунзе, 1975.
3. Талалаева Г. Б. В кн.: Роль дендрофильных насекомых в таежных экосистемах. 134, Красноярск, 1980.
4. Ohba M., Aizawa K. J. Invert. pathol., 37, 1, 62, 1981.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 3.III 1986 г.

УДК 577.15.576.8.095

ВЛИЯНИЕ СОЛЕЙ АММОНИЯ НА УСВОЕНИЕ D-ИЗОМЕРА ВАЛИНА ДРОЖЖАМИ *CANDIDA GUILLIERMONDII* ВКМ-У-42

Е. Г. БАГДАСАРЯН, М. О. ГРИГОРЯН, М. А. ДАВТЯН

Ключевые слова: дрожжи, D-, DL- и L-изомеры валина, соли аммония.

Ранее было показано, что аминокислоты с разветвленной углеродной цепью (DL-валин и DL-лейцин), в отличие от глутамата, аланина и ряда других аминокислот, плохо усваиваются и слабо стимулируют рост биомассы дрожжей рода *Candida* при их использовании в качестве единственного источника азота [3]. Усвоение этих аминокислот начиналось после длительной инкубации (22—24 ч), когда усвоение глутамата, аланина и др. аминокислот исчерпывалось, и заканчивалось на 41—42 ч инкубации.

Однако, как показали дальнейшие исследования, L-изомер этих аминокислот усваивается хорошо, вызывая заметный рост биомассы, и в этом отношении незначительно уступает сульфату аммония, тогда

как D-изомеры усваиваются плохо, к тому же после длительной предварительной инкубации. Интересно также, что D-изомеры заметно подавляют усвоение L-изомеров этих аминокислот [4].

Установлено также, что в первые часы инкубации, хотя DL-валин и DL-лейцин хорошо трансформируются и способствуют образованию богатого фонда свободных аминокислот, не происходит более или менее заметного накопления глутамина, тогда как последний накапливается в значительном количестве при усвоении глутамата, аланина и др. хорошо усвояемых аминокислот [2]. Можно было предположить, что плохое усвоение DL-валина и DL-лейцина связано с неспособностью этих аминокислот вызывать образование свободного аммиака, необходимого для биосинтеза глутамина. А как известно, ряд важнейших азотсодержащих соединений клетки (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, гистидин, глютамин и др.), без которых невозможен рост биомассы, синтезируется из аммиака после предварительного включения последнего в глутамин.

Исходя из этих соображений, можно предположить, возможность успешного усвоения DL-валина и DL-лейцина дрожжами, а также стимулирования роста биомассы при использовании этих аминокислот в качестве единственного источника азота в первые часы инкубации и условиях излучения в среде роста небольших концентраций аммиака, необходимого для обеспечения биосинтеза глутамина.

Для проверки этого предположения исследовались влияние различных концентраций аммиака на рост биомассы и усвоения сахара среды при выращивании дрожжей в присутствии валина и лейцина в качестве единственных источников азота.

Материал и методика. Объектом исследований служили дрожжи *Candida guilliermondii* ВКМ У-42, полученные из отдела типовых культур Института микробиологии АН СССР. Для выращивания дрожжей применялась жидкая синтетическая среда, названная основной средой—о. с. следующего состава: из 1000 мл водопроводной воды 10 г—глюкозы, 1,23 г— KH_2PO_4 , 3,1 г— $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,625 г— $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,125 г— NaCl , 0,125 г— $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 80 мкг—биотина. Двухсуточная культура дрожжей с сусло-агара из пробирки переносилась в о. с. в качестве посевного материала. Посевной материал брался в количестве 5 мг сухой массы дрожжей на 100 мл о. с. Дрожжи выращивались в литровой колбе Эрленмейера на 100 мл питательной среды. В вариантах опыта в качестве источника азота использовали D-изомер и рацемическую форму валина (DL). Количество D-изомера и DL-формы аминокислот определяли исходя из содержания азота сульфата аммония, который вносился в о. с. Обычной нормой считали 3,1 г сульфата аммония в 1000 мл о. с. Все опыты проводились в литровых колбах Эрленмейера в условиях интенсивного взбивания (200—220 об/мин) в термокамере при температуре $30 \pm 1^\circ$. Количество глюкозы в о. с. определялось микрометодом феррицианида по Хагедорн-Ниссену [1]. Количество биомассы определялось взвешиванием ее до постоянного сухой массы или нефелометрированием дрожжевой суспензии на ФЭК М-57.

Результаты и обсуждение. Полученные нами данные подтвердили, что L-изомер валина хорошо усваивается, вызывая как прирост биомассы (рис. 1), так и интенсивное расщепление сахара среды (рис. 2), и в этом отношении он не уступает сульфату аммония; D-валин и DL-валин значительно менее эффективны.

Результаты этих исследований показывают, что при внесении в питательную среду небольших концентраций сульфата аммония полностью устраняется отрицательное влияние D-изомера и DL-формы валина на расщепление сахара и биосинтез биомассы исследуемых дрожжей. В варианте опыта с применением 1/10 части обычной нормы сульфата аммония в качестве единственного источника азота мы получили небольшой прирост биомассы (приблизительно 1/3 прироста при полной норме)

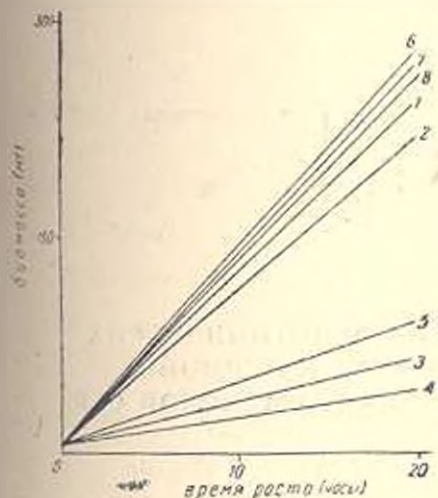


Рис. 1.

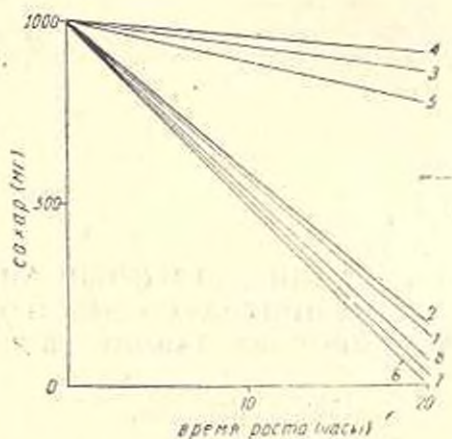


Рис. 2.

Рис. 1. Влияние 1/10 части обычной нормы сульфата аммония на усвоение изомеров валина при биосинтезе биомассы дрожжей *Candida guilliermondii* BKM Y-42. 1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2. L-валин; 3. DL-валин; 4. D-валин; 5. 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6. L-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7. DL-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8. D-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Рис. 2. Влияние 1/10 части обычной нормы сульфата аммония на усвоение изомеров валина при расходе сахара в среде роста дрожжей *Candida guilliermondii* BKM Y-42. 1. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2. L-валин; 3. DL-валин; 4. D-валин; 5. 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 6. L-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7. DL-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 8. D-вал + 1/10 п $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

и незначительное усвоение глюкозы среды (1/5 часть усвоения при полной норме). На рисунках показано, что при использовании в качестве единственного источника азота D-валина и DL-валина прирост биомассы и усвоение сахара среды происходит на очень низком уровне. При добавлении к питательной среде 1/10 части обычной нормы сульфата аммония как прирост биомассы, так и усвоение глюкозы среды при использовании D- и DL-стереоизомеров валина в качестве единственных источников азота резко стимулируются и достигают уровня наблюдаемого при использовании полной нормы сульфата аммония и L-валина.

Таким образом, предположение о стимулирующем влиянии небольших концентраций аммония на усвоение изомеров аминокислот, вероятно, обеспечивающего синтез глутамина и далее других азотсодержащих соединений клетки (пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды, гексозамин и др.) оказалось правомерным. Очевидно, при этом создаются условия для инкубации соответствующих ферментных систем усвоения аминокислот.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Белозерский А. П., Проскуряков Н. И. Практическое руководство по биохимии растений, М., 1951.
2. Нерсисян А. А., Оганесян С. П., Давтян М. А. Биолог. ж. Армении, 26, 6, 101, 1973.
3. Тер-Карпетян М. А., Инджикян С. М., Чубарян С. В., Биолог. ж. Армении, 21, 1, 3, 1968.
4. Meister A. Biochemistry of the amino acids, 1965.

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

Поступило 1.XII 1985г.

УДК 576.4.591

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ДИКОГО ЯЧМЕНЯ И ЭГИЛОПСА, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В УСЛОВИЯХ АРМЯНСКОЙ ССР

С. С. ЗАМИНЯН, Л. О. ДЖАНПОЛЯДЯН, Р. Э. АВАЛЯН

Ключевые слова: ячмень дикий, эгилопс, экологические зоны, варьируемые признаки.

Изучению особенностей количественных признаков растений в настоящее время уделяется большое внимание, так как к их числу относятся большая часть хозяйственно-ценных признаков. Это связано прежде всего с тем, что большинство адаптивных реакций растений по своей генетической природе является полигенным [1—3]. Одной из основных особенностей количественных признаков является их большая изменчивость даже при незначительных изменениях факторов внешней среды [1].

В связи с этим представляло интерес проведение системного анализа некоторых количественных признаков у дикорастущих видов эгилопса и ячменя.

Материал и методика. Материалом исследования служили *Aegilops cylindrica* Host., *Hordeum spontaneum* C. Koch., собранные в разных экологических зонах Армянской ССР: Аизаване, Вардашене, ущелье реки Раздан и районе промышленного загрязнения.

Изучены следующие количественные признаки: число продуктивных стеблей, длина главного стебля, длина верхнего междоузлия, число листьев, длина главного колоса, число колосков главного колоса, масса одного зерна.

Статистическую обработку материала проводили с привлечением методов биометрии. В качестве основных параметров вариационных рядов исследуемых характеристик были вычислены средняя арифметическая ($\bar{x}$), ошибка средней арифметической $\pm m$ (m), среднее квадратическое отклонение (σ) и коэффициент вариации (V).

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad \sigma = \sqrt{\frac{\sum x_i^2 - n\bar{x}^2}{n-1}} \quad V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100\%$$

где σ — значение отдельных вариаций, n — объем выборки

При анализе достоверности между средними арифметическими различных выборок применяли критерий Стьюдента. Сравнение дисперсий проведено вычислением критерия Фишера (F) и сопоставлением его с данными таблицы. Основные статистические параметры исследуемых видов приводятся в табл. 1, 2

Таблица 1. Основные статистические параметры исследуемых признаков в группах растений *Ae. cylindrica*

Признаки	Вардашен				Район промышленных выбросов			
	$\bar{x} \pm m(x)$	σ	V	N	$\bar{x} \pm m(x)$	σ	V	N
Число стеблей (продуктивных)	7.03±0.71	7.19	102.28	100	9.63±1.53	9.33	96.88	35
Длина главного стебля	45.74±1.31	12.99	29.70	99	36.11±1.41	11.01	31.49	62
Длина верхнего междоузлия	16.16±0.59	5.92	36.63	100	13.87±0.61	4.79	34.53	62
Число листьев	22.92±0.03	0.34	11.64	100	2.97±0.06	0.48	16.16	62
Длина колоса	10.26±0.23	2.31	22.51	99	10.85±0.39	3.08	28.39	62
Число колосков	4.40±0.27	1.43	33.64	30	7.77±0.49	2.67	34.46	30
Общая масса зерен	33.4 ±3.24	17.77	53.20	30	61.6 ±4.29	23.03	37.82	30
Масса одного зерна	6.90±0.56	3.02	43.77	29	7.91±0.34	1.88	23.76	30

Таблица 2. Основные статистические параметры исследуемых признаков в группах растений *H. spontaneum*

Признаки	Вардашен			Раздан		
	$\bar{x} \pm m(x)$	σ	V	$\bar{x} \pm m(x)$	σ	V
Число стеблей (продуктивных)	7.00±0.64	6.37	91.00	22.23±1.89	18.89	84.78
Длина главного стебля	54.14±2.19	20.90	38.60	46.71±1.30	12.98	17.79
Длина верхнего стебля	17.89±0.63	6.29	35.16	12.36±0.53	5.28	42.72
Число листьев	3.40±0.06	0.59	17.35	3.38±0.03	0.93	27.51
Длина колоса	70.6 ±0.35	3.48	49.29	4.32±0.13	1.30	30.09

Результаты и обсуждение. На основании проведенных исследований было установлено, что как для растения ячменя, так и для эспелоса наиболее вариабельным признаком является признак кустистости, а наиболее консервативным — общее число листьев.

При сравнении растений из разных зон произрастания выявлена обратная зависимость между признаками кустистости и линейными характеристиками стебля, колоса, листьев. С увеличением (уменьшением) кустистости наблюдается уменьшение (увеличение) линейных размеров, что свидетельствует о реципрокном проявлении корреляции.

Наибольшие различия наблюдались между растениями из районов Вардашен и промышленных выбросов, а также между растениями из района промышленных выбросов и ущелья реки Раздан. Подобные изменения связаны как с большой ксероморфностью зон, так и, по-видимому, с насыщенностью воздушного бассейна вокруг района промышленных выбросов вредными газовыми примесями и вибрационными процессами.

1. Жученко А. А. Экологическая генетика культурных растений. 588, Кишинев, 1980.
2. Тарасенко Н. Д. Генетические методы в селекции растений. 208, М., 1971.
3. Waddington C. H. Organizers and genes. Cambridge, 1940.

Ерванский государственный университет,
кафедра генетики и цитологии

Поступило 2 X 1984 г.

УДК 633.11:575.24

МУТАБИЛЬНОСТЬ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ В ПОТОМСТВЕ КОЛОСЬЕВ РАЗЛИЧНОГО ОНТОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. А. ГУЛЯН

Ключевые слова: пшеница, ярусность колосьев, мутабельность.

В селекционно-генетических экспериментах по индуцированному мутагенезу фактически нет единой методики определения объема выборки как семян для M_1 , так и растений, колосьев с каждого растения и семян с колоса для получения M_2 .

Существует мнение [11, 12], что для эффективного отбора достаточно брать от каждого растения M_1 по одному—два семени. Ряд авторов утверждают, что у злаковых обычно один (первый) колос происходит от мутировавшей клетки и является гетерозиготным по мутировавшему гену, все остальные клетки остаются неизменными, почему и предлагают выращивать M_1 в условиях густого стеблестоя, чтобы из каждого семени вырос только один побег [2, 8]. При этом Шмалец [8] предлагает брать от каждого растения M_1 20—30 семян. Другие авторы доказывают, что мутацию несут не только первый (главный) колос, но и последующие, хотя более эффективными по выходу мутаций в одном случае являются первичные колосья [1, 6, 9], в другом—колосья третьего—пятого порядков [4].

Наши опыты показали, что частоты мутаций в M_2 не зависят ни от степени кушения растений M_1 , ни от порядка появления колоса [3].

В настоящей работе приводятся результаты исследования частоты и спектра мутаций в потомстве колосьев первого—четвертого яруса растений M_1 , выращенных из облученных семян.

Материал и методика. Воздушно-сухие семена сорта Сиете Церрос 66 облучались рентгеновскими лучами в дозе 150 Грей (Гр) при мощности дозы 6 Гр/мин и высевались в вегетационных сосудах в 4-х повторностях, по 20 в каждом. Опыты проводились на Эчмиадзинской экспериментальной базе НИИЗ АрмССР в 1980—1982 гг. M_2 выращивали в полевых условиях.

В посеве M_1 были пронумерованы колосья первого—четвертого яруса и собраны для посева M_2 . В первый год были пронумерованы колосья 44-х растений, из второй—23-х. Из них четырехколосными оказались соответственно 18 и 15 растений, а трехколосными—26 и 8. Из каждого колоса высевалось по 25 семян. Каждый колос растений M_1 дал в M_2 одну семью.

В M_2 учитывались частота семей с морфологическими мутациями и частота и спектр мутаций в потомстве колосьев разных ярусов.

Результаты и обсуждение. В первый год исследования морфологические мутации были обнаружены у 78-ми семей из 150-ти (52% семей), а на второй год—у 26-ти из 84-х (30,9%). Частота встречаемости семей с мутациями в потомстве I—IV колосьев в 1981 г. составляла 45,5—72,2%, а в 1982 г.—21,7—46,6%. Такое расхождение данных по годам, возможно, объясняется влиянием климатических условий на проявление потенциальных мутаций и стохастичностью их возникновения. Так, Ралопорт [5] считает, что повторное возникновение мутации одного и того же гена наблюдается при тождественных условиях с вероятностью 1:5000—1:50000, при довольно большом объеме выборки. Следовательно, возникающие в одном опыте полезные мутации (равно как и любые) повторяются довольно редко.

В опытах частота встречаемости семей с морфологическими мутациями в потомстве колосьев более позднего происхождения (особенно последнего) была выше, чем в потомстве III—IV колосьев. В 1981 г. она составляла 54,5—72,5%, в 1982 г.—76,1—46,6%, а в потомстве I и II колосьев—соответственно 45,5—47,7 и 21,7—34,8%.

В опытах разных лет изменялся не только общий выход семей с мутациями, но и спектр и частота встречаемости отдельных морфотипов. В первый год опыта выявлен более широкий спектр мутаций с более высокой частотой, чем во второй. Чаще всего возникали мутации короткостебельности (36,0 и 26,2%), а затем скверхедности (5,3 и 4,8%) и спельтоидности (20,7 и 3,6%).

Частота возникновения мутаций в потомстве колосьев разных ярусов растений M_1 , %

Спектр	1981 г.				1982 г.			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Короткостебельные	31,8	36,4	38,6	39,8	21,7	30,4	17,4	40,0
Скверхедные	6,8	2,2	6,8	5,5	4,3	4,3	4,3	6,6
Спельтоидные	20,4	13,6	20,4	41,1	4,3	0	8,7	0
Высокорослые	2,3	0	2,3	5,5	0	0	0	0
Компактоидные	2,3	0	4,5	11,1	0	0	0	0
Полустерильные	2,3	0	0	0	0	4,3	0	0
Жесткостебельные	0	0	0	5,5	0	0	0	0

Данные таблицы показывают, что возникновение той или иной мутации в M_2 не зависит от порядка появления колоса. Любая мутация почти с одинаковой вероятностью может возникнуть в потомстве колоса любого яруса (от I до IV). Однако замечена несколько повышенная встречаемость короткостебельности в потомстве колосьев IV яруса—38,8 и 40,0% по сравнению с колосьями I яруса—31,8 и 21,7%.

Это даст основание заключить, что в экспериментах по мутационной селекции необходимо использовать семена всех продуктивных колосьев.

Анализ морфологических мутаций показал, что в потомстве отдельных колосьев возникали как одиночные, так и множественные мута-

ции. Замечено преобладание однотипных мутаций. Лишь в потомстве IV колоса в опыте 1981 г. обнаружено некоторое увеличение двойных и тройных мутаций. Мутации могут появляться как в потомстве всего растения M_1 , так и в потомстве отдельных колосьев—от I до IV. Так, в 1981 г. из 35-ти растений M_1 , имеющих мутации в потомстве, только у 8-ми все колосья являлись носителями мутаций. У 6-ти растений мутации были обнаружены только в потомстве одного колоса, опять же независимо от порядка его появления. В остальных случаях на каждом растении мутацию несли по два—три колоса. Аналогичные данные были получены в опыте 1982 г.

В опыте 1981 г. у 19-ти растений из 35-ти в потомстве разных колосьев растений M_1 спектр мутаций был различным. Это доказывает, что в образовании побегов участвует не одна, а несколько инициальных клеток, которые вероятнее всего могут нести различные потенциальные изменения. Иногда спектры мутаций в потомстве всех колосьев одного и того же растения совпадают. Так, в опыте 1981 г. у 8-ми растений в потомстве колосьев всех ярусов спектры мутаций были одинаковыми (короткостебельные или спелтоидные формы).

Если учитывать, что возникновение спелтоидности обусловлено несколькими цитологическими изменениями—нехваткой, потерей целой хромосомы, геной мутацией и т. д. [7, 10], то вполне можно допустить, что в генотипе одного растения имело место одновременно несколько изменений. Не исключено также, что могли возникнуть и другие предложения, которые, однако, впоследствии либо репарировали, либо привели к летальному исходу.

В отношении проявления короткостебельности в потомстве всех колосьев растений M_1 можно предположить, что поскольку на проявление признака высоты растений влияет множество генов, находящихся в различных хромосомах гексаплоидного набора, то вероятность одновременного изменения какого-либо гена из этого множества сравнительно высока. Не исключено также, что все побеги с однотипной мутацией могли образоваться от одной инициальной клетки, являющейся носителем определенной мутации.

То, что у значительной части растений в потомстве I—II колосьев не обнаруживается мутаций, а выявляются они в потомстве III—IV колосьев, свидетельствует о справедливости предположения о вызванном мутагеном задержке митоза инициальных клеток, несущих потенциальные мутации. А проявление мутаций в потомстве только I колоса говорит о том, что последующие побеги образовались от немутированных или репарированных клеток.

Все это дает основание предположить, что возникновение потенциальных мутаций в клетках носит вероятностный характер, а реализация их определяется жесткостью внутрисоматического отбора, на который в свою очередь влияют условия произрастания.

Результаты анализа показали, что нежелательные мутации (спелтоидность, компактоидность, жесткостебельность и др.) чаще всего встречаются в потомстве более поздних (III—IV) колосьев. Но так как здесь немало и полезных мутаций (в данном случае короткостебель-

ность), то, следовательно, для получения M_2 желательно использовать семена всех продуктивных колосьев растений M_1 , как было сказано выше.

Подсчет растений исходной и мутантной форм показал, что соотношение их составляет в среднем 12,5:1,0. Если для получения M_2 брать по 1—2 семени от каждого растения, то вероятность обнаружения мутации резко снижается, и вряд ли такой подход может быть эффективным для отбора ценных мутаций. Поэтому считаем целесообразным брать с каждого колоса растений M_1 по возможности больше семян, желательно не менее 20.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борейко В. С., Сичкарь В. И. Цитология и генетика, 8, 2, 1971.
2. Бриггс Ф., Ноулз П. Научные основы селекции растений. М., 1972.
3. Гулян А. А., Саакян А. Г. Изв. с.-х. наук. МСХ АрмССР, 6, 1983 (на армянском языке).
4. Зоз Н. Н., Дебуль Ф. А., Хуцишвили Г. А. Сб. Химический мутагенез и создание селекционного материала. М., 1972.
5. Ралопарт Н. А. Сб. Эффективность химических мутагенов в селекции. М., 1976.
6. Сальникова Т. В. Сб. Химические супермутагены в селекции. М., 1975.
7. Хвостова В. В., Эйгес Н. С. Цитогенетика пшеницы и ее гибридов. М., 1971.
8. Шмалец Х. Селекция растений. М., 1973.
9. Gaul H. In: Effects of ionizing radiations on seeds. Vienna, IAEA, 1961.
10. Mac Key Y. Hereditas, 42, 1—2, 1954.
11. Redei G. P. Z. pflanzenzucht, 73, 1974.
12. Yoshida Y. Jap. J. Gen., 40, 125, 1965.

Институт земледелия Госагропрома Армянской ССР

Поступило 17.IX 1984 г.

УДК 633.11.575.113

О СЛОЖНЫХ ГИБРИДАХ ПШЕНИЦЫ С РАЗЛИЧНЫМИ ФЕНОТИПАМИ ГИБРИДНОЙ КАРЛИКОВОСТИ

М. Х. КАЗАРЯН

Ключевые слова: пшеница, гибридная карликовость, множественные аллели

Наличие множественных аллелей того или иного гена увеличивает комбинативную изменчивость организмов. В работах, опубликованных нами ранее [1, 2], дана предварительная оценка сортов мягкой пшеницы по силе аллелей генов гибридной карликовости на основании изучения простых гибридов F_1 . Для уточнения силы аллелей генов D_1 , D_2 , сочетания D_2D_3 (с Th_0 и Th_2), обуславливающих явление гибридной карликовости, мы задались целью получить и изучить F_1 сложных (тройных) гибридов с различными фенотипами *h. dwarfness*.

Материал и методика. В исследования включены следующие сорта и образцы пшеницы: Канберра (D_1^5), суберманшахи (D_1^w), Вандилла (D_1^h), Калининская 11 (D_1^1).

Кубанская 122 (D_2^1). Горинская местная (D_2^*). Московская 2460 (D_2^*). Пуза 12 ($D_2D_3Th_0$). Задиславка ($D_2D_3Th_0^{m-m}$). РПГ 49/49 ($D_2D_3Th_0^{m-m}$). Асканийская 25 ($D_2D_3Th_2$). Степнячка 30 ($D_2D_3Th_2^{-w}$). Белька 32 ($D_2D_3Th_2^{m-w}$). Одесская 12 ($D_2D_3Th_2^{m-w}$). Фриско (D_1D_3). Символом s обозначены сильные аллели, ms — соответствующих генов, ms — умеренно-слабые, m — умеренные, w — умеренно-слабые, v — слабые, wt — сверхслабые. Контролем для сложных гибридов F_1 служили на соответствующие простые и тройные гибриды, полученные с участием сортов со слабыми аллелями генов гибридной карликовости. Наличие или отсутствие различных аллелей гена h *dwarfness* устанавливали по срокам наступления фенокритической и эффективной детальной фаз, а также по типу образовавшихся *dwarf*-растений. По отсутствию различий в проявлении фенокритической фазы и типе *dwarf*-растений у сложных гибридов с фенотипом *dwarf* 2 и *dwarf* 3 судили о наличии одинаковых аллелей данного гена. У гибридов с фенотипом *dwarf* 1 различия в силе аллелей устанавливали по срокам наступления эффективной детальной фазы у гибридных растений. В случае расхождения сложных гибридов фенотипически на 2 группы растений, т. е. при выявлении двух сроков проявления фенокритической (у гибридов *dwarf* 2 и *dwarf* 3) или эффективной детальной (у гибридов *dwarf* 1) фаз уточняли наличие разных аллелей изучаемого гена.

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что сложный гибрид F_1 (КанберраХсубкерманшахи)ХПуза 12 имеет два срока проявления фенокритической фазы (в возрасте 2-х листьев и в фазе полного кушения). В соответствии с этим возникают растения двух типов — *dwarf* 1 и *dwarf* 2. Если не учитывать природы множественных аллелей генов гибридной карликовости, то у этого гибрида теоретически можно ожидать образование растений с фенотипом *dwarf* 2. Однако именно различие в силе аллелей гена D_1 у сортов Канберра и субкерманшахи ведет к возникновению гибридных растений с двумя фенотипами — *dwarf* 1 (летальный, непродуктивный тип) и *dwarf* 2 (полулетальная, продуктивная форма). О разных аллелях одного и того же гена (D_1) у сорта Канберра и образца субкерманшахи (разновидность из популяции сорта Дир) свидетельствуют и простые гибриды F_1 . Так, фенокритическая фаза у гибрида Пуза 12ХКанберра наступает одновременно с таковой той части растений сложного гибрида F_1 (КанберраХсубкерманшахи)ХПуза 12, которая образует тип *dwarf* 1 (на 20-й день после появления всходов, в возрасте двух листьев). Совпадают также сроки наступления фенокритической фазы у простого гибрида Пуза 12Хсубкерманшахи и той части растений сложного гибрида F_1 (КанберраХсубкерманшахи)ХПуза 12, которая образует тип *dwarf* 2 (на 24–32-й день после появления всходов, в фазе полного кушения). Таким образом, подтверждается наличие сильного аллеля гена D_1 у сорта Канберра (D_1^1) и слабого его аллеля у образца субкерманшахи (D_1^*).

Выявление только одного срока проявления фенокритической фазы у другого сложного гибрида, F_1 (ВандиллаХсубкерманшахи)ХПуза 12, и образование одного типа карликовых растений (*dwarf* 2) говорят о наличии одинаковых аллелей гена D_1 (D_1^*) у сорта Вандилла и образца субкерманшахи. Этот гибрид, в свою очередь, может служить дополнительным контролем для гибрида F_1 (КанберраХсубкерманшахи)ХПуза 12, у которого обнаружены два срока фенокритической фазы

и соответственно выделены два фенотипически различных типа карликовых растений.

Результаты изучения сложного гибрида F_1 (Калининская 11 $\times$ Кубанская 122) $\times$ Фриско свидетельствуют о наличии множественных аллелей гена D_2 . В этом случае теоретически ожидается возникновение летальных растений *dwarf 1*. Однако в течение вегетационного периода нами были обнаружены два типа гибридных растений. Часть их в соответствии с теоретически ожидаемым результатом образовала *dwarf 1* и погибла на 20—25-й день после появления всходов в фазе кушения. Остальные растения в течение вегетации вступили в фазу колошения и к 86-му дню после появления всходов проявили продуктивный фенотип *dwarf 2*. Такое расщепление сложного гибрида F_1 (Калининская 11 $\times$ Кубанская 122) $\times$ Фриско говорит о наличии сильного аллеля гена D_2 у сорта Калининская 11 и его сверхслабого аллеля у сорта Кубанская 122, о чем свидетельствуют соответствующие простые гибриды. Однообразие гибридных растений (*dwarf 1*) и один срок проявления эффективной летальной фазы у сложного гибрида F_1 (Горицкая местная $\times$ Московская 2460) $\times$ Фриско и их соответствующих простых гибридов подтвердили наличие одинаковых аллелей гена $D_2(D_2^*)$ у сортов Горицкая местная и Московская 2460.

Анализ сложных гибридов F_1 (Пуза 12 $\times$ Здзиславка) $\times$ Канберра и F_1 (Здзиславка $\times$ РПГ 49/49) $\times$ Канберра показал, что сорта Пуза 12 и Здзиславка имеют разные аллели генов $D_2D_3Th_2$ (s и ms-m соответственно), в то время как сорта РПГ 49/49 и Здзиславка являются носителями одних и тех же аллелей (ms-m).

Для подтверждения или отрицания наличия множественных аллелей у сортов с генами $D_2D_3Th_2$ были изучены сложные гибриды F_1 (Асканийская 25 $\times$ Степячка 30) $\times$ Канберра и F_1 (Бельская 32 $\times$ Одесская 12) $\times$ Канберра. Теоретически у этих гибридов ожидается образование растений с фенотипом *dwarf 3*. Однако при анализе сложного гибрида F_1 (Асканийская 25 $\times$ Степячка 30) $\times$ Канберра обнаружены два срока проявления фенокритической фазы и соответственно — две группы растений (с фенотипом *dwarf 2* и *dwarf 3*), что указывает на наличие разных по силе аллелей генов $D_2D_3Th_2$ у сортов Асканийская 25 (s) и Степячка 30 (w-wt). Сложный гибрид F_1 (Бельская 32 $\times$ Одесская 12) $\times$ Канберра отличался однообразием гибридных растений (*dwarf 3*) и имел один срок проявления первых признаков *h. dwarfness*. Эти факты подтвердили наличие одинаковых аллелей генов $D_2D_3Th_2$ (wt-w) у сортов Бельская 32 и Одесская 12.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о наличии серии множественных аллелей генов D_1 , D_2 и сочетания D_2D_1 (с Th_0 и Th_2), контролирующих явление гибридной карликовости.

Обобщая результаты исследований, можно прийти к следующему заключению:

при изучении F_1 простых и сложных гибридов с фенотипом гибридной карликовости обнаруживается одна и та же закономерность в отношении того или иного гена *h. dwarfness*. Исходя из этого, предлагаем в дальнейшем изучение множественных аллелей генов гибри-

ной карликовости у новых сортов пшеницы вести на уровне первого поколения простых гибридов. Это даст возможность сократить сроки исследования и тем самым повысить результативность работы;

сорта и образцы со слабыми и сверхслабыми аллелями генов D_1 (Вандилла, субкерманшахи) и $D_2D_3Tl_2$ (Степнячка 30, Бельцкая 32, Одесская 12) можно использовать в гибридизационных программах для получения продуктивных и мощных гибридов типа *dwarf* 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабаджанян Г. А., Саркисян Н. С., Казарян М. Х. Биолог. ж. Армении, 35, 12, 966—971, 1982.
2. Казарян М. Х. Тез. докл. XI респ. конф. молод. науч. сотр. и аспирантов. Груз. НИИЗ, 1981.

Институт земледелия Госагропрома Армянской ССР,
отдел селекции и генетики

Поступило 19.IX 1984 г.

УДК 576.35

ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ АКТИНОМИЦИНА-D НА КЛЕТКИ КОРЕШКОВ *CREPIS CAPILLARIS*

Е. Г. СИМОНЯН, Г. Г. ОГАНЕСЯН

Ключевые слова: актиномицин-D, митотическая активность, цитогенетический эффект.

Механизм действия актиномицинов был предметом исследования многих авторов [4—6]. Большинство их полагает, что актиномицин нарушает биосинтез РНК [9, 10]. Существует мнение об особой чувствительности к актиномицину р-РНК. В основе подавления актиномицином синтеза РНК лежит взаимодействие антибиотика с ДНК, в результате чего происходит как бы включение антибиотика в молекулу ДНК, препятствующее взаимодействию с ней РНК-полимеразы. В связи с нарушением синтеза РНК, вызываемым актиномицином, угнетается синтез белка [8].

В клетках корешков лука под влиянием актиномицина наблюдался митоденрессирующий эффект [3]. Высокие концентрации антибиотика вызывали массовую гибель клеток. Изучение взаимодействия актиномицина с другими химическими факторами показало, что кинетин является его прямым конкурентом и ослабляет антимитотический эффект актиномицина [1, 2].

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения воздействия различных доз и экспозиций актиномицина-D на митотическую активность меристематических клеток корешков *Crepis capillaris*.

Материал и методика. *Cr. capillaris*—растение семейства сложнопестичных—является удобным тест-объектом для цитогенетических исследований. Корешки *Cr. capillaris* обрабатывались актиномицином-D фирмы Reanal (Budapest, Hungary) трех кон-

центраций—1, 50 и 250 мкг/мл в течение 2, 6, 12 и 24 ч. Из фиксированного материала готовились давленные ацетокарминовые препараты. Подсчет митозов производился с регистрацией фаз клеточного деления (профаз, метафаз, анафаз, телофаз). Определяли процентное соотношение фаз клеточного деления и митотическую активность.

Результаты и обсуждение. Митотическая активность во всех опытных вариантах закономерно снижается с увеличением концентрации и продолжительности обработки (табл.).

Изменение митотической активности и частоты встречаемости фаз митоза в клетках корешков *Crepis capillaris* под воздействием различных концентраций актиномина-Д

Концентрация актиномина-Д мкг/мл	Время обра- ботки, ч	Кол-во про- смотренных клеток	Процент клеток, находящихся на стадии интерфазы (И), профазы (П), метафазы (М), анафазы (А), телофазы (Т)					Митотиче- ский индекс, %
			И%	П%	М%	А%	Т%	
1	2	10000	95.20	1.75	2.40	0.64	0.01	4.80±0.67
	6	10000	95.25	1.78	2.73	0.23	0.01	4.75±0.67
	12	10000	95.32	1.70	1.84	0.05	—	4.68±0.66
	24	10000	95.51	3.16	1.20	0.13	—	4.49±0.65
50	2	10000	95.41	2.12	1.77	0.70	—	4.59±0.66
	6	10000	96.59	1.95	1.12	0.30	0.03	3.41±0.57
	12	10000	97.54	1.39	1.02	0.05	—	2.46±0.48
	24	10000	96.23	1.26	0.46	0.04	0.01	1.77±0.41
250	2	10000	96.60	1.99	0.88	0.40	0.13	3.40±0.57
	6	10000	98.57	0.84	0.53	0.06	—	1.43±0.37
	12	10000	98.56	0.68	0.44	0.02	—	1.14±0.33
	24	10000	99.60	0.19	0.21	—	—	0.40±0.19
Конт- роль	2	10000	93.08	3.90	1.60	0.77	0.45	6.92±0.80
	6	10000	91.35	5.24	2.17	0.97	0.27	8.65±0.88
	12	10000	91.88	5.01	1.81	0.83	0.47	8.12±0.56
	24	10000	91.09	4.86	2.12	1.37	0.56	8.91±0.90

Особенно резкий спад начинается при 24-часовой обработке актиномином в концентрации 50 мкг/мл. Процент делящихся клеток при этом составляет 1.77 ± 0.41 , что примерно в 5 раз меньше, чем в контрольном варианте.

Концентрация 250 мкг/мл оказалась наиболее сильнодействующей. При 24-часовой обработке процент делящихся клеток в этом варианте составил 0.4 ± 0.19 , т. е. число митозов практически свелось к нулю. На препаратах отмечались единичные делящиеся клетки, находящиеся на стадии профазы и метафазы. Исчезновение анафаз и телофаз свидетельствует о полном метафазном блоке. Аналогичный летальный эффект под влиянием актиномина был отмечен и на клетках корешков лука, при этом после снятия действия ингибитора деления также не наблюдалось, что свидетельствует о необратимости происходящих процессов [3].

Если 24-часовая обработка актиномином в концентрации 250 мкг/мл вызывала полный метафазный блок, то во всех остальных вари-

антах наблюдалось частичное блокирование клеток на стадии метафазы. Вероятно, актиномицин каким-то образом нарушает анафазное расхождение хромосом к полюсам.

Заслуживает внимания чрезвычайно малое количество клеток, находящихся на стадии телофазы. Ровно в половине всех опытных вариантов на этой стадии нами не было зарегистрировано ни одной клетки.

Таким образом, одной из причин снижения митотической активности в клетках корешков *Cr. capillaris* следует считать исчезновение поздних фаз митоза — анафаз и телофаз.

Анализ встречаемости отдельных фаз митоза под воздействием актиномицина свидетельствует о том, что процент вступающих в профазу клеток во всех опытных вариантах значительно ниже, чем в контроле, и это позволяет предположить, что второй причиной подавления митотической активности является уменьшение числа клеток, вступающих в профазу, т. е. возникновение блока интерфазы—профазы. Существует мнение о том, что переходный от интерфазы к профазе период, или так называемый период «препрофазы», возможно, является одной из важных мишеней, на которую направлено антимитотическое действие [7].

Таким образом, антимитотический эффект актиномицина связан с торможением движения клеток по митотическому циклу на всех его этапах.

Была также отмечена способность актиномицина в концентрациях 1 и 50 мкг/мл вызывать появление полиплоидных клеток и метафаз, напоминающих метафазы, индуцированные колхицином. Это, по-видимому, связано с тем, что актиномицин повреждает хроматиновое перетяно или каким-то иным способом нарушает расхождение хромосом к полюсам, т. е. митотический аппарат клетки также является для него мишенью.

Наиболее активно полиплоидные метафазы индуцируются актиномицином концентрации 1 мкг/мл при экспозиции 2, 6, 24 ч, а также при 2-часовой обработке проростков антибиотиком в концентрации 50 мкг/мл.

Изредка встречающиеся хромосомные аномалии, в основном в виде фрагментов, не позволяют наделить использованные нами концентрации актиномицина мутагенными свойствами, так как частота встречаемости aberrантных клеток в опытных вариантах была не выше, чем в контроле.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баласанян Д. С. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1971.
2. Батикян Г. Г., Симонян Е. Г., Баласанян Д. С. Биолог. ж. Армении, 27, 4, 10—18, 1974.
3. Батикян Г. Г., Симонян Е. Г., Баласанян Д. С. Биолог. ж. Армении, 26, 10, 10—19, 1973.
4. Губенко И. С., Беляева Е. С., Цитология, 12, 5, 627—636, 1970.
5. Епифанова О. И. Цитология, 9, 9, 1967.
6. Кохибски Т., Ковшик-Гиндшор З., Курылович В. В кн.: Антибиотики, 1, 784—814, 1969.
7. Мэзия Л. Митоз и физиология клеточного деления. М., 1963.
8. Christensson Erik O. Acta protozool., 13, 21—22, 245—256, 1975.

9. Kutz E. and Pugh L. Appl. Microbiol., 9, 263, 1961.
01. Wheeler G. P., Bennett L. L. Biochem., Pharmacol., 11, 353, 1962.

Ереванский государственный университет,
кафедра генетики и цитологии

Поступило 7.11 1985 г.

УДК 547.992:547.913:547.918:547.915

ВЛИЯНИЕ ДИГЛЮКОЗИДА ДИГИДРОКУКУРБИТАЦИНА Д НА ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ МИКРОСОМ ПЕЧЕНИ КРЫС ПРИ СТРЕССЕ

М. А. ДАДАЯН, А. Г. ПАНОСЯН

Ключевые слова: стресс, кукурбитацины, перекисное окисление липидов, микросомы печени.

Известно, что при стрессе происходит резкая активация перекисного окисления липидов [2] с образованием свободных радикалов, оказывающих токсическое влияние на ткани в результате воздействия на структурную организацию биологических мембран, что, в свою очередь, приводит к функциональным изменениям гормональных и других регулирующих систем организма [5].

Некоторые из продуктов превращения гидроперекисей арахидоновой кислоты (лейкотриен В₄ и 14, 15-дигидроксиэйкозатетраеновая кислота) являются модуляторами образования супероксидаиона O₂ [10, 11], инициирующего дальнейшую цепь перекрестного окисления липидов [6, 8].

Ранее было показано, что 16 α, 20-дигидроксн-2 β, 25-ди-/β-D-глюкопиранозилокси-/кукурбитен-5-трион-3, 11, 22 (диглюкозид дигидрокукурбитацина Д, ДДКД), выделенный из корней *Bryonia alba* L. [3], повышает работоспособность мышей [4]. В настоящей работе нами изучено влияние ДДКД на липидную пероксидацию в микросомах печени крыс, подвергнутых стрессу.

Материал и методика. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах. Стресс вызывали однократной 2,5-часовой иммобилизацией крыс [7]. Животных делили на пять групп. Крысам двух групп ежедневно вводили по 0,5 мл растворителя (воды); остальным животным внутримышечно вводили по 0,5 мл водного раствора ДДКД в дозах 1; 0,1; 0,01 мг/кг массы в течение 14 дней. Затем крыс четырех групп подвергали иммобилизации, за исключением одной — контрольной. Сразу после иммобилизации их декапировали, извлекали печень и гомогенизировали в буферном растворе (4 mM трис-HCl, pH 7.4), содержащем 0.25 M сахарозу. Гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 15 мин, супернатант отделяли и центрифугировали при 100000 g в течение 1 часа. Осадок отмывали от сахарозы центрифугированием в буферном растворе (4 mM трис-HCl, pH 7.4) в течение 30—40 мин при 100000 g. Полученные микросомы ресуспендировали в среде инкубации (40 mM трис-HCl, pH 7.1). Белок определяли по методу Лоури [9].

Интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) в микросомах печени крыс определяли по реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК)—по выходу малонового диальдегида (МДА) [1].

Для определения интенсивности неферментативного окисления к пробам, содержащим 0,5—1 мг белка микросом и 12 мкМ феррицианида калия, добавляли аскорбиновую кислоту, и смесь, встряхивая, инкубировали в водяной бане при 37°C.

При определении интенсивности ПОЛ в ферментативной, НАДФ-Н специфичной цепи окисления Fe^{+2} вместо аскорбиновой кислоты использовали 1 мМ НАДФ-Н и 20 мМ пироглутата натрия. В обоих случаях общий объем инкубационной смеси был равен 1 мл. Для остановки реакций белок осаждали добавлением 1 мл 30%-ной трихлоруксусной кислоты, смесь центрифугировали при 8000 г в течение 20 мин, отбрасывали по 1 мл супернатанта, к которому добавляли 0,2 мл 0,6 М HCl и 0,8 мл 0,12 М ТБК. Растворы кипятили на водяной бане в течение 15 мин, охлаждали и измеряли оптическую плотность полученных образцов при 535 нм (СФ-16а).

В другой серии опытов ДДКД инкубировали с микросомами печени крыс, подвергнутых иммобилизации. Условия инкубации те же, концентрация ДДКД в инкубационной среде составляли 10^{-5} — 10^{-6} М. Контролем служила группа крыс, подвергнутых стрессу.

Результаты и обсуждение. Влияние ДДКД на ПОЛ *in vivo*. Как видно из рисунка (рис. 1а), уровень липидных перекисей в аскорбатзависимой системе окисления при стрессе повышается почти в 2 раза. При введении ДДКД в дозах 0,1 и 0,01 мг/кг массы наблюдается лишь незначительное по сравнению со стрессом уменьшение содержания перекисей липидов, в то время как введение 1 мг/кг массы приводит к уровню, близкому к контрольному.

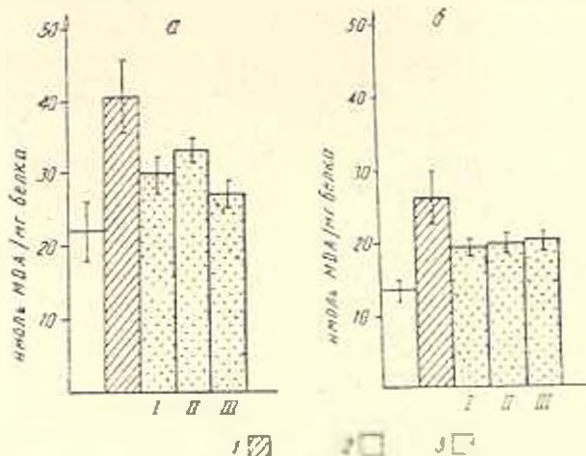


Рис. 1. Перекисное окисление липидов микросом печени крыс при введении ДДКД в дозах: I—0,01; II—0,1; III—1 мг/кг массы; а—аскорбатзависимое окисление, б—НАДФ-Н-зависимое окисление. 1—стресс, 2—контроль, 3—ДДКД.

На рис. 1б показано влияние ДДКД на свободнорадикальное окисление липидов в опытах с НАДФ-Н-зависимой системой окисления. При стрессе уровень липидных перекисей также повышался в два раза, в то время как у крыс, которым вводили ДДКД, он был значительно ниже при всех трех дозах.

Влияние ДДКД на ПОЛ *in vitro*. Как видно из рис. 2, ДДКД, начиная с концентрации 10^{-6} М, снижает уровень липидных перекисей в НАДФ-Н специфичной цепи окисления. В аскорбатзависимой системе окисления достоверных изменений при действии ДДКД не наблюдается.

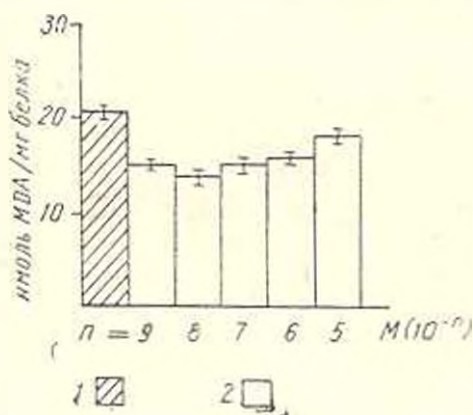
На основании полученных данных можно заключить, что введение крысам ДДКД в дозах 10^{-5} — 10^{-7} моль/кг при стрессе приводит к то-

му, что в микросомах печени животных липидная пероксидация протекает значительно менее интенсивно.

Антиоксидантное действие ДДКД связано с его ингибирующим влиянием на стадию зарождения процесса свободнорадикального окисления жирных кислот в микросомах печени, а именно на окисление Fe^{2+} .

Рис. 2. Влияние ДДКД на перекисное окисление липидов микросом печени крыс в НАДФ-Н-зависимой системе окисления *in vitro*.

1—контроль; 2—ДДКД.



в Fe^{2+} как ферментативным, так и неферментативным путем. Этот эффект при ферментативном пути окисления Fe^{2+} проявляется также в опытах *in vitro*, где ДДКД добавляли непосредственно к микросомам печени крыс, подвергнутых стрессу. В аскорбатзависимой же, неферментативной системе окисления *in vitro* ДДКД не действует.

Таким образом, ДДКД ингибирует ПОЛ в микросомах печени крыс при стрессе, действуя на ферментативную систему инициирования цепи окисления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. В кн.: Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М., 1972.
2. Меерсон Ф. З. В кн.: Адаптация, стресс, профилактика. М., 1981.
3. Паносян А. Г., Никищенко М. Н., Мнацаканян В. А., Садовская В. Т. Биорганическая химия, 5, 5, 721, 1979.
4. Паникян С. А., Паносян А. Г., Гаспарян Г. П., Джалаловичи Н. Г., Никищенко М. Н., Аветисян Г. М., Мнацаканян В. А. В сб.: Новые данные об эулеутококке и других адаптогенах. Владивосток, 1981.
5. Фридолин И. В кн.: Свободные радикалы в биологии. I. М., 1979.
6. Hornsby P. J., Crivello J. F. Mol. and Cell Endocrinol., 39, 2, 123, 198.
7. Kvetnansky R. K., Gewirtz G. P., Weise V. K., Kopin I. J. Endocrinol., 87, 7, 1323, 1970.
8. Logan M. K., Davies R. E. Lipids, 15, 6, 465, 1980.
9. Lowry O., Rosenbrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., 193, 2, 265, 1951.
10. Rudmark O., Serhan C., Hamberg M., Lundberg V., Ennis M. D., Runtz G. L., Oglesby T. D., Aristoff P. A., Harrison A. W. J. Biol. Chem., 259, 21, 13011, 1984.
11. Serhan C. N., Radin A., Smalen J., Korchak H. M., Samuelsson B., Weissman G. Biochem. Biophys. Res. Commun., 107, 1006, 1982.

ФЕРМЕНТЫ ПЕРЕАМИНИРОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ И ОЦЕНКЕ ЛЕЧЕНИЯ БРОНХОПНЕВМОНИИ

Г. С. ГРИГОРЯН, О. Э. НАГАСЯН, С. Н. МИНАСЯН

Ключевые слова трансаминазы, бронхопневмония.

Увеличение частоты заболеваемости бронхопневмонией сельскохозяйственных животных в последние годы диктует необходимость разработки четких критериев диагностики этого заболевания для своевременного назначения лечебных средств. Известно, что и ряде случаев воспалительный процесс в легких протекает вяло и малодоступен диагностике с помощью общепринятых клинико-лабораторных методов исследования.

В связи с этим возникает необходимость изыскания новых, общедоступных диагностических тестов.

Изменения активности ряда ферментных систем могут отражать динамику процесса, глубину метаболических расстройств, степень интоксикации, а выявление их позволит прогнозировать исход заболевания [1, 2]. Поэтому все большее значение приобретает изучение ферментативной активности сыворотки крови при поражении дыхательной системы у сельскохозяйственных животных. В этом плане большой интерес представляют ферменты переаминирования (аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза АсТ и АлТ. В то же время в отечественной литературе имеются лишь единичные сведения об изменении активности этих ферментов при некоторых заболеваниях легких [3, 5].

Цель работы заключалась в оценке возможности использования изменения активности аспартат- и аланинаминотрансферазы в целях профилактики, диагностики и терапии заболевания органов дыхания у мелкого рогатого скота.

Материал и методика. Опыты проводились на овцах в возрасте 6—7 месяцев. Животные обследовались до лечения, в период лечения и после выздоровления. Контролем служили здоровые животные того же возраста. Активность АсТ и АлТ изучалась в сыворотке крови, получаемой из яремной вены методом Райтмана, Френкеля [4]. В результате переаминирования, происходящего под действием аминотрансфераз, образуется пировиноградная кислота.

Активность указанных ферментов выражалась в ммоль/(ч. л.). Экспериментальные данные подвергались вариационно-статистической обработке [6].

Результаты и обсуждение. Установлена зависимость урона исследуемых ферментов от тяжести заболевания. Так, наиболее выраженные изменения активности аспартат- и аланинаминотрансферазы (на 15 и 30% соответственно по сравнению с контролем обнаружены до назначения комплексной терапии (табл.).

В период комплексного лечения активность указанных ферментов сравнительно снижается, в среднем на 10—12% в сравнении с контролем. После курса лечения этот показатель нормализуется.

Активность трансаминаз в сыворотке крови овец, больных бронхопневмонией, ммоль/ч. $\bar{x}$, $n=5$, $M \pm m$

Условия опыта	Контроль		Опыт	
	АсТ	АлТ	АсТ	АлТ
До лечения	0.19 ± 0.003	0.32 ± 0.0057	$0.24 \pm 0.006^*$	$0.37 \pm 0.0057^*$
В период лечения	0.185 ± 0.007	0.32 ± 0.0076	$0.21 \pm 0.006^*$	$0.36 \pm 0.0076^*$
После выздоровления	0.185 ± 0.005	0.33 ± 0.004	0.19 ± 0.002	0.34 ± 0.0057

* Различия статистически достоверно при $P < 0.05$.

Полученные результаты показывают, что у животных, больных бронхопневмонией, происходит выраженное повышение активности ферментов персаминирования в сыворотке крови.

Таким образом, изучение активности сывороточных аминотрансфераз у больных бронхопневмонией животных может служить информативным показателем при диагностике, оценке эффективности лечения, а также одним из критериев выздоровления.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамови С. С., Порохов Ф. Ф. Ветеринария, 3, 58—59, 1983.
2. Васильева Е. А. Клиническая биохимия сельскохозяйственных животных. М., 1982.
3. Коваленко Л. И. Ветеринария, 11, 57—59, 1982.
4. Колб В. Г., Камышков В. С. Справочник по клинической химии. Минск, 1982.
5. Писаренко Н. И., Соколов М. И. Бюлл. Всесоюз. научно-исслед. ин-та эксперим. ветеринарии, 47, 56—59, 1982.
6. Рекомендации по статистической обработке результатов экспериментальных исследований. М., 1965.

Ереванский зоотехническо-ветеринарный институт

Поступило 13 XI 1984 г.

ВЛИЯНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОКОРЕНЯЕМОСТЬ ЧЕРЕНКОВ ТРУДНОУКОРЕНЯЮЩИХСЯ СОРТОВ ВИНОГРАДА

М. М. САРКИСОВА, А. Э. ДЖЕРЕДЖИАН

Изучалось действие физиологически активных соединений (ФАС) на окореняемость черенков трудноукореняющихся, новых перспективных, комплексно-устойчивых сортов винограда селекции Армянского НИИ виноградарства, виноделия и плодоводства.

Установлено, что при помощи ФАС возможно облегчение укоренения черенков винограда новой селекции, в потомстве которых одним из родительских компонентов служил гмурский виноград. Наилучшими ФАС в этом отношении оказались индолилмасляная кислота и агростемин.

Разработка способов, облегчающих укоренение черенков, даст возможность ускорить размножение новых, дефицитных сортов, отвечающих требованиям неукрывного возделывания винограда в зонах с резко континентальным климатом Армении.

Установлено, что ФАС и сплотившаяся заготовка черенков в сочетании с благоприятными внешними факторами среды способствуют реализации всех потенциальных возможностей для образования корневой системы и надземной части растения. Такие растения отличаются высокой приживаемостью при пересадке на постоянное место.

14 с., табл. 2, ил. 6, библиогр. 13 назв.

*Институт виноградарства, виноделия и плодоводства,
Госагропрома Армянской ССР*

Поступило 15.III 1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНТИ, № 1526--В 86, от 5.III.1985 г.

УДК 581.19:634.8

АМИНОКИСЛОТЫ И БЕЛКИ В ВЕГЕТАТИВНЫХ ОРГАНАХ ГИБРИДОВ ВИНОГРАДА ПО ФАЗАМ ВЕГЕТАЦИИ

А. С. АНТОНЯН, С. А. МАРУТЯН

В настоящей работе приведены результаты изучения динамики аминокислот и фракций белков в вегетативных органах винограда по мере роста и развития гибридных растений, предпринятого с целью выявления закономерностей их изменения в зависимости от фаз вегетации, комбинации скрещивания и индивидуальных особенностей сеянцев.

Объектом исследования служили листья, побеги родительских сортов и гибридов. Экстракцию свободных аминокислот проводили 1%-ной уксусной кислотой. При экстракции белковых веществ особое внимание уделяли способу и режиму гомогенизации материала, полноте экстракции и очистке белков от фоллинположительных небелковых веществ для количественного определения по методу Лоури.

Результаты исследований показывают, что содержание свободных аминокислот в листьях гибридов различных комбинаций скрещивания с самого начала интенсивного роста и до конца формирования ягод носит неуклонно возрастающий характер и снижается в фазе физиологической зрелости ягод. В побегах большая часть растворимого комплекса белков приходится на щелочерастворимую фракцию (57—66%), затем следуют водорастворимые (20—28%) и спирторастворимые белки (10—15%). Сеянцы 1509/51, 1509/53 и 1509/58 отличаются от остальных высокой концентрацией щелочерастворимой фракции белков.

Полученная нами информация позволила создать индивидуальные характеристики наиболее перспективных гибридов по широкой номенклатуре биохимических признаков. В этом аспекте новые селекционные сорта Арм. НИИВВиП Кармирени, Карни, Меграбуйр, Мерканзан, Димацкуп, Неркарат представляют особый интерес как комплексно-устойчивые (к морозам, мильдю и серой гнили) для неукрывного возделывания в условиях укрытой зоны виноградарства Армении, а также с точки зрения поиска форм с высокоактивным обменом аминокислот и белков форм, обладающих большими потенциальными биохимическими возможностями.

Б с., табл. 1, библиогр. 8 назв.

Институт виноградарства, виноделия и плодородства
Госагропрома Армянской ССР

Поступило 1 VIII 1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ, № 1065—В 86 от 14.11.1985 г.

УДК 631.461.1:632.954.634(479.25)

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ГЕРБИЦИДОВ НА ПОЧВЕННУЮ МИКРОФЛОРУ ПЛОДОВЫХ САДОВ АРАРАТСКОЙ РАВНИНЫ АРМЯНСКОЙ ССР

Э. А. АКОЛЯН, А. А. КАЛАНТАРОВ, М. А. СЕВУМЯН, М. Ж. АВЕТИСЯН

Изучалось действие линурона (10 кг/га) и чередующегося применения линурона (10 кг/га) и далапона (17 кг/га) в течение 3-х лет на микробиологическую активность почв персикового и яблоневых садов Араратской равнины.

Установлено, что линурон не оказывает заметного ингибирующего влияния на интенсивность микробиологических процессов в почве персиковых и яблоневых садов и активизирует жизнедеятельность аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов и азгобактера.

Изучение динамики роста микроорганизмов на 5-, 3-й и 45-й дни

после опрыскивания линуроном показало, что на 5-й день численность микроорганизмов на МПА и бактерий несколько снижается; на 30-й день отмечена тенденция к восстановлению численности почвенной микрофлоры, а на 45-й—к активации ее по сравнению с контролем.

Чередование линуропа и далапона в персиковом саду незначительно ингибирует жизнедеятельность микроорганизмов на МПА, бактерий и грибов и активирует жизнедеятельность актиномицетов, спороспособных бактерий, аэробных целлюлозоразрушающих микроорганизмов и азотобактера. Применение линуропа и чередование линуропа с далапоном в персиковом и яблоневом садах оказывает незначительное подавляющее влияние на интенсивность процесса накопления нитратов в почве.

Таким образом, систематическое трехлетнее применение линуропа и чередование линуропа и далапона незначительно и кратковременно ингибируют микробиологическую активность почв садов.

7 с., табл. 2, ил. 3, библиогр. 5 назв.

*Институт виноградарства, виноделия и плодоводства
Госагропрома Армянской ССР*

Поступило 9.X 1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ, № 1060—5 86, от 13.II.1986 г.

УДК 579.68

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ И ВИДОВОЙ СОСТАВ АММОНИФИКАТОРОВ В ВОДЕ И ГРУНТАХ ОЗЕРА СЕВАН

В. Г. НИКОГОСЯН

Изучены распространенность, сезонная динамика и видовой состав микроорганизмов, минерализующих органические вещества, и аммонификаторов, участвующих в процессах круговорота азота в оз. Севан.

Объектом исследований явились 80 образцов воды и грунта оз. Севан, взятых в 1982—1983 гг. из различных глубин и участков озера. Из выделенных культур для исследований отобрано 50 культур микроорганизмов, участвующих в процессах круговорота азота.

Количество микроорганизмов на среде МПА и ПВ (пептонная вода) определяли чашечным методом и методом титров. В последнем случае учет проводили по таблице Мак-Креди. Бактерии идентифицировали по определителю Берги. Для сравнения наших результатов с данными Гамбаряна, в некоторых случаях использовали также определитель Красильникова.

Установлено, что число аммонификаторов в воде колеблется в пределах 20—4000 клеток в 1 мл, а в донных отложениях—1000—320000 клеток в 1 г влажного грунта. По сравнению с периодом опускания уровня воды число аммонификаторов в воде увеличилось почти в 4—5, а в грунтах—в 10 раз.

Увеличению количества микроорганизмов, минерализующих органические вещества, и аммонификаторов в оз. Севан способствовали интенсивное развитие фито- и зоопланктона, поступление органических веществ с притоками, повышение температуры, усиление циркуляции воды и т. д.

Выявлено, что в воде и донных отложениях оз. Севан распространены микроорганизмы, принадлежащие к видам *Bac. cereus var. mycoides*, *Bac. megaterium*, *Bac. circulans*, *Bac. pumilus*, *Bac. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus luteus*.

Такие виды микроорганизмов, как *Bac. circulans*, *Bac. pumilus*, *Bac. subtilis*, *Ps. fluorescens*, *Micr. luteus* в оз. Севан нами обнаружены впервые.

Исследования показали, что ряд микроорганизмов (*Bac. mycoides*, *Bac. megaterium*), обнаруженных Гамбаряном в период опускания уровня воды, встречается и в настоящее время. Однако некоторые виды, такие как *Bac. putrificus*, *Micr. albidus*, *Ps. pyocyanea*, *Ps. liquefaciens*, *Mycobact. flavum* и т. д., описанные ранее (по определителю Красильникова), нам не удалось обнаружить.

Резюмируя изложенное, следует отметить, что в связи со спуском уровня воды оз. Севан и изменением его режима значительно изменился также количественный и качественный состав микроорганизмов, минерализующих органические вещества, и аммонификаторов.

11 с., табл. 3, библиогр. 19 назв.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 12.VI 1981 г.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 3.III 86 г.

УДК 577.154

БИОСИНТЕЗ БЕТА-ФРУКТОФУРАНОЗИДАЗЫ, БЕЛКА, ПИГМЕНТА И ПУЛЛУЛАНА В ПРОЦЕССЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *AUREOBASIDIUM PULLULANS* НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ АЗОТА

Е. Р. АЛЕКСАНИН, А. А. ХАЧАТУРЯН, Л. С. МАРКОСЯН

Одним из важных компонентов питательной среды, имеющих определенное значение в регулировании процессов синтеза ферментов, являются источники азота. Однако в литературе почти отсутствуют данные относительно влияния их на биосинтез бета-фруктофуранозидазы, что явилось предметом наших исследований.

В качестве источников азота были использованы неорганические соли (сульфат аммония, нитраты калия, натрия и аммония) и органические соединения (пептон и гидролизат казеина).

Установлено, что наилучшими источниками азота для синтеза фермента служат его окисленные формы—нитраты калия и натрия. Между

процессами синтеза фермента и биомассы наблюдалась в определенном смысле корреляция, которая, однако, выражалась не в закономерности их накопления, а в степени стимулирования синтеза тем или иным источником, особенно заметного на седьмые сутки роста. Так, нитраты калия, натрия и аммония, обеспечивающие синтез практически одинакового наибольшего количества бета-фруктофуранозидазы, лучше усваивались микроорганизмом, в то время как при использовании органических источников азота уровень накопления как фермента, так и биомассы заметно снижался.

Наиболее интенсивный синтез пуллулана (33,7 мг/мл) наблюдался на среде с ионами аммония, тогда как при органических источниках азота его содержание составляло всего лишь 1,3–1,9 мг/мл.

Между возрастанием количества пуллулана и снижением pH культуральной жидкости отмечалась четкая корреляция. Самое низкое значение pH зафиксировано в варианте с сульфатом аммония.

Ионы аммония играли важную роль не только в синтезе пуллулана, но и в пигментообразовании: среди неорганических соединений сульфат аммония оказался наилучшим стимулятором меланинообразования. Однако наиболее активно данный процесс протекал при использовании органического азота.

В процессе роста и развития культуры наблюдалось постепенное возрастание концентрации внеклеточного белка в культуральной жидкости независимо от источника азота.

Таким образом, исследования показали, что направленность метаболизма клеток *A. pullulans* в значительной степени зависит от источника азота. Как органические, так и неорганические соединения, равноценные по содержанию азота, по-разному способствуют синтезу бета-фруктофуранозидазы, пигмента, белка, пуллулана и изменению pH среды.

Для достижения максимального синтеза фермента культивирование необходимо проводить на средах с окисленными формами азота, а пуллулана — с восстановленными.

11 с., табл. 5, ил. 1, библиогр. 12 назв.

Институт микробиологии АН Армянской ССР

Поступило 2.VIII 1984 г.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ, № 1596—В 86 от 7.III 1984 г.

УДК 616.36+616.411+616.33.577

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В ОРГАНАХ И ТКАНЯХ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ КУРСА МИНЕРАЛЬНОЙ ВОДЫ «АРЗНИ»

Р. С. ЭМИНЯН, З. А. САРКИСЯН, Р. А. ГРИГОРЯН, М. А. ДАВТЯН

Высокая биологическая активность некоторых макро- и микроэлементов в функционировании живых организмов предопределяет важность и намечает новые аспекты в изучении механизма действия минеральных вод.

В этом плане представляет большой теоретический и практический интерес одновременное изучение сдвигов в содержании микроэлементов в различных органах и тканях организма (кровь, сердце, мозг, кожа, мышцы), под влиянием курса внутреннего приема углекислой (CO_2 —1,2), среднеминерализованной (M —8,3 г/л), слабокислой (pH —6,8), холодной (T —21°), хлоридной гидрокарбонатной натриевой кремнистой бор-содержащей минеральной воды Арзни.

В опытах на белых крысах показано, что под влиянием курса питья минеральной воды «Арзни» происходят всасывание, появление, накопление, перераспределение определенных макро- и микроэлементов минеральной воды «Арзни» в вышеотмеченных органах.

Результаты спектрохимических исследований показывают, что наряду со своеобразными сдвигами микроэлементного состава установлена определенная односторонненность изменения ряда микроэлементов в изучаемых органах: повышения кремния в крови, головном мозге, коже; железа в крови, сердце; фосфора—в мышцах, крови; серебра—в мозге, легких, мышцах, коже; появление молибдена в сердечной мышце, легких, коже; никеля в крови, сердце, легких, мышцах.

Полученные данные могут послужить обоснованием для использования минеральных вод при коррекции нарушенного баланса микроэлементов в организме при ряде заболеваний.

11 с., ил. 6, библиогр. 2 изв.

НИИ курортологии и физиологии им. А. А. Акопяна
МЗ Армянской ССР

Поступило 20.11.1985 г.

Полный текст статьи депонирован в ВИННИГН. № 1061—В 86, от 13.11.1986 г.

ОВАНЕС МНАЦАКАНОВИЧ АВАКЯН

16 января 1986 г. на 56-м году жизни скоропостижно скончался видный ученый-фармаколог, член Президиума Всесоюзного общества фармакологов, заведующий лабораторией адренергических механизмов Института тонкой органической химии АН АрмССР доктор медицинских наук Ованес Мнацаканович Авакян.

О. М. Авакян родился в 1929 г., в г. Багьете (ныне Камо) АрмССР и семье служащего. Окончив в 1953 г. с отличием лечебно-профилактический факультет Ереванского медицинского института, он поступает в аспирантуру ИТОХ и командировается во ВНИХФИ, где под руководством крупнейшего фармаколога академика АМН СССР М. Д. Машковской выполняет кандидатскую диссертацию, успешно защищенную им в 1957 г. После окончания аспирантуры О. М. Авакян организовал в ИТОХ первую в стране лабораторию адренергических механизмов, которой он руководил до конца своей жизни.

О. М. Авакян был одним из ведущих специалистов страны в области фармакологии вегетативной нервной системы. В первый период научной деятельности им были проведены исследования по фармакологической регуляции парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, способствовавшие выявлению ряда высокоактивных холинотитических соединений.

В 1962 г. О. М. Авакян первым в стране приступил к систематическим исследованиям фармакологической регуляции адренергических процессов и выполнил ряд работ по химической регуляции высвобождения, рецепции и захвата норадреналина. Эти имеющие важное научно-прак-

тическое значение исследования легли в основу его докторской диссертации, которую он блестяще защитил в 1972 г. в Москве.

Значительны заслуги О. М. Авакяна в разработке методов исследования действия биологически активных веществ на вегетативную нервную систему. Созданные им оригинальные экспериментальные методы широко применяются во многих фармакологических лабораториях как нашей страны, так и за рубежом.

О. М. Авакян является автором 5 монографий и более 120 статей, опубликованных в советских и зарубежных специальных периодических изданиях; им получено 15 авторских свидетельств на изобретения. Результаты своих исследований О. М. Авакян неоднократно докладывал на самых представительных форумах фармакологов мира (в Швейцарии, Финляндии, Англии, СССР).

Член КПСС с 1952 г., О. М. Авакян неоднократно избирался секретарем партбюро и председателем профкома ИТОХ, в 1967—1970 гг. был заместителем директора института по науке и возглавлял научный семинар биологического отдела. Длительный период он читал курсы биологии в Ереванском государственном университете. О. М. Авакян являлся членом двух специализированных советов по присуждению ученых степеней.

Сыстая память об О. М. Авакяне, талантливом ученом, принципиальном коммунисте, человеке большого обаяния, истинном патриоте своей Родины, неутомимом труженике науки, всегда будет жить в сердцах его коллег.

