

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ
Հ Ա Ն Դ Ե Ս

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
Ж У Р Н А Л
АРМЕНИИ

Հայաստանի կենսաբանական հանգիստ հաստատություն է Հայկական ՍՍՀ Գիտությունների ակադեմիայի կողմից և ստեղծում է հոգևածներ բուսաբանության, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաքիմիայի, մանրէաբանության, գենետիկայի և րենանուր ու կիսառական կենսաբանության այլ բնագավառների վերաբերյալ հայերեն և ռուսերեն լեզուներով:

Տարեկան թույլ է տեսնում համարի 12 համար: Բաժանորդագրին է ճ Ե. 10 կ.: Բաժանորդագրությունն ընդունում է Արարկյանի թույլ բաժանմուններում:

Биологический журнал Армения — 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, подписная цена за год 8 руб. 10 коп. Подписки на журнал можно производить по всем отделениям Союзпечати.

Խմբագրական կոլեգիա՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ս. Մ. Ավագյան, Վ. Ն. Ավետիսյան, Հ. Գ. Բակրավազյան, Ա. Ե. Գալստյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ), Մ. Ա. Դավթյան, Ժ. Ի. Հակոբյան, Ն. Ս. Հարությունյան (պատասխանատու քարտուղար), Բ. Մ. Հարությունյան, Վ. Հ. Ղազարյան, Ս. Հ. Մովսիսյան:

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է. Գ. Աֆրիկյան (պատվավոր), Ն. Ն. Ակրամովսկի, Վ. Ե. Աղաբաբյան, Հ. Ս. Ավետիսյան, Գ. Ն. Բարսեղյան, Է. Ս. Դարբինյան, Ա. Ա. Դալստյան, Ա. Է. Բախտայան, Գ. Ա. Եսերյան, Ա. Գ. Կարապետյան, Մ. Գ. Հովհաննիսյան, Է. Է. Հովսեփյան, Է. Ս. Ղազարյան, Ա. Ա. Սարգսյան, Մ. Խ. Չալստյան, Գ. Ս. Պողոսյան:

Редакционная коллегия: Э. К. Африкян, (главный редактор), Ц. М. Авахян, В. Е. Аветисян, Ж. И. Акопян, Е. С. Арутюнян (ответственный секретарь), Г. М. Арутюнян, О. Г. Баклаваджян, А. Ш. Галстян (зам. главного редактора), М. А. Давтян, В. О. Казарян, К. Г. Карагезян, С. О. Мовсисян.

Редакционный совет: Э. К. Африкян (председатель), А. С. Аветян, В. Ш. Агабян, П. П. Акрамовский, Д. П. Бабян, Э. Ц. Габриелян, А. А. Гилоян, Л. С. Гамбарян, Г. К. Карапетян, А. А. Матевосян, М. Г. Оганесян, Л. Л. Осянян, К. С. Погосян, А. Л. Тухтаджян, П. А. Хуринян, М. Х. Чайлахян.

Հողվածներ

- [illegible]

СОДЕРЖАНИЕ

Статьи

- Тонян Г. А., Замарашва Г. В., Рудкова Л. А. Математическая модель при оценке результатов биотестирования состояния природной среды 261
- Труняк А. А. Роль поляк катина в жизнедеятельности бактерий 267
- Гаспарян А. В., Авакян Л. Г., Макарова Е. Н. Шугелин альфа-ам-лазы (циллирного происхождения) 275
- Набандян А. Д., Агаджанян К. Г., Сахьян Н. М. Азотфиксирующая активность различных видов клубеньковых бактерий 281
- Авакмянова Е. Н., Арутюнян С. А. Взаимодействие клубеньковых бактерий с оболочкой иолированных клеток корней пироза и люцерны 285
- Агаджанян А. Х. Изменения ферментивной активности пролина и регуляция их активности у фасолевого агронома *Anthoxanthum odoratum* Say 289
- Оганесян М. Г., Мшигарян Л. Т., Бегмова В. Н., Выходина Л. Л., Оганесян В. С. Реакция иммунофлюоресценции при моделировании трихомоноза у бесплодных супружеских пар 294

Обзоры и дискуссии

- Яблоков-Хмелевич С. М. «Фито-микробиология» 299

Краткие сообщения

- Агаджанян А. Г., Акопян Т. Н., Арутюнян А. М., Арутюнян А. А., Камрян Р. А., Карабашян Л. В. Оценка численности и морфологии 320
- Мшицкая С. Т. Гемолитическая активность у некоторых представителей семейства *Enterobacteriaceae* 323
- Мусхелишвили Э. Г., Степанян К. Р. Активность L-аспарагиназы и L-глутаминазы рибосомных мутантов *Escherichia coli* 325
- Бабаханян А. В., Бабаханян Ж. Р., Акопян Г. С. Бактерицидные свойства хлористых солей алкилперкарбонилметил-диметил (1-фенил)-2,3-дихлор-2-бутен-1) аммония 328
- Хачатурян В. Н., Татаросян В. Б. Получение моноокисленической культуры *Enlaimoeba moshkovskii* 330
- Никогосян Е. Е., Сафарян Г. Е. Физические свойства зерна сортов озимой мягкой пшеницы селекции АрмНИИЗ 331

Рефераты

- Нерсисян Ц. М., Гулян Э. А., Кочарян М. Г., Кеминян Г. П. Влияние кортизона на активность ферментов метаболизма адренолина и АМФ-деаминазы в некоторых органах крыс 334
- Наварро А. А., Степанян Т. А., Согоян Н. С. Гистологические сдвиги в органах белых мышей при применении витаминных 335
- Ервандян С. Г., Бегларян Н. П. Прохождение мекония у телят после воздействия инверселловой кислоты в М₁ 336
- Шакарян Г. А., Саян Т. К., Акопян Э. М. Микрофлора воздуха животноводческих ферм и ее чувствительность к антибиотикам 338
- Медоян А. А., Джанджандян А. Н., Агаронян Г. В. О токсикологическом исследовании полимерной клеевой композиции КЛМ-1 344
- Степанян Э. А. Биологический метод защиты плодовых культур от моль 345
- Балаян А. Т., Айджян Л. А., Нахичеван Р. Г. Влияние семерона на фракции азота в белокочанной капусте 346
- Мартиросян Э. В., Агаджанян Т. К., Марян Э. А. Об антимикробных свойствах эфирного масла культуры клеток гриба 347

Хроники

- Воспоминания о профессоре Н. Л. Беделяне (1874—1910) 348

Критика и библиография

- Поручик Г. В., Н. Г. Холодный. Избранные труды (гл. ред. К. М. Ситник). Киев, Наукова думка, 1982 г., 443 с. 349

CONTENTS

Articles

- Tonoyan G. A., Zamaraeva T. V., Rudkova A. A.* Mathematical Model during the Evaluation of Results of Biotesting of Natural Medium Condition . . . 261
- Trekounian A. A.* Role of Potassium Ions in the Vitality of Bacteria . . . 267
- Gasparian A. V., Avakian Z. G., Makarova E. N.* Study of Alfa-Amylase of Bacillar Origin . . . 275
- Nalbandian A. D., Agajonian K. G., Sayadian N. M.* Nitrogen Fixation Activity of Different Species of Nodule Bacteria . . . 280
- Avvakumova E. N., Harutunian S. H.* Interaction of Root Nodule Bacteria with Membrane of Isolated Cells of Pea and Alfalfa . . . 285
- Aghajanian A. Kh.* Isoenzymes of Enzymes of Proline Biosynthesis and Regulation of Their Activity in Haricot Beetle *Acanthoscelides obtectus* Say. . . 289
- Hovhannissian M. G., Miansarian L. T., Rednova V. N., Vakhnina T. E., Hovhannissian N. S.* Reaction of Immunofluorescence during Urinesexual Trichomoniasis in Sterile Matrimonial Pairs . . . 294

Review and Debate

- Yablokoff-Khnazorian S. M.* Phagobacteriomachia . . . 299

Short Communications

- Aghajanian A. G., Hakopian T. N., Arzumanyan A. M., Harutunian A. A., Karapetian R. A., Karabashian L. V.* Purification of Cistatines from Bull Brain . . . 320
- Mnatzakanov S. T.* Hemolytic Activity of Some Representatives of *Enterobacteriaceae* Family . . . 323
- Mugnetstan E. G., Stepanian K. R.* Activity of L-Asparaginase and L-Glutaminase of *Escherichia coli* Ribosome Mutants . . . 325
- Bubakhanian A. V., Babajan Gh. R., Hakopian G. S.* Study of Bactericidal Properties of Alkylloxycarbonimethyl-Dimethyl (4-Phenyl-oxi-2,3-Dichlorine-Butenyl) Ammonium Chlorides . . . 328
- Khachoyan V. I., Tutevsian V. B.* Receipt of *Entamoeba moshkovskii* Monoxenic Culture . . . 330
- Nicoghosian E. E., Safarian H. E.* Physical Qualities of Winter Soft Wheats-Cultivated in the Research Institute of Agriculture of the Armenian SSR. . . 331

Abstracts

- Nersisyan Ts. M., Gulyan A. A., Kocharian M. G., Kegishian G. P.* Influence of Cortisone on the Activity of Adenosine and AMP-Deaminase Metabolism Enzymes in Various Organs of Rats. . . 334
- Navasardian A. A., Stepanian L. A., Sughoyan I. S.* Histostructural Shifts in the White Mice Organs during Utilization of Ampicillin . . . 335
- Yervandian S. G., Egelarian N. P.* Passing of Meiosis in Tomato Having Undergone the Influence of Gibberellic Acid in M_1 . . . 336
- Shakarian G. A., Sevan T. K., Hakopian Z. M.* Microflora of the Air in Stock Houses and Its Sensitivity to Antibiotics . . . 336
- Aledotian A. A., Janjapantian A. N., Aharonian G. V., Pnizian E. A.* On the Toxicological-Hygienical Researches of Polymer Glue Composition KLM-1 . . . 338
- Ohantun E. A.* Biological Method of Protection of Fruit Cultures from Moniliosis . . . 339
- Belayan A. L., Adjemian L. H., Nazarian R. G.* Influence of Semeron on Nitrogen Fractions in Cabbage . . . 340
- Marshavina Z. V., Aslantska L. K., Maroyan E. A.* On the Antimicrobial Peculiarities of Ether Oil of Iris Cells Culture . . . 341

Chronics

- Memories about Professor I. L. Bedelian (1874—1940)* . . . 343

Critics and Bibliography

- Porutskii G. V., Il'f. I.* Холодный Избранные труды (Гл. ред. К. М. Сытник), Киев, Наукова думка, 1982, 443с. 345

ՀՈԴԿԱԾՆԵՐ · СТАТЬИ

Биол. ж. Армении, т. 40, № 4, 261—267, 1987

УДК 551.510.42

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ПРИ ОЦЕНКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ БИОТЕСТИРОВАНИЯ СОСТОЯНИЯ ПРИРОДНОЙ СРЕДЫ

Г. А. ТОНОЯН, Т. В. ЗАМАРАЕВА, А. А. РУДКОВА

Ереванский государственный университет, кафедра высшей математики, Лаборатория мониторинга природной среды и климата Госкомгидромета и АН СССР

Аннотация — Предложен метод математико-модельной обработки данных по биотестированию состояния природных сред, который применен к экотоксикологическим данным, полученным в ходе биотестирования состояния почв методом культивирования в водных экстрактах водоросли *Chlorella*. Получено удовлетворительное согласие экспериментальных результатов и теоретических модельных кривых.

Անոտացիա — Առաջարկված է բնական միջավայրի վիճակի նկատարող ապացույթների մշակման մաթեմատիկո-մոդելային մեթոդ, որը կիրառված է էկոթոքսիկոլոգիական ապացույթների նկատմամբ, որոնք ստացվել են հողերի փրճակի կենսաառնամակարման բեթաքցրում *Chlorella* ցրիմոնների ցրային լուծամզգլածրներում աճեցման մեթոդով: Ստացված է փորձնական արդյունքների և մոդելային տեսական կորերի գոհացուցիչ ներդաշնակություն:

Abstract — The method of mathematical-model treatment of data of natural medium condition biotesting, used for ecotoxicological data, obtained from biotesting of soils condition by the method of cultivation in water extracts of *Chlorella* water-plants has been proposed. A satisfying agreement of experimental results and theoretical model curves has been obtained.

Ключевые слова: моделирование; математическое; биотестирование; охрана природной среды.

Эмиссия загрязняющих веществ в окружающую среду, связанная с деятельностью многих промышленных и сельскохозяйственных предприятий, жизнью больших городов и функционированием транспортных коммуникаций, приводит к загрязнению не только их непосредственных окрестностей, но и к повышению регионального (а иногда и глобаль-

ного) фона загрязнения вследствие дальнего переноса загрязняющих веществ в атмосфере [1]. Речь идет прежде всего о таких веществах, как окислы серы и азота, тяжелые металлы, пестициды. Осаждение этих и ряда других веществ на подстилающую поверхность и закисление осадков приводит к загрязнению пресных вод и почв и нарушению в них естественных химического и биологического балансов.

Разнообразие загрязняющих веществ антропогенного происхождения имеет естественную тенденцию к нарастанию вследствие развития промышленных и сельскохозяйственных технологий. Уже сейчас ясно, что весьма трудно, а иногда и невозможно детально оценить масштабы и экологические последствия распространения в биосфере каждого из загрязняющих веществ в отдельности. Это привело к развитию комплексных методов биотестирования, позволяющих интегрально оценить «качество» природной среды, с точки зрения ее пригодности для протекания важных биогеохимических процессов. Здесь можно упомянуть методы оценки качества морских и пресных вод по гидробиологическим показателям [2, 4], методы биотестирования качества почв [6].

Традиционные методы биотестирования качества почв базировались прежде всего на их микробиологических характеристиках [5], были направлены на оценку протекания процессов деструкции органического вещества. В работе [3] предложено использовать альго-тест почвы для оценки экологического качества почвы в плане протекания там процессов первичного продуцирования. Изложим кратко суть этого метода в ходе описания такого типичного эксперимента.

Работу проводили на серых лесных почвах. Образцы проб отбирали из почвенных горизонтов A_1 , B и BC после удаления верхнего 2-сантиметрового слоя лесной подстилки. Горизонт A_1 (гумусово-аккумулятивный) имеет пенечно-серый цвет, формируется в верхней части почвы и содержит наибольшее количество органических (гумуса) и питательных веществ. В этом горизонте происходит распад и частичный вынос питательных веществ. Горизонт B (иллювиальный) — уплотненный, бурого цвета, горизонт, в котором частично откладываются вещества, вымываемые из верхних слоев. Горизонт BC — переход к материнской породе, светло-бурого цвета, слабо затронут почвообразовательными процессами.

Образцы проб усредняли методом конверта, высушивали до постоянного веса при 80° , измельчали в ступке и просеивали через сито с отверстиями в 1 мм. Почву экстрагировали дистиллированной водой в соотношении 1:10 при периодическом помешивании. В процессе экстракции определяли кислотность проб через 5 и 60 мин после начала. Экстракты отделяли от взвеси частиц фильтрованием в аппарате Куирна через нитроцеллюлозные фильтры «Синпор» с размером пор 0,3 мкм. pH почвенных экстрактов доводили 0,1 N KOH до 6.

Культивирование водорослей проводили в стерильных условиях в 50 мл почвенных экстрактов в колбах Эрленмейера на 100 мл с ватно-марлевыми пробками. Для опытов использовали бактериально и альгологически чистую культуру *Chlorella C-2*, полученную из коллекции водорослей Института физиологии растений АН СССР. Стерильности почвенных экстрактов достигали фильтрованием через стерильные фильтры «Millipore» с диаметром пор 0,3 мкм (фильтры «Millipore» и «Синпор» предварительно кипятили для удаления токсичных веществ).

Периодическое культивирование водорослей проводили при 26° и освещенности 5000 лк. Плотность засева составляла $4-6 \cdot 10^4$ кл/мл. Исходную культуру водорослей поддерживали в логарифмической фазе роста еженедельным пересевом на свежую 50%-ную среду Гамия. Состав среды (в г/л): $KNO_3-2,5$; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O-1,25$; $KH_2PO_4-0,625$; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O-0,0015$, микроэлементы (по Арноу) — 0,5 мл/л среды.

рН 6. Контролем к опытным пробам на почвенных экстрактах служили пробы, культивируемые в тех же условиях на 50%-ной среде Тамия. Об интенсивности роста культур судили по количеству клеток, определяемому на электронном счетчике клеток «Coulter counter» ежедневно в течение 1-7 дней (табл. 1).

Таблица 1. Рост культуры клеток *Chlorella* С-9 ($\ln N$ (1) в трех почвенных горизонтах в зависимости от времени ($[N] = 10^4$ кл/мл)

Дни	Контроль	Горизонты почвы		
		A ₁	B	BC
0	1.8	1.8	1.9	1.8
2	2.9	1.0	1.2	1.0
3	3.4	1.0	1.4	1.3
6	4.6	3.7	1.1	3.9
7	5.5	4.6	2.8	4.5
8	5.7	5.0	3.7	5.0
10	5.8	5.7	5.0	6.0

Как видно из данных табл. 1, характер роста культуры в почвенных вытяжках неодинаков и отличается от такового в контрольном эксперименте с искусственной средой. В то же время непосредственное использование этих величин для интерпретации указанных различий представляется неаглядным и неудобным.

Для унификации процедуры сравнительной оценки и последующей интерпретации результатов целесообразно использовать простейшую математическую модель роста культуры, включающую как влияние элементов питания, так и влияние суммы негативных факторов, присутствующих в среде и тормозящих рост культуры. Дадим сначала теоретическое описание такой простейшей модели.

Итак, пусть культура развивается в среде, насыщенность которой элементами питания характеризуется логарифмической скоростью роста культуры r . Тогда рост плотности культуры в среде, свободной от негативных ингредиентов, описывается уравнением:

$$\frac{N}{N} = r.$$

Всюду далее мы будем полагать, что $r > 0$, т. е. среда достаточно богата для воспроизводства культуры, $[N] = \text{кл/мл}$.

Механизм взаимодействия культуры с негативными ингредиентами среды (токсикантами) в данной модели сводится к следующему: снижение прироста и расчете на одну клетку предполагается пропорциональным массе упомянутых ингредиентов (P) в расчете на одну клетку, т. е. рост культуры описывается уравнением

$$\frac{N}{N} = r - \alpha \frac{P}{N}.$$

Здесь α — коэффициент пропорциональности, размерность его — $\frac{\text{кл}}{\text{мл} \cdot \text{сут}}$. Поток массы инактивируемых негативных ингредиентов I предполага-

ется равным с точностью до пропорциональности общему снижению прироста культуры:

$$I = \beta \left(\alpha \frac{P}{N} \right) N = \beta \alpha P,$$

где β — коэффициент пропорциональности, размерность его $\frac{\text{мг}}{\text{кл}}$. Исходя из этих предположений, можно составить уравнения, которым подчинены величины $N(t)$ и $P(t)$: $\dot{N} = rN - \alpha P$, $\dot{P} = -\beta \alpha P$.

Обозначим через $Q = \alpha P$ эффективную массу негативных ингредиентов среды, т. е. массу, выраженную в вызываемом ими мгновенном снижении прироста культуры. Размерность Q есть $\frac{\text{кл}}{\text{сут}}$, а также поло-

жим, что $\beta \alpha = \frac{1}{T} \cdot [T] = \text{сут.}$ Тогда последняя система уравнений приобретает вид:

$$\dot{N} = rN - Q,$$

$$\dot{Q} = -\frac{1}{T} Q.$$

Решая последнее уравнение $Q(t) = Q_0 e^{-\frac{t}{T}}$, мы получим одно уравнение для описания роста плотности культуры:

$$\dot{N}(t) = rN(t) - Q_0 e^{-\frac{t}{T}}, \quad (1)$$

где Q_0 — эффективная масса негативных ингредиентов среды в начале процесса биотестирования, а T имеет смысл характерного для них времени инактивации. Последнее уравнение имеет решение

$$N(t) = \left(N_0 - \frac{Q_0}{r + \frac{1}{T}} \right) e^{rt} + \frac{Q_0}{r + \frac{1}{T}} e^{-\frac{t}{T}},$$

представляющее собой смесь двух экспонент; N_0 — начальная плотность культуры.

В зависимости от параметров r , Q_0 и T решение $N(t)$ имеет три типа поведения:

1. $0 < Q_0 < rN_0$ — плотность $N(t)$ монотонно возрастает и асимптотически $\ln N(t) = rt + A$, где $A = \ln \left(N_0 - \frac{Q_0}{r + \frac{1}{T}} \right)$.

2. $rN_0 < Q_0 < \left(r + \frac{1}{T} \right) N_0$ — плотность $N(t)$ в течение некоторого времени убывает, а затем возрастает и асимптотически $\ln N(t) = rt$.

3. $Q_0 > \left(r + \frac{1}{T} \right) N_0$ — плотность $N(t)$ за конечное время становится равной нулю, культура погибает.

Схематически данные три типа поведения решений $N(t)$ изображены на рис. 1 (а, б, в).

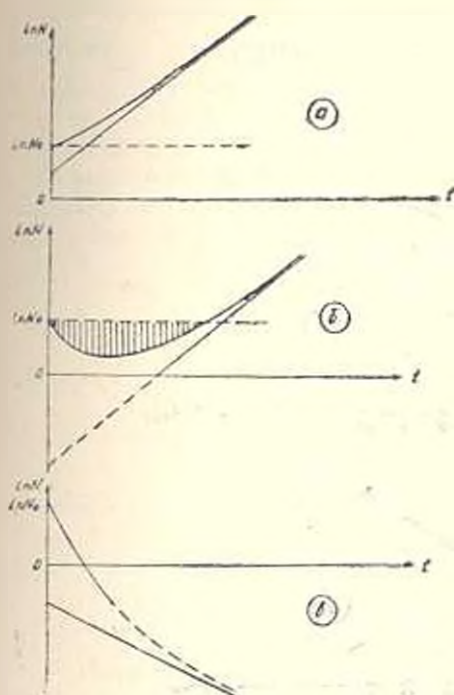


Рис. 1. Различные теоретические режимы изменения во времени плотности культуры: а) плотность $N(t)$ монотонно возрастает; б) плотность $N(t)$ в течение некоторого времени убывает, а затем возрастает; в) плотность $N(t)$ за конечное время становится равной нулю.

Эксперименты по биотестированию, проводимые по схеме, описанной выше, вполне укладываются в данную теоретическую модель. Нужно лишь уточнить одну деталь. Реальное значение показателя r не является, вообще говоря, постоянным во времени. Оно флуктуирует в зависимости от текущих значений освещенности, которые испытывают некоторые естественные колебания. Однако r_c — значение показателя r для контрольного, синхронно проводимого эксперимента в искусственной среде, испытывает на себе эти колебания в такой же степени. Поэтому их влияние можно учесть, полагая, что для i -го интервала времени между измерениями плотности

$$r_i = r_{ic} + a,$$

где r_{ic} — логарифмическая скорость роста плотности культуры в контроле на i -м интервале, r — соответствующий параметр в опыте, а a — поправка, зависящая от различий между искусственной средой и вытяжкой в насыщенности элементами питания. В рамках этого предположения рост культуры в опыте в $i+1$ -м интервале времени между измерениями плотности можно описывать уравнением (1), причем параметры a , Q_0 и T будут характеризовать рост культуры в опыте на протяжении всего эксперимента.

Для примера мы провели оценку параметров a , Q_0 , T по данным табл. 1 с использованием уравнения (1) методом наименьших квадратов (для логарифмического масштаба плотностей). Соответствующий алгоритм был реализован на ЭВМ СМ-4. Результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2.

Удовлетворительное качественное и количественное сходство экспериментальных данных и теоретических оценок указывает на то, что предложенная простейшая математическая модель в основных чертах правильно отражает процессы воспроизводства культуры и торможения роста вследствие действия негативных факторов среды.

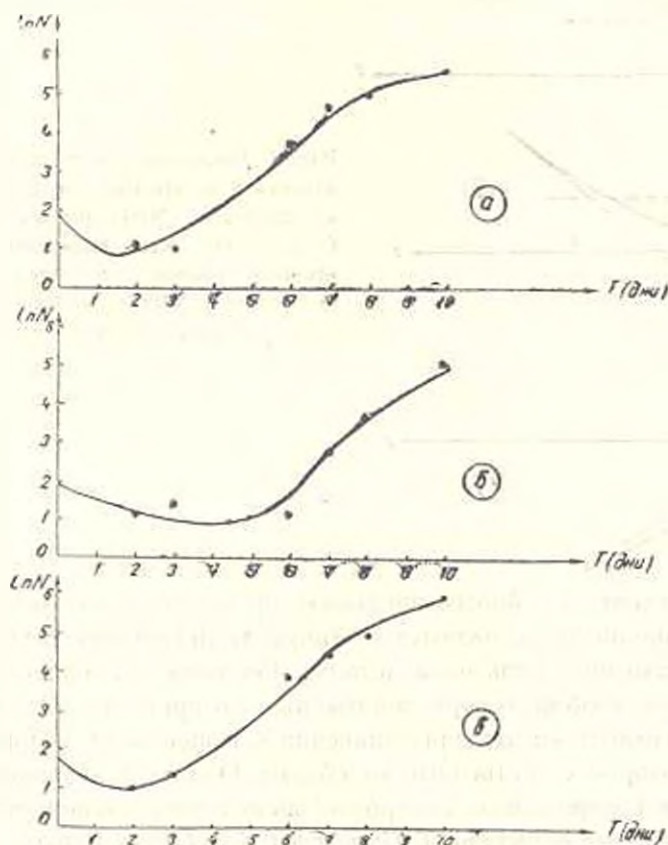


Рис. 2. Рост культуры водоросли в трех почвенных горизонтах. Теоретическая кривая — сплошная линия, экспериментальные данные — точки ($[N] = 10^4$ кл./мл). а) рост культуры водоросли в горизонте почвы A_1 ; б) рост культуры водоросли в горизонте почвы В; в) рост культуры водоросли в горизонте почвы ВС.

Таблица 2. Расчетные величины a , Q_0 , T в трех почвенных горизонтах

Горизонты почвы	a , сут $^{-1}$	Q_0 , $\frac{10^4 \text{ кл}}{\text{мл. сут}}$	T , сут
A_1	0.29	10.5	1.0
В	0.58	8.7	3.1
ВС	0.33	9.5	1.3

Предложенный математико-модельный метод обработки данных по биотестированию обладает достаточно широким диапазоном применимости и является перспективным для использования в экотоксикологических исследованиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Израэль Ю. А. Экология и контроль состояния природной среды. 375, Л., 1979.
2. Израэль Ю. А., Цыбаны А. В. Проблемы экологических последствий загрязнения океана. 58, Л., 1981.
3. Рудкова А. А. В кн.: Проблемы экологического мониторинга и моделирования экосистем. 7, 112—121, 1985.
4. Руководство по методам гидробиологического анализа поверхностных вод и донных отложений. Ред. В. А. Абакумова, 240, Л., 1983.
5. Ручко Р. В., Туня Н. А. В кн.: Микроорганизмы, их роль в плодородии почвы и охране окружающей среды. 16—26, М., 1985.
6. Штига Э. А., Голлербах М. М. В кн.: Проблемы и методы индикации почв. 75—85, М., 1980.

Поступило 3 I 1987 г.

Биол. ж. Арм. нц, т. 10, № 1, 267—275, 1987

УДК 577.352.315+3.05+21

РОЛЬ ИОНОВ КАЛИЯ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИИ

А. А. ТРЧУНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биофизики

Аннотация — Приведены данные о роли ионов калия в различных процессах жизнедеятельности бактерий, таких как рост клетки, поддержание тургорного давления, стабилизация трансмембранного градиента электрохимического потенциала H^+ ($\Delta\mu_{H^+}$), мембранный транспорт, регуляция активности ферментов, поддержание стабильности клеточных структур, биосинтез белка. Сделано заключение, что K^+ является основным внутриклеточным катионом, оказывающим большое и разнообразное влияние на функции клетки, важное для их направленной регуляции.

Անոտացիա — Բերված տվյալները բնօրինակների կենսաբանական թյան տարբեր պրոցեսներում K^+ զերի մասին, ախտի պրոցեսներում, ինչպիսիք են բջի ածր, տարրառային ձևի մե պահպանումը, $\Delta\mu_{H^+}$ -ի կայունացումը, մեմբրանային տրանսպորտը, ֆերմենտների ակտիվության կարգավորումը, բջի կառուցվածքների պահպանումը, սպիտակուցների կենսասինթեզը, թյուն և տալիս խոսել K^+ -ի որպես բջի ֆունկցիաներում մեծ ախտի մասին ցուցաբերող հիմնական ներբջի կատիոնի մասին, որը կարևոր է երանց եպոտակային կարգավորման համար:

Abstract—Data on the role of K^+ in different living processes of bacteria such as cell growth, osmoregulation, stabilization of $\Delta\mu_{H^+}$, membrane transport, regulation of enzyme activity, maintenance of cellular structures and protein biosynthesis point out that K^+ is the main intracellular cation having various and great importance in cells functions for its directed regulation.

Ключевые слова: внутриклеточное содержание K^+ , тургорное давление, $\Delta\mu_{H^+}$, мембранный транспорт, стабилизация бактерий.

Интерес исследователей к ионам калия не случаен, ведь все клетки предпочитительно накапливают K^+ и поддерживают их высокое распределение между клеткой и средой. Бактерии в этом отношении пред-

ставляют особый интерес. Прежде всего потому, что внутриклеточное содержание K^+ у них очень высокое и распределение K^+ между клеткой и средой может достигнуть значительных величин (табл. 1). К то-

Таблица 1. Внутриклеточное содержание K^+ у бактерий и одиночных клеток и распределение K^+ между клеткой и средой

Бактерии, клетки	Внутриклеточное содержание K^+ , мМ	Максимальное распределение K^+ между клеткой и средой	Литература
Эритроциты собаки	8		[27]
Эритроциты человека	130		[27]
Нитрифицирующие бактерии <i>Paracoccus denitrificans</i>	588—607	2.0×10^4	[12]
Грамположительные анаэробные бактерии <i>Streptococcus faecalis</i>	330—670	$17^4—10^5$	[29]
Грамотрицательные факультативно анаэробные бактерии <i>Escherichia coli</i>	850—1214	10^4	
анаэробно выращенные	270—430	2.5×10^3	
аэробно выращенные	257—500	$10^4—10^5$	[13, 27]

му же еще к началу 60-х гг. были получены мутанты *Escherichia coli* с дефектами в транспорте K^+ [27], что навело на мысль об участии белков-переносчиков в транспорте, накоплении в клетке и в поддержании высокого распределения K^+ . Наконец, K^+ играет важную роль в жизнедеятельности бактерий [3, 11, 13, 26, 27]. Высокое распределение K^+ между клеткой и средой у них приспособлено, по-видимому, к той роли, которую эти ионы играют в жизнедеятельности. И не случайно, количество работ, посвященных изучению этой области современной биофизики и биохимии прокариот, быстро увеличивается и в связи с этим нуждается в систематическом обобщении.

Рассмотрим роль K^+ в ряде процессов, связанных с функционированием мембраны, и в метаболизме бактерий.

K^+ и рост бактерий. Еще в 40-х гг. была установлена необходимость наличия K^+ для роста молочнокислых и других бактерий [26]. Было даже показано, что рост *Lactobacillus arabinosus* прямо зависит от содержания K^+ в среде: эти бактерии были предложены в качестве тест-организма для определения K^+ [26]. В дальнейшем было установлено, что рост и развитие *E. coli* [27], *Streptococcus faecalis* [23], *Paracoccus denitrificans* [12] возможны только при наличии K^+ в среде.

Необходимость K^+ для роста бактерий следует также из того, что содержание K^+ у них в логарифмической фазе роста значительно выше, чем в стационарной [27, 29]. Более того, внутриклеточное содержание K^+ , уменьшаемое по мере роста культуры, может быть восстановлено в логарифмической и ранней стационарной фазах [27]. При этом при перенесении клеток, находящихся в этих фазах роста, в свежую среду с источником энергии внутриклеточное содержание K^+ быстро возрастает: у акаэробно выращенных *E. coli* оно, например, увеличивается, по нашим данным, от 570 до 850—1214 мМ и у аэробно выращенных — от 200 до 360—430 мМ.

Содержание K^+ в среде определяет, по-видимому, время деления бактерий: например, для *P. denitrificans* при умеренной концентрации K^+ в среде (1–50 мМ) оно составляет 75 мин, при низкой (0,06 мМ) увеличивается до 95 мин и, наконец, при полной замене K^+ в среде на Na^+ или Rb^+ возрастает до 110 мин [12]. Интересно также то, что *Pseudomonas* поддерживают почти вдвое меньшую внутриклеточную концентрацию K^+ , чем *E. coli*, и время деления этих бактерий больше (110 мин), чем *E. coli* (60 мин) [27].

Таким образом, во многих случаях содержание K^+ в среде имеет важное значение для роста бактерий и должно быть учтено при культивировании микроорганизмов.

Роль K^+ в поддержании тургорного давления. Положительная разность между внутриклеточным осмотическим давлением и осмотическим давлением среды, называемая тургорным давлением, поддерживается у бактерий в основном благодаря накоплению K^+ внутри клетки.

Еще в 1948 г. было замечено, что плазмоллиз грамотрицательных *E. coli*, вызванный увеличением осмотического давления среды, или понижением тургорного давления, быстро реверсирует, если среда содержит K^+ и источник энергии; этот процесс сопровождается поглощением K^+ , подавляемым метаболическими ингибиторами [22]. Эти данные послужили основанием для допущения, что поддержание тургорного давления у бактерий происходит посредством активного поглощения K^+ . Позднее были получены данные, согласно которым при резком понижении тургорного давления у *E. coli* происходит быстрое и кратковременное возрастание скорости поглощения K^+ . Содержание K^+ в клетке увеличивается параллельно с повышением осмотического давления среды, возрастая от 150 мМ при осмотичности 80 мосМ до 600 мМ при осмотичности 1200 мосМ [11]. Было установлено, что количество поглощенного K^+ и время накопления его у этих бактерий возрастают с увеличением осмотичности среды [10], при этом включение механизма накопления K^+ имеет место при увеличении осмотичности среды на 150–300 мосМ [7, 10]. Полученные данные свидетельствуют как об осмочувствительности поглощения K^+ , так и о том, что K^+ внутри клетки находится в осмотически активном состоянии. Эти выводы были подтверждены при одновременной регистрации накопления K^+ с помощью ионоселективных электродов и деплазмолиза по преломлению светорассеяния клеточной суспензии [24].

Основную роль в осморегуляции бактерий играет конститутивная Trk (или Trk-подобная) система поглощения K^+ . Установлено, что скорость поглощения K^+ через эту систему у *E. coli* не зависит от осмотичности среды при значениях 200–600 мосМ, хотя количество поглощаемых ионов возрастает [25]. Более того, включение механизма Trk имеет место при увеличении осмотичности среды на 150–300 мосМ [7, 18]. Эти данные свидетельствуют, возможно, о том, что Trk система имеет регуляторный механизм, включающий ее в ответ на понижение тургорного давления. Предполагается, что понижение тургорного давления может оказать механическое воздействие на саму систему, изменить ее конформацию в мембране и увеличить ее активность [13, 25].

Однако это предположение не подтверждается полученными нами данными. Результаты наших исследований показали, что у анаэробно выращенных *E. coli* увеличение осмотичности среды включает и поглощение K^+ через Trk, и N,N-дициклогексилкарбодимид (ДЦКД)-чувствительную секрецию $2H^+$ через H^+ -АТФазный комплекс F_0F_1 [7, 18, 20]. Эти две транспортные системы образуют единый механизм (суперкомплекса), функционирующий как $H^+ - K^+$ -насос (рис. 1а), что подтверждается следующим: 1) поглощение K^+ через Trk систему подавляется с помощью ДЦКД [18]; 2) температурный коэффициент (Q_{10}) для транспорта обоих ионов через F_0F_1 и Trk одинаков и равен 2,8 [21]; 3) стехиометрия транспорта ионов через эти системы постоянна и равна $2H^+$ на один K^+ [18, 20]; 4) дефекты в F_0F_1 сказываются на поглощении K^+ через Trk и, наоборот, нарушение Trk отражается на работе F_0F_1 [20]; 5) обмен $2H^+$ на один K^+ может реверсировать с одновременным синтезом АТФ [19]; 6) распределение K^+ между клеткой и средой достигает больших величин и значительно превосходит измеренный мембранный потенциал ($\Delta\psi$) [21]. Наши данные о том, что осмочувствительность поглощения K^+ через Trk систему и секреции $2H^+$ через F_0F_1 исчезает у *unc*-мутантов *E. coli* с ДЦКД-резистентным F_0 [20] и у сферопластов этих бактерий, лишенных периплазматических белков [7], косвенно подтверждают другое предположение, согласно которому поглощение K^+ через Trk систему осуществляется посредством F_0F_1 с помощью периплазматического белка-клатана, открывающего и закрывающего вход F_0 в зависимости от увеличения или уменьшения осмотичности среды [16] (рис. 1а). Такое предположение подтверждает и то, что у грамположительных *Lactobacillus salivarius*

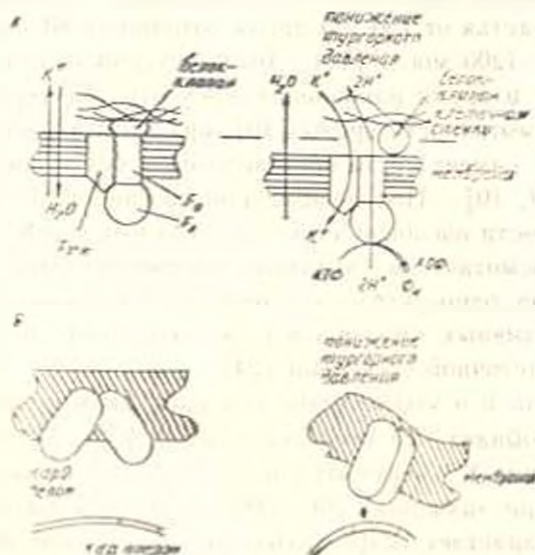


Рис. 1. Предполагаемые модели осморегуляции Trk (А) [16] и Kdp (Б) [13] систем поглощения K^+ у *E. coli*.

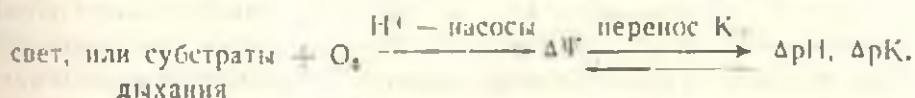
лишенных периплазматических белков, обмен $2H^+$ на один K^+ , по нашим данным, не проявляет осмочувствительности. Таким образом,

мы не исключаем возможности того, что осморегуляция Trk системы у анаэробно выращенных грамотрицательных бактерий может осуществляться с помощью периплазматического белка-клапана.

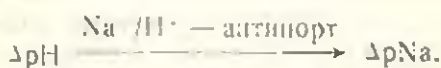
Другая, K^+ -зависимая Kdp система поглощения K^+ у бактерий также обладает осмочувствительностью [13, 25]. Предложена интересная и необычная модель осморегуляции этой системы [13] (рис. 1б). Постулируется, что механическое воздействие при понижении тургорного давления приводит к перестройке находящегося в мембране регуляторного kdpD белка, что служит сигналом для включения kdp оперона и синтеза компонентов этой системы, т. е. kdpD белок осуществляет как бы механогенетический контроль. Идентификация такого необычного мембранного белка представляет большой интерес.

Несомненно, что основная роль в осморегуляции у бактерий принадлежит механизмам транспорта K^+ . Вместе с тем, некоторые бактерии, например, *Bacillus subtilis*, не используют K^+ для осморегуляции [13]: в поддержании тургорного давления у них важную роль играют, по-видимому, другие растворимые вещества.

K^+ и стабилизация $\Delta\mu_{H^+}$. В 1978 г. Скулачев [5] выдвинул гипотезу о возможной роли трансмембранных градиентов K^+ и Na^+ как резервной формы энергии в стабилизации $\Delta\mu_{H^+}$ у бактерий. Предполагается, что поглощение K^+ приводит к переходу части накапливаемой в виде $\Delta\psi$ энергии при работе генераторов $\Delta\mu_{H^+}$ в форму трансмембранных градиентов pH (ΔpH) и K^+ (ΔpK). Энергия, затраченная на накопление K^+ , может быть использована для получения $\Delta\psi$:



Было постулировано также, что защелачивание pH внутри клетки, сопровождающее накопление K^+ , предотвращается включением Na^+/H^+ -антипортера, в результате чего энергия ΔpH преобразуется в энергию ΔpNa :



Гипотеза нашла подтверждение на многих бактериях. Полученные данные свидетельствовали, прежде всего, о поступлении K^+ в клетки, например, через Trk систему, электродиффузионным путем. Мы показали, что, во-первых, скорость поглощения K^+ через эту систему у анаэробно выращенных *E. coli* не зависит от температуры (Q_{10} равен 0.9—1.0), во-вторых, валиномицин увеличивает (или не изменяет) скорость поглощения K^+ и, в-третьих, распределение K^+ между клеткой и средой и, следовательно, катионный равновесный потенциал хорошо соответствуют измеренному $\Delta\psi$ (табл. 2), при этом мы допускаем, что Trk система лишь у анаэробно выращенных бактерий представляет собой K^+ -ионофор, использующий $\Delta\psi$ в качестве движущей силы для накопления K^+ в клетке [21]. Наши данные хорошо согласуются с моделью Бакке-

Таблица 2. Величины распределения K^+ между клеткой и средой, калиевого равновесного потенциала и измеренного $\Delta\psi$ у аэробно выращенных *E. coli* K-12 (λ).

Активность K^+ в среде, мМ	Распределение K^+ между клеткой и средой	Калиевый равновесный потенциал, мВ	$\Delta\psi$, мВ	Количество экспериментов
0.51 ± 0.05	721 ± 73	175 ± 2	109 ± 4	10
0.98 ± 0.03	426 ± 38	162 ± 3	100 ± 2	5

ра с соавт. [28]: $\Delta\mu_{H^+}$ запускает Trk систему и определяет скорость поглощения K^+ , а АТФ регулирует ее активность.

Описан Na^+H^+ -антипорт у различных бактерий [1]. Показано также, что градиенты K^+ и Na^+ могут быть использованы для осуществления таких $\Delta\mu_{H^+}$ -зависимых процессов, как движение бактерий и синтез АТФ. Теоретическое обоснование и экспериментальные доказательства буферной роли градиентов K^+ и Na^+ в энергетике бактерий даны в работе Драчева с соавт. [1].

K^+ и мембранный транспорт. В последние годы стали накапливаться данные, свидетельствующие об участии K^+ в транспорте веществ у бактерий. Показано, что K^+ может стимулировать транспорт сукцината у *E. coli* и *B. subtilis* [3], он необходим для транспорта фолата у *Lactobacillus casei* [14], аминоизобутирата у *Pseudomonas* и других бактерий [3]. Мы установили, что повышение активности K^+ в среде ускоряет образование и секрецию молочной кислоты из *E. coli* [17], выводимую как в нейтральной, так и в анионной форме в ответ на генерацию $\Delta\psi$ при работе H^+-K^+ -насоса, осуществляющего обмен $2H^+$ клетки на один K^+ среды (рис. 2). Показано также, что повышение концентрации K^+ в среде ускоряет секрецию глюкозилтрансферазы как из растущих, так и из покоящихся клеток *S. faeculis* [15].

K^+ может служить, во-первых, кофактором, создающим необходимую конформацию пермеазы; при этом в отношении роли K^+ в транспорте фолата у *L. casei* показано, что эти ионы увеличивают сродство фолатсвязывающего белка, участвующего в транспорте, к фолату, предполагается также, что этот белок содержит участки для связывания и фолата, и катиона [14]. Возможен также симпорт или антипорт K^+ с транспортируемым веществом по градиенту K^+ . Наконец, перенос K^+ может создать движущую силу, например, $\Delta\psi$, обеспечивающий транспорт того или иного вещества, что имеет место, как мы полагаем, при транспорте лактата [17].

Эти данные могут иметь большое значение для регуляции транспортных процессов у бактерий и полезны в биотехнологии.

Участие K^+ в метаболизме. Участие K^+ в метаболизме бактерий проявляется, по крайней мере, в активации ряда ферментов [2, 3, 9, 23] и поддержании стабильности таких функционально активных структур клетки, как рибосомы [6].

K^+ активирует многие ферменты, например, пируватфосфокиназу *Streptococcus mutans* [9] и других бактерий [2], дезаминазу *Cros-*

iridium, L-β-лизинмутаза *Clostridium sticklandii*, альдолазы, протеникиназы, рибонуклеазы многих бактерий [2, 3, 23]. При этом известно, что K^+ является кофактором пируватфосфокиназы [2, 9]; предполагается, что связывание K^+ вызывает конформационное изменение, и

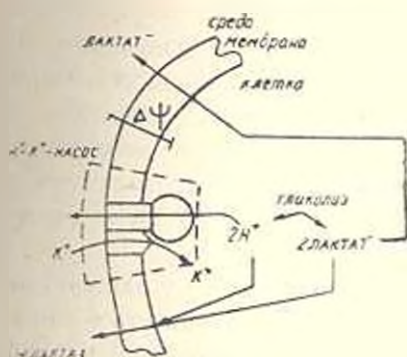


Рис. 2.

Рис. 2. Взаимосвязь между поглощением K^+ через H^+ — K^+ насос и секрецией лактата у *E. coli* [17].

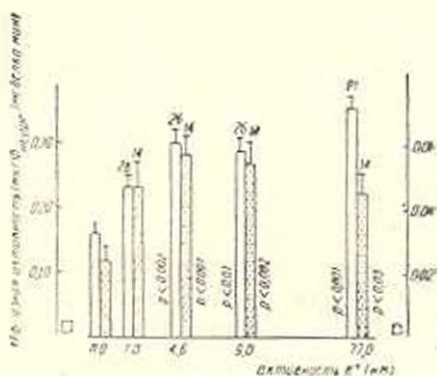


Рис. 3.

Рис. 3. Зависимость ДЦКД-чувствительной АТФазной активности протопластов анаэробно выращенных *E. coli* K-12 (■) и анаэробных *L. salivarius* (□) от содержания K^+ в среде. ДЦКД-чувствительная компонента АТФазной активности определена как разность активностей в отсутствие и в присутствии препарата в концентрации 10^{-4} М, реакционная среда содержала 3—5 мМ АТФ, 2,5 мМ сернистой кислоты, 1 мМ хлористого кальция, 50 мМ трис-НСИ-буфера, 5% сахарозы, pH 7,5, хлористый калий. АТФазная активность выражена в количестве высвобождаемого неорганического фосфора в единицу времени на мг белка. Отклонения даны как стандартные, в скобках указано, число экспериментов. p —критерий достоверности Стьюдента.

результате которого формируется третичная структура фермента, ответственная за его активность. Показано, что K^+ служит также кофактором РНКаз II, III, Р и Н, участвующих в посттранскрипционном контроле различных типов РНК, в том числе в образовании 16s-рРНК и формировании зрелых молекул тРНК у *E. coli* [6, 23].

Пучков с соавт. [4] предполагают прямое участие K^+ в регуляции гликолиза у бактерий. К такому выводу авторы пришли на основании того, что накопление K^+ у *E. coli* активирует гликолиз, при этом зависимость активации гликолиза от концентрации K^+ носит характер кривой с максимумом в области 100 мМ K^+ . Стимулирующее влияние K^+ на образование молочной кислоты показано у *S. faecalis* [29] и предполагалось нами [17]. Пучков с соавт. [4] полагают, что вероятной мишенью K^+ является фосфофруктокиназа, однако не исключается, видимо, и роль пируватфосфокиназы в такой активации.

В 1961 г. было показано, что АТФазная активность мембран *E. coli* при увеличении содержания K^+ в среде от 0 до 100 мМ возрастает на 22% [27]. В наших исследованиях обнаружена K^+ -зависимая ДЦКД-чувствительная АТФазная активность у *E. coli* и *L. salivarius* (рис. 3). Такая АТФазная активность наблюдается только у анаэробно выращен-

ных бактерий и только лишь при структурной целостности как F_0F_1 , так и Tgk системы поглощения K^+ , что является важным доказательством нашего предположения о структурном объединении F_0F_1 с Tgk в суперкомплексе, функционирующий как $H^+ - K^+$ насос [19—21]. Влияние K^+ на F_0F_1 может осуществляться через связанную с ним Tgk систему.

Роль K^+ в метаболизме хорошо прослеживается в зависимости количества синтезируемого валлина от активности K^+ у продуцентов [8].

Необходимость K^+ для биосинтеза белка обусловлена тем, что, во-первых, K^+ входит в состав рибосом, участвуя в формировании стабильных комплексов белков с рРНК [6]; во-вторых, от него зависят активация иминопетил-тРНК, связывание его с 30 S субъединицей рибосом и иРНК и перенос аминокислот с аминопетил-тРНК на синтезирующийся полипептид [6, 23].

В связи с тем, что внутриклеточное содержание K^+ у бактерий значительно выше 100 мМ (табл. 1), а максимальная активность некоторых ферментативных процессов наблюдается при концентрации K^+ около 100 мМ [4, 27], приходится допустить, что метаболические процессы в клетке протекают с меньшей интенсивностью, и в этом, по-видимому, важная особенность жизнедеятельности с ее многообразными общепедагогическими аспектами.

Таким образом, приведенные данные позволяют судить о K^+ как об основном внутриклеточном катионе, играющем важную роль в различных функциях бактерий (рис. 4). Дальнейшее изучение конкретных

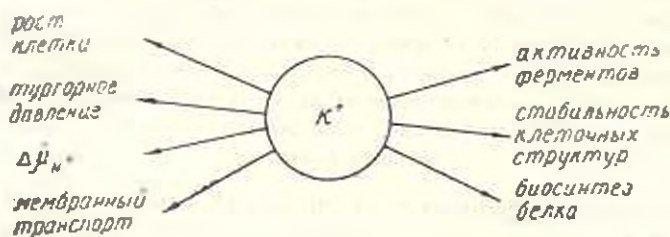


Рис. 4. Совокупность процессов жизнедеятельности, в которых играют важную роль ионы калия.

путей участия K^+ в процессах, связанных с функционированием мембраны, и в метаболизме бактерий представляется важным и эффективным и направленной регуляции жизнедеятельности клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Драчев А. М., Маркин В. С., Скулачев В. П. Биол. мембраны, 1, 453, 1984.
2. Неорганическая биохимия (под ред. Г. Эйхгорна), М., 1978.
3. Пучков Е. О. Повышение продуктивности бактерий с помощью избирательного варьирования состава внутриклеточных ионов. М., ОИТИ ТЭИМикробиопром, 2, 2, 1982.
4. Пучков Е. О., Косирев Н. В., Петухова Н. М. Биохимия, 47, 1522, 1982.
5. Скулачев В. П. Усп. совр. биол., 86, 358, 1978.
6. Спирин А. С., Гаврилова Л. А. Рибосома, М., 1971.
7. Третьяков А. А., Карагулян Э. А., Ванян Н. А. Биол. ж. Армения, 37, 836, 1984.
8. Хачатрян А. Ж., Дургарьян С. С., Мартirosyan С. М. Приказди. биохим. и микро-биол., 22, 554, 1986.

9. Abde K., Yamado T. J. Bacteriol., 149, 299, 1982.
10. Durgaryan S. S., Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 5, 554, 1978.
11. Epstein W., Schultz S. G. In: Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Form. Williams Wilkins, Baltimore, 1968, 186.
12. Erecinska M., Deutsch C. J., Davis J. S. J. Biol. Chem., 256, 278, 1981.
13. Helmer C. L., Laimins L. A., Epstein W. Membranes and Transp., Plenum Press, N. Y., London, 2, 123, 1982.
14. Henderson G. B., Potuznik S. J. Bacteriol., 150, 1098, 1982.
15. Markevics L. J., Jacques N. A. J. Bacteriol., 161, 989, 1985.
16. Martirosov S. M. Bioelectrochem. Bioenerg., 6, 315, 1979.
17. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Ibid., 8, 25, 1981.
18. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Ibid., 8, 597, 1981.
19. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Ibid., 9, 459, 1982.
20. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Ibid., 11, 29, 1983.
21. Martirosov S. M., Trchounian A. A. Ibid., 15, 417, 1986.
22. Orskov S. I. Acta Path. Microbiol. Scand., 25, 277, 1948.
23. Perry R. P. Annu. Rev. Biochem., 45, 605, 1976.
24. Puchkov E. O., Pinchukova V. A., Kosarev A. V. FEMS Microbiol. Lett., 13, 225, 1982.
25. Rhoads D. B., Epstein W. J. Gen. Physiol., 72, 283, 1978.
26. Rogosa M. J. Biol. Chem., 154, 307, 1944.
27. Solomon A. K. In: Proc. Intern. Biophys. Congress, Stockholm, 79, 1961.
28. Stewart L. M., Bakker E. P., Booth I. R. J. Gen. Microbiol., 131, 77, 1985.
29. Zarlengo M. H., Schultz S. G. Biochim. Biophys. Acta, 126, 308, 1966.

Поступило 25.IX 1986 г

Биолог. ж. Армении, т. 40, № 4, 275—280, 1987

УДК 577.154.3

ИЗУЧЕНИЕ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ БАЦИЛЛЯРНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

А. В. ГАСПАРЯН, З. Г. АВАКЯН, Е. И. МАКАРОВА

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация — Выделен новый штамм *Bacillus subtilis*, являющийся высокоактивным продуцентом альфа-амилазы (декстринолитическая активность—475,0 ед/мг белка, сахараживающая—31,2 ед/мг белка). Изучены морфологические свойства штамма и некоторые условия биосинтеза фермента.

Անոտացիա — Անջատվել է *Bacillus subtilis* նոր շտամ, որը ալֆա-ամիլազա և քարաքանակալի պրոդուցենտ է (դեքստրինոլիտիկ 475,0 մ/մգ սպիտակուց, շաքարաքանակալի 31,2 մ/մգ սպիտակուց)։ Ուսումնասիրվել են շտամի մարֆո-ֆիզիոլոգիական հատկությունները և ֆերմենտի լիոնիզելի որոշ պայմանները։

Abstract — A new strain of *Bacillus subtilis* has been isolated with a high activity production of alpha-amylase (dextrinolytic activity 475.0 u/mg protein, saccharifying activity 31.2 u/mg protein). Morpho-physiological properties and some conditions for biosynthesis of enzyme have been studied.

Среди многих продуцентов амилаз особое место занимает *Bacillus subtilis*, амилолитический комплекс которого имеет промышленное значение [1—3]. Широкое применение этих ферментов в народном хозяйстве диктует необходимость изыскания высокоактивных продуцентов, а также изучения и регулирования оптимальных условий биосинтеза, что и явилось целью настоящей работы.

Материал и методика. Объектом исследования служила культура *B. subtilis* (коллекция культур Института микробиологии АН АрмССР), выделенная в лаборатории спорообразующих бактерий.

Использовали следующие питательные среды: среда Раппа с соавт. [5], модифицированная измин среда Спенсер-Мартинс и Вэл-Удена [11], содержащие 1% крахмала. Последняя использовалась для изучения влияния источников азота и углерода на альфа-амилазную активность культуры. В качестве источника азота использовали аммонийные и нитратные соли, L-глутаминовую и L-аспарагиновую кислоты, L-метионин, мочевины и пептон, взятые в количестве, эквивалентном содержанию азота в сульфате аммония. В качестве источника углерода использовали крахмал, мальтозу, лактозу, фруктозу, глюкозу и маннит при содержании в среде 0.5% углерода.

Начальное значение pH сред 7.0.

Среды инокулировали односуточной культурой, выращенной на среде Раппа с соавт. [5], из расчета $4 \cdot 10^8$ клеток в мл культуральной среды.

Культивирование проводили в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера, содержащих 40 мл среды, на качалках (200 об/мин) при 30° в течение 60 часов. Для определения амилолитической активности, количества выросшей биомассы и pH пробы отбирали через каждые 24 часа.

Биомассу высушивали при 80° до постоянной массы.

Альфа-амилазу характеризовали по декстринирующей и осахаривающей активностям грубоочищенного фермента.

Декстринирующую активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [6]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее расщепление 1 г растворимого крахмала при степени его гидролиза 30% за 10 мин при pH 5.5 и температуре 50° и выражали в единицах активности на мг белка.

Осахаривающую активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [6], а редуцирующие вещества — Шомоды-Нельсона [8, 10]. За единицу активности принимали количество фермента, которое при pH 5.5 и температуре 50° катализирует образование из 1% крахмала 1 мг глюкозы за 1 час, и выражали в единицах активности на мг белка.

Альфа-амилазную активность изучали при pH 3.8—9.0 и температуре 30—80°.

Редуцирующие вещества в реакционной смеси определяли методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5), проявитель—раствор анилинфталата в водонасыщенном н-бутаноле.

Количество белка определяли по методу Лоури [7].

Результаты и обсуждение. *B. subtilis*—продуцент альфа-амилазы—представляет мезофильную аэробную спорообразующую подвижную грамположительную бактерию, палочковидные клетки которой расположены одиночно и короткими цепочками с эндоспорами в середине, которые не раздувают ее.

Усваивает глюкозу, фруктозу, мальтозу, сахарозу, рибозу, трегалозу, раффинозу, инулин, лимонную кислоту; образует каталазу, желатиназу; гидролизует крахмал, пептонизирует молоко, восстанавливает нитраты, усваивает цитрат натрия.

Не усваивает ксилозу, рамнозу, галактозу, сорбозу, целлобиозу, сорбит, дульцит, инулин, салицин, щавелевую, малеиновую и олеиновую кислоты.

Растет при 7%-ном NaCl и pH 5,7. Ростовым фактором является биотин.

С целью выявления корреляции между процессами роста и биосинтезом альфа-амилазы амилазную активность изучали в динамике роста культуры. Данные, представленные на рис. 1, свидетельствуют об отсутствии прямой зависимости между удельной скоростью роста организма и скоростью синтеза фермента, что согласуется с современными представлениями о закономерностях синтеза гидролитических ферментов микроорганизмами [12].

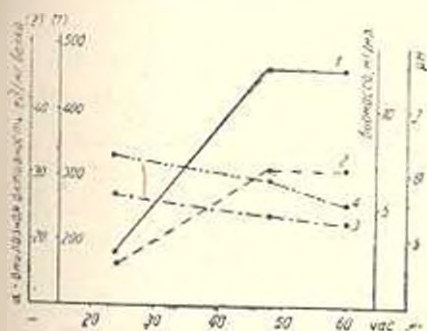


Рис. 1. Характеристики культуры *B. subtilis* в динамике роста. 1—декстринирующая активность, 2—осахаривающая активность, 3—биомасса, 4—pH.

Максимальная активность фермента достигается в конце стационарной фазы роста и составляет: 475,0 ед./мг белка—декстринирующая активность и 31,2 ед./мг белка—осахаривающая активность. Значение pH культуральной жидкости в это время снижается до 5,5—5,8. Максимальное количество биомассы (5,4 мг/мл) нарастает через 24 часа.

Хроматографический анализ показал, что в реакционной смеси происходит накопление лишь глюкозы, свидетельствующее о том, что изучаемый штамм является продуцентом альфа-амилазы, характеризующимся декстринирующей и осахаривающей активностями.

Из литературы известно, что для *B. subtilis* наиболее характерны амилазы, проявляющие максимальную активность при pH 5,5—6,3 и температуре 50—55° [1, 2]. Данные, полученные нами (рис. 2), свидетельствуют о достаточно высокой термостабильности полученного ферментного препарата. При температуре 50—60° альфа-амилазная активность практически не снижается, при температуре 70° остаточная декстринирующая активность составляет 55%, осахаривающая—25%, а при 80°—35 и менее 10% соответственно. Оптимальная температура каталитической активности 50—55°.

Опыты по изучению влияния pH на альфа-амилазную активность проводились в аналогичных условиях при температуре 50° и варьировании pH в пределах 3,8—9,0. Данные рис. 2 свидетельствуют о том, что оптимальное значение pH для обеих активностей находится в пределах 5,0—6,0. Высокая декстринирующая активность наблюдается и при pH 7,0, а при pH 9 обе активности резко снижаются. Характерно, что при

низких значениях pH альфа-амилазная активность находится на достаточно высоком уровне. Так, при pH 4,3 декстринирующая активность сохраняется на 50%-ном уровне, осажаривающая—на 25%-ном. На основании полученных данных можно заключить, что альфа-амилаза *B. subtilis* относится к кислотоустойчивым ферментам.

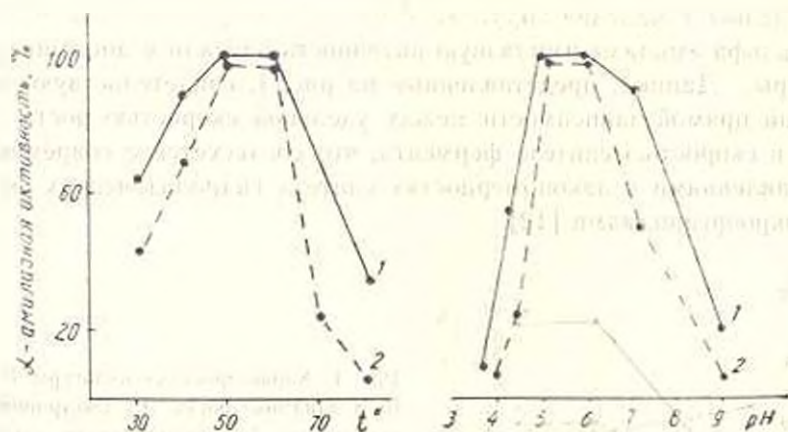


Рис. 2. Влияние температуры и pH на амилазную активность *B. subtilis*. 1—декстринирующая активность, 100% соответствует 180,0 ед/мг белка, 2—осажаривающая активность, 100% соответствует 16,26 ед/мг белка.

Влияние источников азота и углерода на альфа-амилазную активность *B. subtilis*

Источники азота и углерода	Альфа-амилазная активность, ед/мг белка	
	декстринирующая	осажаривающая
Источники азота		
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.0	4.069
NH ₄ Cl	62.0	5.96
NH ₄ NO ₃	67.2	6.28
KNO ₃	100.0	10.44
NaNO ₃	100.0	10.44
Глутаминовая кислота	112.0	11.71
Аспарагиновая кислота	133.0	9.93
Метионин	66.0	4.48
Мочевина	66.0	4.72
Пептон	150.0	17.0
Источники углерода		
Крахмал	180.0	14.52
Мальтоза	200.0	14.93
Глюкоза	54.0	5.48
Фруктоза	146.0	10.96
Сахароза	100.0	8.65
Лактоза	116.0	8.96
Манинит	74.0	4.48
Олеиновая кислота	0	0
Крахмал + олеиновая кислота, 0,2%	136.0	9.82

Известно, что для разных представителей рода *Bacillus*, в том числе и *B. subtilis*, наилучшими источниками азота являются пептон, аммонийные, нитратные соли, мочевина и некоторые аминокислоты, а источниками углерода—крахмал, мальтоза. На других углеводах уровень биосинтеза фермента низкий [4].

Данные таблицы показывают, что из неорганических источников азота наиболее эффективным в отношении проявления альфа-амилазной активности является нитратный азот, а из органических — пептон, глутаминовая и аспарагиновая кислоты.

Наиболее приемлемым источником углерода для биосинтеза фермента являются мальтоза и крахмал, что согласуется с данными литературы. Достаточно высокая активность проявляется и на средах с фруктозой, лактозой и сахарозой, а низкая — с глюкозой и маннитом.

В литературе имеются данные о том, что интенсивный синтез амилотических ферментов у микроорганизмов происходит в присутствии источников углерода, имеющих определенное строение. Так, он в 2—10 раз протекает интенсивнее, если в питательную среду внести 1—15% веществ с числом атомов углерода ≥ 12 , типа насыщенных высших жирных кислот и их эфиров [9]. У изучаемого штамма *B. subtilis* олеиновая кислота в качестве единственного источника углерода не используется, а в виде добавки (0,2%) в среде с крахмалом ингибирует активность фермента.

Известно, что синтез альфа-амилаз у большинства микроорганизмов, в том числе у спорообразующих бактерий, находится под контролем индукции и кatabолитной репрессии [4].

Данные о кatabолитной репрессии и индукции синтеза альфа-амилазы у *B. subtilis* представлены на рис. 3. Опыты проводили на среде Спенсер-Мартинс и Ван-Удена [11] с 0,5%-ным пептоном. В 10 мл среды вносили 3,5 мг посевной культуры и культивировали на качалке в

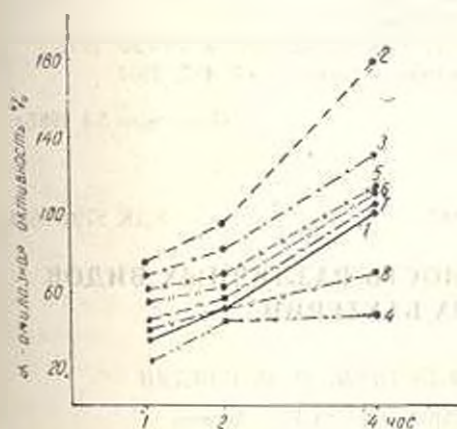


Рис. 3. Кatabолитная репрессия и индукция синтеза α -амилазы у *B. subtilis*, 100%, активность соответствует 10 ед/мл белка по декстринирующей активности на среде без источника углерода за 4 ч индукции. 1 — без источника углерода; 2 — крахмал; 3 — мальтоза; 4 — глюкоза; 5 — фруктоза; 6 — лактоза; 7 — сахароза; 8 — маннит.

течение 4 часов. В качестве индукторов использовали различные углеводы и маннит. Контролем служила та же среда без углеводов и маннита, что позволило определить индуцирование синтеза фермента последними.

Результаты проведенных опытов указывают на то, что альфа-амилазу *B. subtilis* можно считать конститутивным ферментом, так как достаточно высокая активность проявляется на среде без углеводов; 55% по сравнению с активностью на среде с крахмалом. Крахмал и мальтоза являются индукторами фермента и повышают его активность в 1,8—1,3 раза. Фруктоза, лактоза, сахароза по индуцирующей силе значительно уступают мальтозе и крахмалу. Глюкоза и ман-

пит репрессируют синтез фермента. Наиболее сильным репрессором является глюкоза, что согласуется с литературными данными. Репрессирующий эффект маннита проявляется через 4 ч инкубирования, тогда как в первые часы он оказывает слабиндуцирующее влияние.

B. subtilis в незначительной степени подвержен катаболитной репрессии, что делает данный продуцент альфа-амилазы весьма эффективным для практического использования.

Таким образом, изучаемый штамм *B. subtilis* является продуцентом альфа-амилазы (К. Ф. 3.2.1.1), характеризующейся декстринизирующей и осахаривающей активностями. Активность данного штамма находится на уровне или несколько превышает таковую известных продуцентов [1—3].

ЛИТЕРАТУРА

1. Авт. свид. СССР, № 841351А.
2. Авт. свид. СССР, № 1031681.
3. Глемжа А. А., Люджос Л. Л., Петрова Л. Н. Микробные ферменты в народном хозяйстве. 131, 132, 166, 170, Вильнюс, 1985.
4. Мурыгина В. П. Автореф. канд. дисс., М., 1985.
5. Рашап Р. К., Юшкайте Э. А., Глемжа А. А. Прикл. биохим. и микробиол., 2, 225—232, 1981.
6. Рухлядьева А. П., Полюгалова Г. В. Методы определения активности гидролитических ферментов. 58—62, 81—86, М., 1981.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall L. J. Biol. Chem., 193, 1, 265, 1951.
8. Nelson N. G. J. Biol. Chem., 53, 1, 375, 1944.
9. Patent Specification LO32, 199, 1965.
10. Somogyi M. A. J. Biol. Chem., 195, 1, 19, 1952.
11. Spencer-Martins J. and van-Vliet N. Eur. J. Appl. Microb., 4, 29—35, 1977.
12. Terui G., Okazaki M., Kinoshita S. J. Ferment. Technol., 45, 497, 1967.

Поступило 5.1 1987 г.

Микробиол. ж. Армения, т. 40, № 4, 280—285, 1987

УДК 579.61.631

АЗОТФИКСИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ

А. Д. НАЛБАНДЯН, К. Г. АГАДЖАНИН, И. М. САДЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация — Показано, что внесение в субстрат больших доз минерального азота (1,0 и 1,2 нормы) подавляет азотфиксирующую активность, эффективность и клубенькообразование у клубеньковых бактерий. Оптимальной дозой азота является 0,25 от полной нормы при 60%-ной влажности и pH почвы 7,2.

Азотфиксирующая активность и эффективность клубеньковых бактерий выше в фазе цветения растений.

Անոտացիա — Բացահայտված է, որ հանրային ազոտի 1,0 և 1,2 նորմաները (100,2 մգ համապատասխանաբար) ճնշում են պայարարակերիաների ազոտ ֆիքսելիս ակտիվությունը, ֆեկտիվությունը, պայարարաշրջումը և համարվում հանրային ազոտի լրիվ նորմայի 0,25 % (20,85 մգ), իդի խոնավություն 60 % և pH-7,2 պայմանները:

Գյուղատնտեսական ազոտ ֆերտիլիզատիվների և էֆեկտիվությունը
բարձր և բույսերի ազդեցան շրջանում:

Abstract — The high dosage of mineral nitrogen in substrata (83,5 and 100,2 mg of N per 1 kg of substratum) depresses nitrogen fixation activity, efficiency and nodule formation by Rhizobia.

The optimum dosage of nitrogen is 25 per cent to the normal, 60 per cent humidity and pH 7,2.

Nitrogen fixation activity and efficiency of nodule bacteria are higher in the phase of flowering.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, симбиотическая азотфиксация, азотфиксирующая активность, клубенькообразование.

Для изучения азотфиксирующей активности микроорганизмов, в том числе и клубеньковых бактерий, широко применяют ацетиленовый метод. С помощью этого метода в условиях симбиоза изучалась нитрогеназная активность клубеньковых бактерий люцерны, клевера с целью быстрого отбора эффективных штаммов [1, 7, 10]; показана зависимость нитрогеназной активности клубеньковых бактерий люцерны от штаммовых особенностей, состава питательных сред и метаболитов бобовых растений [3].

Известно, что при добавлении в субстрат больших доз азотных соединений сильно понижается азотфиксирующая активность клубеньковых бактерий в симбиозе. Ряд авторов считают, что небольшие дозы (стартовые) минерального азота, внесенные до начала симбиотической азотфиксации, стимулируют этот процесс [4, 6]. Установлено также, что добавление минерального азота в подкормку ингибирует нитрогеназную активность клубеньков бобовых растений [12, 13, 14].

На азотфиксирующую активность клубеньковых бактерий в симбиозе с бобовыми растениями большое влияние оказывают температура, свет, влажность и pH почвы.

Вопрос о зависимости азотфиксирующей (нитрогеназной) активности от влажности и pH почвы в литературе освещен недостаточно.

Цель наших исследований состояла в изучении влияния различных доз минерального азота, влажности, pH почвы на азотфиксирующую активность и эффективность клубеньковых бактерий сои (*Rhizobium japonicum*), а также в отборе эффективных штаммов клубеньковых бактерий люцерны (*Rh. meliloti*), нута (*Rh. cicer*) и эспарцета (*Rh. simplex*).

Материал и методика. Работа выполнена в 1980—1981 гг. Изучали клубеньковые бактерии сои, шт. 5383, 5784, 5789 (выделены в 1972 году из почв Груз. ССР), нута, шт. 6042, 6046, 6050 (выделены в 1974 году из почв АрмССР), люцерны, шт. 5515, 5548, 5549, 5551 (выделены в 1982 году из почв АрмССР). Нитрогеназную активность и клубеньках изучали модифицированным методом, предложенным ВНИИСХМ [8]. Ориентативную активность выражали в «Молях C_2H_2 на 1 растение (средние данные 10 растений) в течение 1 часа.

Опыты ставили на стерильном речном песке, обогащенном средой Прянишникова, в 4-килограммовых вазонах. Повторность опытов 4-кратная.

Дозы азота: 0,25 нормы (20,85 мг), 0,5 (41,75 мг), 1,0 (83,5 мг) и 1,2 (100,2 мг) на 1 кг песка. Влажность — 40, 60, 80% от полной влагоемкости песка.

Для изучения влияния pH на нитрогеназную активность клубеньковых бактерий сои были использованы почвы с pH 6,0; 7,2 и 8,2.

Результаты и обсуждение. Данные табл. 1 показывают, что азотфиксирующая активность всех испытанных штаммов клубеньковых бактерий выше в фазе цветения, но уже в фазе предбутонизации (образование 3—5 настоящих листьев) в клубеньках проявляется азотфиксирующая активность. Высокой нитрогеназной активностью отличались штаммы клубеньковых бактерий нута 6049 и 6046, люцерны—5549 и сои—5784, 5783.

Таблица 1. Нитрогеназная активность клубеньковых бактерий в симбиозе

Штаммы клубеньковых бактерий		нМ C_2H_4 /растение/час	
		фаза предбутонизации	фаза цветения
нута	6042	630.0	720.0
	6046	151.0	770.0
	6050	252.0	432.0
	—	—	—
люцерна	5548	—	535
	5549	—	728
	5551	—	476
	5515	66.3	521.5
соя	5783	55.23	652.5
	5784	205.2	763.1
	5789	53.68	210.5

Примечание: (—)—отсутствие данных.

Изучение нитрогеназной активности в клубеньках эспарцета при спонтанном заражении показало, что в фазе цветения клубеньковые бактерии также проявляют высокую ферментативную активность (678,8 нМ C_2H_4 /раст./час); а в фазе предбутонизации она составляет 353,6 нМ C_2H_4 /раст./час. Подобные данные получены и другими исследователями [5, 9, 10, 11].

Результаты изучения влияния различных доз азота на азотфиксирующую активность и эффективность клубеньковых бактерий сои приведены в табл. 2. Видно, что в фазе предбутонизации внесение полной нормы минерального азота или 1,2 ее приводит к снижению азотфиксирующей активности клубеньков. В этот период на корнях растений образуется мало клубеньков. В фазе цветения растений с увеличением количества клубеньков повышается и их азотфиксирующая активность. В этой фазе роста растений азотфиксирующая активность клубеньков ниже при внесении в субстрат полной нормы азота и 0,5 ее, чем при 0,25. Только в одном варианте (полная норма азота) у штамма клубеньковых бактерий сои 5784 азотфиксирующая активность была выше, чем в вариантах с 0,25 и 0,5 нормы минерального азота.

Полученные данные показывают, что высокие дозы минерального азота угнетают азотфиксирующую активность клубеньков растений сои. Высокая азотфиксирующая активность отмечена при внесении небольших доз минерального азота (0,25) в фазе цветения растений сои.

Таблица 2. Влияние различных доз минерального азота на эффективность и нитрогенную активность клубеньковых бактерий сои

Штамы	Норма азота	Вес, г		Нитрогеназная активность, иМ C_2H_2 /раст. час
		зеленой массы	клубеньков	
Фаза проростания растений				
Контроль (без инокуляции)	0.25	8.28	0	0
	0.5	6.0	0	0
	1.0	15.0	0	0
	1.2	13.0	0	0
5784	0.25	15.0	5.6	205.2
	0.5	18.0	7.0	121.3
	1.0	15.5	1.8	107.8
	1.2	16.0	4.17	94.3
5789	0.25	12.5	4.0	53.68
	0.5	17.2	4.7	719.91
	1.0	15.0	2.7	94.72
	1.2	15.0	4.0	86.9
Фаза цветения				
Контроль (без инокуляции)	0.25	9.0	0	0
	0.5	18.0	0	0
	1.0	20.0	0	0
	1.2	23.0	0	0
5784	0.25	47.0	11.5	753.1
	0.5	20.0	6.0	121.0
	1.0	29.0	7.3	290.0
	1.2	26.0	11.0	
5789	0.25	25.0	3.5	210.5
	0.5	25.0	6.0	184.2
	1.0	16.0	5.2	620.9
	1.2	23.0	4.2	315.7

Подобные результаты получены Белимой [2], изучавшей ацетилен-восстанавливающую активность двух сортов клубеньков люцерны при внесении в субстрат различных доз минерального азота.

Изучение влияния влажности на эффективность и азотфиксирующую активность клубеньковых бактерий сои показало, что при 60%-ной влажности субстрата вес зеленой массы растений и клубеньков больше, чем при 40- и 80%-ной. С увеличением веса клубеньков растений повышается их азотфиксирующая активность.

В табл. 3 приведены данные, показывающие влияние pH почвы на массу надземной части, клубеньков сои и их азотфиксирующую активность. Как в фазе бутонизации, так и в фазе цветения у растений сои, выращенных на почве с pH 7,2, вес зеленой массы и клубеньков сравнительно выше, чем у растений, выращенных на почвах с pH 6,0 и 8,2. Ферментативная активность у этих растений соответственно также высокая.

Таблица 3. Влияние pH почвы на эффективность и нитрогеназную активность клубеньковых бактерий сои

Штаммы	рН	Вес, г		Нитрогеназная активность, C ₂ H ₄ , растение/ час
		зеленой массы	клубеньков	
Фаза бутонизации				
Контроль (без инокуляции)	6.0	12.0	0	0
	7.2	10.0	0	0
	8.2	9.0	0	0
5784	6.0	12.5	3.9	157.9
	7.2	21.5	6.2	1078.8
	8.2	12.8	2.3	242.1
Фаза цветения				
Контроль (без инокуляции)	6.0	15.1	0	0
	7.2	19.0	0	0
	8.2	12.3	0	0
5784	6.0	35.0	4.0	765.1
	7.2	40.2	7.1	1263.0
	8.2	20.3	2.7	1084.1

Приведенные данные позволяют заключить, что высокие дозы минерального азота угнетают эффективность и азотфиксирующую активность. Оптимальной дозой азота является 0,25 нормы.

Эффективность и нитрогеназная активность штаммов повышается при увлажнении почвы на 60% от полной влагоемкости и pH 7,2; эти показатели выше в фазе цветения растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алисова С. И., Чундерова А. И. и др. Бюлл. ВНИНССХМ, 18, 2, 36—38, 1977.
2. Белица Н. И. В кн.: Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. Киев, 1984.
3. Бондарцева Г. А., Шемаханова Н. М. Изв. АН СССР, сер. биол., 5, 781—786, 1978.
4. Доросинский Л. М. Клубеньковые бактерии и нитрагин. М., 1970.
5. Доросинский Л. М., Афанасьева Л. М., Рибинштейн Г. В. Агрохимия, 8, 84—88, 1973.
6. Логинова Т. К. Сельское хозяйство за рубежом, 17, 3, 1979.
7. Мальцева Н. Н., Гриб Т. А. и др. Микробиол. ж., 47, 2, 101—103, 1985.
8. Методические рекомендации по получению новых штаммов клубеньковых бактерий и оценка их эффективности. Л., 1979.
9. Сабельникова В. И. В кн.: Клубеньковые бактерии в почвах Молдавии. Кишинев, 1974.
10. Шемаханова Н. И., Бондарцева Г. А., Илясова В. Б. Изв. АН СССР, сер. биол., 6, 917—918, 1976.
11. Garg F. C., Bansal R. K., Tauro P. Indian J. Microbiol., 21, 1, 74—75, 1981.
12. Manhart J. R., Wong P. P. Plant Physiol., 65, 3, 502—505, 1980.
13. Trinchant J. C., Pigaud J. Appl. and Environ. Microbiol., 44, 6, 1385—1388, 1982.
14. Skreletu V., Gaudiova A., Nemcova M. Folia Microbiol., 25, 2, 155—161, 1980.

Поступило 22 VIII 1986 г.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛУБЕНЬКОВЫХ БАКТЕРИЙ С ОБОЛОЧКОЙ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК КОРНЕЙ ГОРОХА И ЛЮЦЕРНЫ

Е. Н. АВБАКУМОВА, С. А. АРУТЮНЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Аннотация. — Показано, что компоненты оболочки изолированных растительных клеток корней гороха и люцерны по-разному реагируют на инфицирование специфичными и неспецифичными штаммами. Во внешнем слое оболочки растительных клеток обнаружены гликопротеиды, ионизированные формы кальция, магния, марганца, а также гликозиды.

Անոտացիա — Պարզարանվել է պարարարակտերիաների սպեցիֆիկ և ոչ սպեցիֆիկ շտամների ազդեցությանը ոլորի և առվույտի արմատներից մեկուսացված բուսական բջիջների թաղանթի վրա:

Սպեցիֆիկ շտամներով վարակելիս մեկուսացված բջիջների թաղանթի արտաքին շերտում հայտնաբերվել են գլիկոպրոտեիդներ, գլիկոհեղիններ, և Ca-ի, Mg-ի, Mn-ի իոնացված ձևեր:

Abstract — Different reactions of membrane components of isolated cells of pea and alfalfa on the infection of specific and non-specific strains of nodule bacteria was revealed. During the infection of specific strains on the external layer of membrane isolated cells glycoproteids, ionized forms of Ca, Mg, Mn and also glycosides were found.

Ключевые слова: клубеньковые бактерии, культура ткани гороха и люцерны, лектины.

Считается, что одним из факторов, определяющих связывание клубеньковых бактерий с корневыми волосками, является взаимодействие между лектинами растений и полисахаридами бактерий [5—7].

Данные о химических и биологических свойствах различных лектинов обобщены в обзорах [10—13]. Лектины, растительные агглютинины, близки к гликопротеидам и некоторым гликозидам. Их активность обусловлена наличием биополимеров, связанных с CN-ацетил-Д-глюкозаминами или близкими производными [13].

Для взаимодействия лектинов с сахарами необходимо присутствие в них дивалентных катионов [12]. При утрате лектином Mn^{2+} сильно снижается активность гемагглютинации [10].

Взаимодействие клубеньковых бактерий с лектинами растений удобно было бы изучать на модели, т. е. в ассоциации изолированных корневых клеток с клубеньковыми бактериями. Специфичность этой ассоциации зависит от вида растения, сорта, физиологического состояния ткани и т. д. [5, 6].

Цель настоящего исследования состояла в изучении реакции некоторых компонентов оболочки изолированных растительных клеток корней бобовых на заражение клубеньковыми бактериями различной специфичности.

Материал и методика. Исследования проводили на ассоциации изолированных клеток корней гороха и люцерны с клубеньковыми бактериями гороха (*Rhizobium leguminosarum*, шт. 5609), люцерны (*Rh. meliloti*, шт. 5502), сои (*Bradyrhizobium japonicum*, шт. 679), эспарцета (*Rh. simplex*, шт. 5891).

Азотфиксацию ассоциаций определяли по ацетилен-восстанавливающей активности нитрогеназы, на газовом хроматографе марки «Цвет», модели 4—67 [2]. Для определения нитрогеназной активности ассоциации ткань предварительно выращивали в цинкпаллиевых флаконах (объем 15 см³) на агаризованной среде Мурасиге Скуга с уменьшенной дозой азота (до 0,1 от нормы) и добавленным дрожжевым экстрактом. После 7 сут роста ткань инокулировали клубеньковыми бактериями и через 7—9 сут совместного роста определяли ацетилен-восстанавливающую активность, которую выражали в мкг азота на 1 г сухой ткани в час.

Мертвые клетки растительной ткани выявляли путем окраски их метиленовым синим в концентрации 1:100000 и подсчетом под микроскопом.

Компоненты оболочки растительных клеток, которые могли бы входить в состав лектина, определяли с помощью цитохимических методов [3].

Окраска метилевковым синим служила для определения способности реактивных групп лектина к метазромазии.

Для обнаружения белков применяли реакцию нингидрин—реактив Шиффа, метиленовый Риттера и Олесона определяли кислые мукополисахариды и мукопротеиды. Митохондрии выявляли титановым методом, кальций—обработкой препаратов 3%-ным H₂SO₄. Марганец определяли реакцией с двуокисью свинца [1]. Гликозиды в ткани осаждали абсолютным этанолом и дифференцировали путем растворения в воде и аликвотке [4].

Препараты инокулированной ткани просматривали под световым микроскопом марки Nu Zeiss X300—400.

Результаты и обсуждение. Данные о специфичности воздействия различных видов клубеньковых бактерий на изолированную ткань гороха и люцерны при их совместном культивировании приведены в табл. 1, 2.

Наибольший прирост тканей гороха и люцерны отмечался при заражении ее специфичными штаммами 5609 (*Rh. leguminosarum*), 5502 (*Rh. meliloti*). Неспецифичные для гороха и люцерны виды клубеньковых бактерий, наоборот, снижали вес инокулированной ткани по

Таблица 1. Влияние клубеньковых бактерий различной специфичности на инокулированную ткань корней гороха и люцерны

Штаммы	Ткань гороха				Ткань люцерны			
	вес ткани через 20 сут, г	мертвые клетки, %		азот, мкг/г ткани час	вес ткани через 20 сут, г	мертвые клетки, %		азот, мкг/г ткани час
		через 4 сут	через 20 сут			через 4 сут	через 20 сут	
Контроль	100	8.72	19.59	5.6	100	14.8	25.0	0
5609 (<i>Rh. leguminosarum</i>)	104.9	3.86	22.63	33.07	29.2	18.4	50.1	0
5502 (<i>Rh. meliloti</i>)	66.3	37.5	77.8	5.0	142.7	11.47	19.1	22.5
649 (<i>B. japonicum</i>)	56.8	19.8	39.17	6.62	59.6	28.2	71.4	0
5891 (<i>Rh. simplex</i>)	73.8	0.85	31.63	—	43.5	19.7	37.0	—

Таблица 2. Влияние клубеньковых бактерий различной специфичности на компоненты лектина в оболочке изолированных клеток гороха и люцерны

Штаммы	Ткань гороха		Ткань люцерны	
	компоненты оболочки			
	внешний слой	внутренний слой	внешний слой	внутренний слой
Контроль	мукопротеиды гесперидин Mg^{2+}	глико-и мукопро- теиды гесперидин ионы Ca^{2+} , Mg^{2+}	мукопротеиды	гликопротеиды Ca^{2+} , Mg^{2+}
5609 (Rh. leguminosar- um)	гликопротеиды Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} гесперидин	гликопротеиды Ca^{2+} , Mg^{2+}	мукопротеиды Mg^{2+}	гликопротеиды Ca^{2+} , Mg^{2+}
5502 (Rh. melilot)	мукопротеиды Mg^{2+}	гликопротеиды Ca^{2+} , Mg^{2+}	глико-и мукопро- теиды гесперидин ионы Ca^{2+}	гликопротеиды гесперидин ио- ны Ca^{2+}
649 (B. ja- ponicum)	мукопротеиды Mn^{2+}	гликопротеиды гесперидин Mg^{2+} , Mn^{2+}	мукопротеиды Mg^{2+}	гликопротеиды гесперидин ио- ны Ca^{2+} , Mg^{2+}
5891 (Rh. lupini)	мукопротеиды ионы Ca^{2+} , Mn^{2+}	гликопротеиды Mg^{2+} , Mn^{2+}	мукопротеиды Mg^{2+}	Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}

сравнению с контролем. В специфичной ассоциации ткани с клубеньковыми бактериями отмечено также наименьшее количество мертвых растительных клеток. Ткань гороха в ассоциации с шт. 5609 содержала 3,86% мертвых клеток через 4 сут совместного роста и 22,63% — через 20 суток. В неспецифичной ассоциации со штаммами чужих видов (5609, 649, 5891) количество мертвых клеток значительно увеличивается, особенно в случае со штаммом 5502, до 77,8% через 20 суток.

Подобная закономерность отмечена и в ассоциации с корневой тканью люцерны (табл. 1). Наименьшее количество мертвых клеток у люцерны было при культивировании со своим штаммом, 5502, и наибольшее — с неспецифичными штаммами 5609, 649, 5891.

Определенке нитрогеназной активности ассоциации подтвердила специфичность взаимоотношений клубеньковых бактерий с изолированной тканью (табл. 1). Нитрогеназная активность была обнаружена только в специфичной ассоциации ткани гороха со шт. 5609 и ткани люцерны со шт. 5502. Неспецифичные штаммы не проявляли нитрогеназ-

ной активности или она была на уровне контроля (для гороха), поскольку известно, что клетки растений могут выделять эндогенный этилен.

Изучение реакции оболочки растительных клеток на инокуляцию клубеньковыми бактериями выявило изменение химического состава ее в зависимости от специфичности штаммов (табл. 2).

Определяли наличие и локализацию компонентов, которые могли бы входить в состав лектина. О наличии гликопротеидов и мукопротеидов, которые отличаются друг от друга только содержанием гексозамина [3], свидетельствует отсутствие метакромазии при окраске метиленовым синим, а также отсутствие обесцвечивания метиленового синего при pH ниже 4,0. С помощью метиленового синего в оболочке растительных клеток были обнаружены и мукополисахариды, которые при окраске дают метахроматическое окрашивание. Результаты окраски метиленовым синим были подтверждены выявлением муко- и гликопротеидов, белков, полисахаридов с помощью других методов (Риттера и Олесона, реакции нингидрин—реактив Шиффа, ализанового синего по Стивенсу), а также просмотром препаратов в поляризационном свете, так как лектин обладает свойством двойного лучепреломления—дихроизмом [13].

Было найдено, что гликопротеиды локализованы в основном в среднем слое оболочки, а мукопротеиды—во внешнем. Лишь при инокуляции растительных клеток специфичными штаммами гликопротеиды обнаруживаются во внешнем слое оболочки (шт. 5609—на горохе и 5502—на люцерне).

Следует отметить, что строгоспецифичной цитохимической реакции для глико- и мукополисахаридов нет и разграничение их достаточно условно. Тем не менее, сопоставление результатов применения различных методов выявило некоторые различия в окраске, дихроизме между компонентами клеточной оболочки внешнего и среднего слоев. Кроме того, в клеточной оболочке растительных клеток были обнаружены пониженные формы кальция, магния, марганца и некоторые гликозиды типа гесперидина и инулина.

В специфичной ассоциации ткани и клубеньковых бактерий внешний слой оболочки растительных клеток содержал катионы кальция, магния, марганца. Иногда катионы металлов находились снаружи клетки.

При длительном выдерживании инокулированной ткани в абсолютном этаноле выпадают кристаллы гликозидов, в специфичной ассоциации они локализованы во внешнем слое оболочки растительных клеток. Гликозиды, нерастворяющиеся в воде и растворяющиеся в аммиаке, определены как гесперидин. Инулин наблюдался в виде крупных сферокристаллов и обладал двойным лучепреломлением, легко растворялся в воде. В неспецифичной ассоциации ткани гороха со шт. 5502, 649, 5891 и люцерны со шт. 5609, 649, 5891 во внешнем слое оболочки растительных клеток не были выявлены гликопротеиды, те или иные катионы металла и гесперидин, они были обнаружены во внутреннем слое оболочки.

При инокуляции ткани гороха шт. 5502 во внешнем слое оболочки отсутствовали Ca^{2+} , Mn^{2+} , а при заражении шт. 649 (В. жароустойчив) отсутствовали Mg^{2+} и Ca^{2+} , у люцерны Ca^{2+} и Mn^{2+} не найдены в ассоциации со шт. 5609, 649 и 5891.

Результаты проведенных исследований подтверждают литературные данные о значительной роли лектина в процессе «узнавания» специфических клубеньковых бактерий. Кроме того, была выявлена специфичность реакции компонентов оболочки изолированных растительных клеток на инфицирование специфическими и неспецифическими штаммами клубеньковых бактерий. При инфицировании специфическими штаммами во внешнем слое клеточной оболочки обнаружены гликопротеиды, гесперидины и нонизированные формы кальция, магния и марганца, которые, очевидно, входят в состав лектина и реагируют с клубеньковыми бактериями.

ЛИТЕРАТУРА

1. Большой практикум по физиологии растений. Под ред. Б. А. Рубина. Л., 1978.
2. Методические указания по использованию ацетиленового метода при селекции бобовых культур на повышение симбиотической азотфиксации. Л., 1982.
3. Пирс Э. Гистология. М., 1962.
4. Прокина М. И. Ботаническая микротехника. Л., 1960.
5. Связывание молекулярного азота клубеньковыми бактериями в симбиотических и культуральных условиях. Под ред. Е. П. Старченкова. Киев, 1984.
6. Шандия М. Г., Авакхужова Е. Н., Чабыхян М. А. Докл. АН СССР, 222, 3, 710—743, 1975.
7. Dazzo F. B., Hrabar E. M., Urbano M. R., Sherman Y. E., Truchet G. In: Current perspectives in nitrogen fixation, 292—295, Canberra, 1981.
8. Hubbel D. H. Bioscienc., 37, 11, 832—837, 1981.
9. Kamberger W. Arch. Microbiol., 121, 1, 63—90, 1979.
10. Lis H., Sharon N. Biochem., 42, 541—574, 1973.
11. Novakova N., Kozurek Y. Biochem. Biophys. Acta, 359, 323—333, 1974.
12. Pavlova M., Ticha M., Enfinger G., Kozurek Y., Kozurek Y. Biochem. Biophys., 252, 388—395, 1971.
13. Roth Y. The lectins, 1973.

Получено 9.1.1986 г.

Восток. м. Армения, т. 40, № 4, 283—291, 1987

УДК 591.1.05

ИЗОЭНЗИМЫ ФЕРМЕНТОВ БИОСИНТЕЗА ПРОЛИНА И РЕГУЛЯЦИЯ ИХ АКТИВНОСТИ У ФАСОЛЕВОЙ ЗЕРНОВКИ *AGANTHOSCELIDES OBTECTUS* SAY.

А. А. АГАДЖАНИН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и проблемной лаборатории сравнительной и эволюционной биологии

Аминотация — 5-лицинол фасолевого зерновки орнитин-б-трансаминила и пирролидин-б-карбоксилат редуктаза представлены двумя изоэнзимами, у кукурузы — одним с более высокой активностью. ПХМБ, гидроксиметил, АДФ.

АТФ, глутамин, аргинин, валин и двухвалентные ионы Co и Cd ингибируют, а хлористый калий и пируват, наоборот, стимулируют процесс биосинтеза пролина.

Անձամարդ — (որտ ընդակերի թրթուրներով հարձակմանը են OSH -ի և HSC -ի կողմից իզոլեզինների մոտ մեկական իզոլեզինների մոտակիությունը դառնում է թրթուրների համեմատությամբ: PCMB , HSC , HSC և HSC կողմից իզոլեզինների ընկճում են պրոլինի բիոսինթեզի ֆերմենտների ակտիվությունը, իսկ պիրուվատը և կալիումի քլորիդը, ընդհանրապես, խթանում են այն:

Abstract — In larvae of haricot beetle ornithin— δ —transaminase and proline- γ -carboxylate reductase have been presented by two isoenzymes, in pupae—by one enzyme, with a lower activity. PCMB, hydroxylamin, ADP, ATP, glut., arg., val and bivalent ions of Co and Cd inhibit, whereas chlorine potassium and pyruvate stimulate the process of proline biosynthesis.

Ключевые слова: пролин, орнитин- δ -трансаминаза, пирролин- γ -карбоксилат редуктаза, физиология зерновки.

В гемолимфе многих видов насекомых уровень пролина очень высок, поскольку последние используют пролин как энергетический субстрат [14, 17]. Источниками синтеза пролина у различных насекомых могут служить разные аминокислоты. Так, личинки сипей мухи [19] и гусеницы тутового шелкопряда [1] лучше используют орнитин, чем глутамат, а личинки дрозофилы, наоборот, используют глутамат вместо орнитина.

В жировом теле *Hyalophora gloveri*, очевидно, образовавшийся из аргинина под действием неуротелической аргиназы орнитин превращается в пролин [15]. Установлено коррелятивное изменение активности аргиназы и орнитин-аминотрансферазы (ОТА) в процессе онтогенеза у *P. cisipi* [14], тутового шелкопряда [1], у жуков фасолевой зерновки [3]. Биосинтез пролина из аргинина и орнитина подробно изучен у инфузорий *Tetrahymena pyriformis* [18]. Из последних в очищенном виде выделены ОТА и пирролин- γ -карбоксилат редуктаза (П5КР). Получены также очищенные препараты П5КР из печени крыс [18] и птиц [19]. Выделена высокоактивная кристаллическая ОТА из *Bacillus spaciatus*, предварительно индуцированная орнитином и аргинином [12]. Показано, что ПХМБ ингибирует ОТА печени птиц на 66% [19].

В настоящей работе представлены результаты изучения изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина и их регуляторных свойств у личинок и куколок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say.

Материал и методика. Объектами исследования служили личинки и куколки фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. Личиночная стадия при 28° и 75%-ной влажности воздуха длится 28–30 дней. Гомогенат целого тела личинок и куколок готовили в смеси 20 мМ хлористого калия и 80 мМ глицинового буфера (pH 9.5). Гельфильтрацию белков проводили на сефадексе G-150. Активность ОТА и П5КР определяли по методу Редди и Кемблза [15] и выражали количеством образовавшегося пролина. Проллин определяли как химическим, так и хроматическим методами, описанными ранее нами [1].

Результаты и обсуждение. Изучение изоэнзимного спектра ферментов биосинтеза пролина у личинок и куколок фасолевой зерновки

(рис. 1, 2), показало, что у личинок ОТА и П5КР представлены двумя изоэнзимами: I изоэнзим ОТА фильтруется в 12—13-й фракции, а II — в 19—20-й, I изоэнзим П5КР фильтруется в 8—9 фракций, II — в 13-й. У куколок эти ферменты имеют по одному энзиму, активность которых почти в 16 и 8 раз соответственно ниже, чем у личинок. Следует отметить, что довольно слабый синтез пролина у куколок на уровне целого гомогената обнаружен нами ранее [2].

В следующей серии экспериментов с целью большей наглядности нами была воспроизведена система биосинтеза пролина из орнитина с использованием различных комбинаций изоэнзимов ОТА и П5КР.

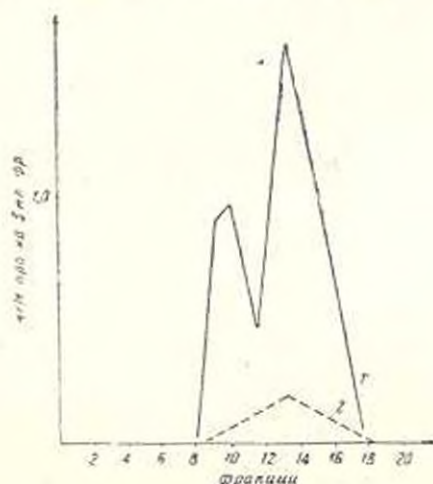
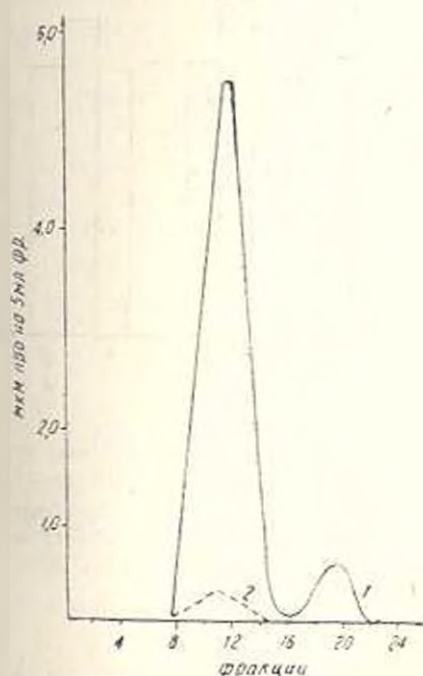


Рис. 1. Изоэнзимный спектр ОТА у личинок и куколок фасолевой зерновки *A. obtectus* Say. 1—личинки, 2—куколки. Рис. 2. Изоэнзимный спектр П5КР у личинок и куколок фасолевой зерновки *A. obtectus* Say. 1—личинки, 2—куколки.

Данные табл. 1 наглядно показывают, что в модельных опытах отдельные изоэнзимы проявляют достаточную для биосинтеза пролина активность. Наиболее интенсивный синтез пролина наблюдался при использовании I изоэнзима ОТА с I изоэнзимом П5КР.

Таблица 1. Использование различных фракций для биосинтеза пролина (мкМ на 5 мл фракций)

Изоэнзимы		Активность	Изоэнзимы		Активность
ОТА	П5КР		ОТА	П5КР	
I	I	6.29 ± 0.10	II	I	2.17 ± 0.02
I	II	0.42 ± 0.01	II	II	1.64 ± 0.02

На отдельных пиках нами изучено влияние различных эффекторов на ферменты биосинтеза пролина, в частности, нуклеотидов, тиоловых реагентов, ионов металлов, кетокислот и δ -аминовалериановой кислоты.

и также гидроксиламина в качестве ингибитора трансаминирования (рис. 3, 4). Показано, что использованные эффекторы, за исключением пирувата, ингибируют активность ферментов, участвующих в биосинтезе пролина. При применении I изоэнзима ОТА и I изоэнзима П5КР (рис. 3) пируват в некоторой степени повышает активность ферментов

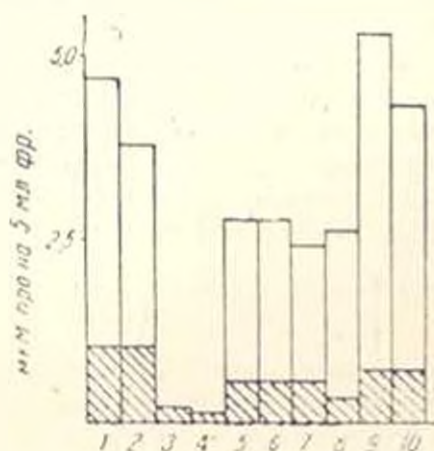


Рис. 3. Влияние эффекторов на ферменты биосинтеза пролина и личинок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. 1—без эффектора, 2—НАД⁺, 3—ПХМБ, 4—NH₄OH, 5—АДФ, 6—АТФ, 7—CoCl₂, 8—CdCl₂, 9—пируват, 10—MgCl₂. □ — I изоэнзим ОТА с II изоэнзимом П5КР, ▨ — I изоэнзим ОТА с II изоэнзимом П5КР.

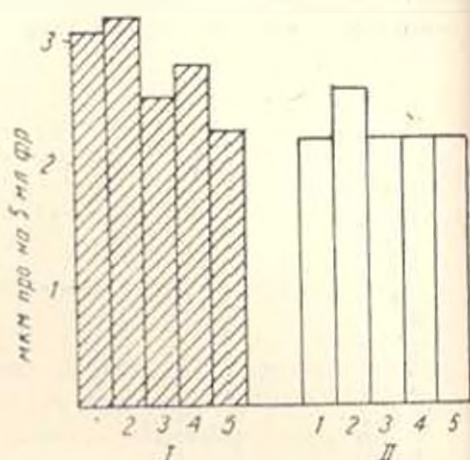


Рис. 4. Влияние аминокислот на I и II изоэнзимы ОТА личинок фасолевой зерновки *A. oblectus* Say. 1—НАДН, 2—НАДФ, 3—глу, 4—шт, 5—арг. ▨ — I изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР; □ — II изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР.

биосинтеза пролина, а при применении I изоэнзима ОТА с II изоэнзимом П5КР, он не только не стимулирует, но и в некоторой степени ингибирует процесс биосинтеза пролина. Очевидно, этот эффект пирувата связан с его действием на II изоэнзим П5КР. Стимулирование биосинтеза пролина пируватом обнаружено также у дождевого червя [5]. Гидроксиламин полностью ингибирует этот процесс при комбинации I изоэнзима ОТА с I изоэнзимом П5КР, очевидно, в результате подавления орнитинтрансаминазы. Ингибирование гидроксиламином различных ферментативных реакций, в частности, реакций переаминирования, установлено у животных и растений [4, 6]. Полностью ингибируется процесс биосинтеза пролина также ПХМБ начиная с концентрации 10^{-3} М. Данные других авторов показывают, что ПХМБ в концентрации 10^{-4} ингибирует активность П5КР в гомогенатах печени и у табака [11, 13], а в концентрации $2 \cdot 10^{-3}$ М—у синей мухи [20].

Интересно также ингибирование активности П5КР окисленным НАД⁺. Из литературы известно, что окисленный НАДФ⁺ является строгим ингибитором П5КР, между тем как окисленный НАД⁺ таким свойством не обладает [11].

Полученные нами данные свидетельствуют, что окисленный НАД⁺ обладает ингибирующим действием на активность биосинтеза пролина в модельной системе, состоящей из I изоэнзима ОТА и I изоэнзима П5КР. Подобные результаты получены в отношении фермента из ки-

шечника дождевого червя в нашей лаборатории [5]. Данные рис. 3 показывают, что примененные кофакторы, за исключением НАД⁺ и пирувата, оказывают почти такое же влияние на процесс биосинтеза пролина и при комбинации изоферментов I ОТА и II П5КР. Очевидно, НАД⁺ избирательно влияет на изоферменты П5КР.

Нами изучено влияние НАДН, НАДФН, глутамата, цитруллина и аргинина на биосинтез пролина у личинок фасолевой зерновки (рис. 4). Данные показывают, что НАДФН действует эффективнее НАДН при всех комбинациях изоэнзимов ОТА и П5КР. Глутамат, аргинин и несколько слабее цитруллин оказывают ингибирующее влияние на биосинтез пролина при комбинации I изоэнзим ОТА с I изоэнзимом П5КР. Указанные аминокислоты, однако, не оказывают влияния на активность биосинтеза пролина при комбинациях со II изоэнзимом ОТА. Эти данные дают основание предполагать, что, по-видимому, I изоэнзим ОТА обеспечивает процесс биосинтеза глутамата, а последний по принципу обратной связи ингибирует активность фермента. Разумеется, для окончательного ответа необходимы дальнейшие исследования. Трудно, например, объяснить ингибирующее влияние аргинина.

В следующей серии экспериментов исследовали влияние валина на процесс биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки на уровне гомогената (табл. 2).

Таблица 2. Влияние валина на процесс биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки, мкМ на 1 г ткани

Варианты	Активность	% ингибирования
Инкубационная среда	5 ± 0.51	
Инкубационная среда + валин ($2.7 \cdot 10^{-3}$) М	0	100

Данные показывают, что валин полностью ингибирует биосинтез пролина личинок, по-видимому, действуя на активность ОТА. Ингибирование активности ОТА установлено также у жуков фасолевой зерновки ранее [3], а также у инфузорий *T. pyriformis* [8].

В литературе имеются сведения, что активность П5КР сетчатки глаза быка стимулируется в присутствии 70 мМ КСl и фосфатных ионов [9]. Нас интересовало, имеет ли место подобное явление у личинок фасолевой зерновки (табл. 3).

Таблица 3. Влияние КСl на активность биосинтеза пролина у личинок фасолевой зерновки, мкМ на 1 г ткани

Варианты	Активность	Варианты	Активность
Среда	0.28 ± 0.012	Среда + 50 мкМ КСl	0.15 ± 0.010
Среда + 10 мкМ КСl	0.36 ± 0.021	Среда + 70 мкМ КСl	0
Среда + 30 мкМ КСl	0.18 ± 0.010		

Полученные данные показывают, что биосинтез пролина у личинок активируется в присутствии 10 мкМ хлористого калия примерно на 35%

по сравнению с контролем. При возрастании концентрации хлористого калия в инкубационной среде интенсивность этого процесса постепенно снижается и при 70 мкМ полностью ингибируется. Очевидно, KCl в низких концентрациях стимулирует активность ПСКР. По данным литературы [7], ионы хлора, по-видимому, присоединяются к положительно заряженной группе молекулы фермента вблизи от активного центра, понижая, таким образом, значение рК группы, играющей важную роль в катализе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 27, 5, 1974.
2. Агаджанян А. Х., Давтян М. А. Биол. ж. Армении, 28, 10, 1975.
3. Агаджанян А. Х., Арутюнян Т. М., Гукасян Дж. Г. Биол. ж. Армении, 33, 6, 1980.
4. Браунштейн А. Е., Азарс Р. М., Могилевская З. Г. Укр. биохим. ж., 27, 259, 1955.
5. Гаспарян Х. Г. Канд. дисс., Ереван, 1983.
6. Кротович В. Л., Бундель А. А., Фрошери М. Р., Боровакова Н. В. Журн. общ. биол., 19, 414, 1958.
7. Moss D. B., Batterworth P. Дж. Эпидемиологии и медицины, М., 1976.
8. Hill D. Z., Chambers P. Biochem. Biophys. Acta, 148, 415, 1967.
9. Matsusawa T., Biochem. Biophys. Acta, 717, 215, 1982.
10. Matsusawa T., Katsunuma T., Katsunuma N. Biochem. Biophys. Res. Commun. 32, 2, 1968.
11. Miller P. M., Stewart C. P. Phytochemistry, 15, 1455, 1976.
12. Misono H., Toyama S., Sada K. J. Bacter., 148, 43, 1981.
13. Naguchi M., Kikuchi A., Tanaka E. Adv. Biol. chem., 39, 453, 1966.
14. Pant R., Kumar S. Biochem. J., 174, 341, 1978.
15. Reddy S. R. R., Campbell J. W. Comp. Biochem. Physiol., 29, 515, 1969.
16. Price G. M. Biochem. J., 89, 420, 1951.
17. Sactor B., Childress C. Arch. Biochem. Biophys., 129, 583, 1967.
18. Smith M. E., Greenberg D. M. J. Biol. chem., 236, 317, 1967.
19. Vecchlo D. A., Kalman S. M. Arch. Biochem. Biophys., 127, 376, 1968.
20. Yoshinaga F., Wadano A., Miura K. Insect Biochem., 7, 51, 1977.

Поступило 5.I 1986 г.

Биол. ж. Армении т. 40, № 4, 294–298, 1987

УДК 616.973+616.993+616.43-002/616.697+618.177

РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ МОЧЕПОЛОВОМ ТРИХОМОНИАЗЕ У БЕСПЛОДНЫХ СУПРУЖЕСКИХ ПАР

М. Г. ОГАНЕСЯН, Л. Т. МИАНСАРЯН, В. И. БЕДНОВА,
Т. Е. ВАХИНИА, И. С. ОГАНЕСЯН

Республиканский центр семьи, брака и сексопатологии
МЗ Армянской ССР

Аннотация. Показана высокая чувствительность РИФ-40 абс при выявлении больных мочеполовым трихомониазом, превышающая чувствительность бактериоскопического и бактериологического методов, что позволяет реско-

использовать этот тест в качестве отборочного при обследовании пациентов, страдающих бесплодием.

Անոտագիտ — Միդասեոսական օրգանների տրիխոմոնազի ախտորոշման համար, ամ-
յոթյամբ տատապող ամուսնական զույգերի մոտ, օգտագործվել է իմունոֆլյուորես-
ցենտային ունակցիան (ՌԻՖ-40 աբ), որը զերազանցում է հետազոտման մանրէա-
բանական և ցանրի մեթոդներին բարձր զգայնությամբ և դեպրերի հայտնաբեր-
ման հաճախականությամբ, ինչն էլ թույլ է տալիս ՌԻՖ-40 աբ-ը օգտագործել որ-
պես բնորոշական տեսողական տրիխոմոնազով հիվանդների հայտնաբերման նպատակով:

Abstract — The high sensitivity of RIF-40 abc has been shown during
revelation of patients ill with urinesexual trichomoniasis, exceeding the
sensitivity of bacterioscopic and bacteriological method, what allows to
recommend this test as selective while studying patients, suffering from
sterility.

Ключевые слова трихомонады, бесплодие супружеских пар, бактериоскопия, бак-
териология, РИФ-40 абс.

Наиболее часто применяемое бактериоскопическое обследование на трихомонады недостаточно чувствительно, а бактериологическое — тру-
доемко, длительно и не экономично, в связи с чем заслуживают внима-
ния серологические методы исследования, с помощью которых легче об-
следовать большие группы пациентов.

В 1965 г. Крамар и Куцера дополнили данные о возможности обна-
ружения специфических противотрихомонадных антител в крови боль-
ных трихомониазом методом иммунофлюоресценции. Дальнейшие ис-
следования других авторов [1, 2, 5—7] установили высокую чувстви-
тельность реакции иммунофлюоресценции (РИФ) с антигеном из вла-
галищных трихомонад. Выяснено также, что РИФ-40 абс является цен-
ным диагностическим тестом при трихомониазе у мужчин [6, 7].

Цель данной работы заключалась в следующем: с помощью обще-
принятых лабораторных методов и РИФ-40 абс обследовать на мочеполо-
вой трихомониаз супружеские пары с нарушением репродуктивной
функции, изучить чувствительность и специфичность этой реакции, вы-
яснить возможность рекомендации ее для применения в качестве отбо-
рочного теста при установлении причины бесплодия.

Материал и методика. Принцип РИФ-40 абс заключается в соединении ком-
плекса антиген—антитело с антиидовой иммунной сывороткой, меченной флюорохро-
мом, что выявляется с помощью люминесцентного микроскопа. Используемая нами
методика постановки РИФ-40 абс заключалась в следующем: для получения сыворо-
тки крови брали кровь из локтевой вены, исследовали неинaktivированную сыворотку
крови. Антиген готовили из 20—30 штаммов влагалищных трихомонад, выращенных
на жидкой среде Джонсона-Трасселли. 2—3-суточную культуру трихомонад дважды
отмывали от питательной среды изотоническим раствором натрия хлорида (рН 7,2),
с применением центрифугирования. Осадок, состоящий из трихомонад, обрабатывали
10%-ным раствором нейтрального формалина в течение 20 мин при комнатной темпе-
ратуре, после чего трихомонады вновь отмывали изотоническим раствором и далее
сохраняли в холодильнике при 4°. Для приготовления препаратов использовали взвесь,
при анализе которой в каждом поле зрения определяли 5—10 трихомонад. В качестве
сорбента применяли бессолевой мясоемтонный бульон (МИБ) из свежего говяжьего
мяса с повышенным (1,5%) содержанием пептона (рН 7,0), который стерилизовали ав-
токлавированием при 1 атм. 20 минут.

Люминесцирующую сыворотку против глобулинов человека (НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР) предварительно титровали на эритроцитах и отрицательных сыворотках крови.

Для снятия неспецифического свечения тела трихомонад использовали раствор синьки Эванса в разведении 1:20 000, (рН 7,2).

Для промывания препаратов применяли фосфатный буфер (рН 7,2), в качестве люминесцирующего масла—диметилфталат.

Результаты исследования оценивали в люминесцентном микроскопе с ртутно-кадовой лампой ДРШ-250, объективом 90, 1X или 5X.

При постановке реакции трихомонадный антиген наносили на чистые предметные стекла, препараты высушивали и термостатировали при 37° в течение 10 мин, вводили в реакцию нефиксированными. Сыворотки крови перед постановкой реакции разводили три раза дистиллированной водой, после чего ее выдерживали в термостате при 37° 30 мин для абсорбции неспецифических антител. Препараты с трихомонадным антигеном помещали во влажную камеру и наносили на них по 1 капле разведенной 1:40 сыворотки крови. Влажную камеру помещали в термостат при 37° на 30 мин (1 фаза реакции). При наличии в испытуемой сыворотке крови противотрихомонадных антител на стекле образуется комплекс антиген—антитело, который выявляется в следующей фазе реакции после промывки препаратов в двух порциях фосфатного буфера. Затем на препараты наносили люминесцирующую сыворотку против глобулинов человека, разведенную по титру, помещали их во влажную камеру и выдерживали в термостате при 37° 30 мин (II фаза).

Образование комплекса антиген—антитело во II фазе реакции свидетельствовало о положительном результате, однако в силу того, что трихомонады являются крупными микроорганизмами и трудно отмываются от флюорохрома, их обрабатывали раствором синьки Эванса при комнатной температуре в течение 20 мин (III фаза).

Учет результатов применения РИФ-40abc заключался в определении периферической части тела трихомонад (ободка), которое зависит от образования комплекса антиген—антитело. В связи с тем, что антитела против глобулинов человека в люминесцирующих сыворотках помечены изотопизиадом флуоресцентна, свечение ободки имеет зеленый цвет, и то время как тела трихомонад окрашиваются синькой Эванса в красный цвет. При наличии в сыворотке крови большого количества антител свечение ободки не только ободки, но и тела трихомонад. В зависимости от количества противотрихомонадных антител степень свечения бывает разной.

Положительный результат реакции оценивали как 4+, 3+, 2+, +, при отрицательном результате наблюдали не свечение, а окраску ободки или его отсутствие.

4+: яркое изумрудно-зеленое свечение ободки; 3+: несколько менее яркое, недостаточное сильное свечение ободки; 2+: слабое свечение ободки; —: окраска ободки в желтовато-зеленый цвет без свечения.

Комплексному клинико-лабораторному обследованию было подвергнуто 240 человек (120 супружеских пар) с нарушением репродуктивной функции от 2 до 12 лет. Из них 106 женщин и 114 мужчин страдали воспалительными заболеваниями мочеполовых органов. Все пациенты были обследованы бактериоскопически и бактериологически на гонококки, трихомонады, уреаплазму, уреаплазму и хламидии.

У мужчин исследовали отделяемое слизистой оболочки уретры, секреты предстательной и добавочных половых желез, осадок 1 порции мочи, у женщин—отделяемое слизистой оболочки влагалища и цервикального канала. Мазки из патологического материала для бактериоскопического исследования окрашивали 1%-ным водным раствором метилевого синего и по Граму.

При бактериоскопическом исследовании на трихомонады использовали также нативные препараты. Посев на гонококки производили на безазотную питательную среду, на трихомонады—на среду из ферментализата микробного происхождения.

Результаты и обсуждение. При положительном результате реакции свечение может наблюдаться не у всех трихомонад, в некоторых случаях лишь у единичных. Это обусловлено наличием нескольких серотипов влагалищных трихомонад, в связи с чем антитела, находящиеся в не-

пытуемых сыворотках крови, могут не соответствовать трихомонадам всех штаммов, из которых приготовлен антиген.

В табл. 1 приведены данные о чувствительности различных методов исследования на трихомониаз. Видно, что при бактериоскопическом обследовании из 120 мужчин трихомонады выявлены в 3,3%, при бак-

Таблица 1. Результаты бактериоскопического, бактериологического и серологического (РИФ-40 абс) обследования супружеских пар

Методы исследования	Число и % положительных результатов			
	мужчины		женщины	
	число	%	число	%
Бактериоскопический	4	3,3	30	25
Бактериологический	14	11,6	49	33,3
РИФ-40 абс	14	11,6	40	33,3

териологическом — в 11,6% случаев, из женщин — в 25 и 33,3% случаев соответственно. Полученные данные подтверждают более высокую чувствительность бактериологического метода исследования и большее его значение при лабораторной диагностике трихомониаза у женщин.

Применение РИФ-40 абс дало положительные результаты у тех женщин, у которых в мочеполовых органах обнаружены трихомонады либо бактериоскопическим, либо бактериологическим методом (11,6—33,3% соответственно).

В табл. 2 представлены данные, указывающие на концентрацию противотрихомонадных антител в сыворотке крови больных трихомониазом.

Таблица 2. Степень позитивности РИФ-40 абс при исследовании сыворотки больных трихомониазом

Больные трихомониазом	Число больных	Число положительных результатов со степенью позитивности		
		при РИФ-40 абс	со степенью позитивности	
			4+, 4,3+	3-, 3,2+
Мужчины	14	14	12	2
Женщины	40	40	32	8
Всего	число %	54 100	44 81,9	10 18,3

Видно, что у 81,9% больных наблюдалась высокая позитивность реакции, причем большое количество антител определялось и у мужчин, у которых выявление возбудителя общепринятыми методами затруднено из-за меньшего числа трихомонад в отделяемом по сравнению с женщинами. Из 120 обследованных мужчин и 120 женщин общепринятыми лабораторными методами трихомонады обнаружены у 54 больных, в то время как при РИФ-40 абс получено 79 положительных результатов. В 25 случаях, когда положительным был только РИФ-40 абс, кон-

центрация противотрихомонадных антител в сыворотке крови была значительной как у мужчин, так и у женщин (табл. 3).

Таблица 3. Положительные результаты РИФ-40 абс у пациентов с отрицательным результатом однократного бактериоскопического и бактериологического обследования на трихомониаз

Пациенты	Число пациентов	при РИФ-40 абс	количество положительных результатов со степенью позитивности	
			4+, 4/4+	3+, 3/4+
Мужчины	106	12	9	3
Женщины	80	13	8	5
Всего	186	25	17	8

В связи с тем, что у 25 пациентов была положительной только РИФ-40 абс, они были повторно обследованы на трихомониаз. В результате 2—4-кратного бактериоскопического обследования у 20 пациентов были обнаружены трихомонады, в то время как у 5 (3 мужчины, 2 женщины) их определить не удалось. У жены одного из этих мужчин был диагностирован трихомониаз. Остальные представляли собой супружеские пары.

Для определения специфичности РИФ-40 абс были обследованы сыворотки у 45 детей, лечившихся в соматическом отделении детской больницы. Во всех случаях получены отрицательные результаты.

Обобщая полученные результаты, можно сказать, что воспалительный процесс в мочеполовых органах обнаружен у 91,5% мужчин и женщин с нарушенной репродуктивной функцией. У 21,6% мужчин и женщин с воспалительным процессом мочеполовых органов выделены влагалищные трихомонады.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беднова В. И., Нафтольева Ю. О. Тез. докл. 6 Всесоюз. съезда дерматовенерологов. Харьков, 154—155, 1973.
2. Беднова В. И., Нафтольева Ю. О. Акушерство и гинекология, 12, 52—53, 1977.
3. Зильман С. И. Канд. дисс., М., 1980.
4. Крамар Ж., Куцера К. Ж. Гигиена и эпидемиология, 10, 76, 1963.
5. Петров П. П. Мат-лы научн. конф. млд. уч. мед. биол. фак-та ЦО. ПИУВ, 38—40, М., 1968.
6. Петров П. П. Канд. дисс., М., 1976.
7. Гинрибидисеви М. И. Канд. дисс., М., 1976.

Поступило 4.1.1987 г.

«ФАГОБАКТЕРИОМАХИЯ»*

Շ. Մ. ЯБЛОКОВ-ХИЗОРЯՆ

Институт зоологии АН Армянской ССР, Ереван

Аннотация — Изучена модель эволюции бактерий, в основу которой положен антагонизм между бактериями и вирусами, существующий по сей день. Он привел к включению генома профага в геном бактерии (исходный симбиоз) и к громадному обогащению генома бактерии (биохимическая эволюция). Так создалось новое эволюционное направление, названное «виrogenным». Появление эукариот и их ядра объясняется проникновением в хрупкую клетку бактерии мелкой дефектной, вроде современных бделловибрио (исходная гаметогамия), которая, однако, не разрушила реципиент, но ее хромосома проникла в клетку донора путем трансдукции, создав ядро новой клетки. Тогда же в эту клетку проникали и другие, создавшие в дальнейшем митохондрии и хлоропласты. Обсуждаются также некоторые другие модели.

Անձամայրություն — Ուսումնասիրված է բակտերիաների էվոլյուցիայի մոդելը, որան վերաբերելով բակտերիաների և վիրուսների պայքարի հիմնական պրոցեսը որը շարունակվում է առ այսօր: Սա բերում է պրոֆագի գենոմի հետ (սկզբնական սիմբիոզ) և բակտերիայի գենոմի հսկայական հարստացում (կենսաքիմիական էվոլյուցիա): Այսպես առաջացել է «վիրոգենային» նոր էվոլյուցիոն ուղղությունը, էուկարիոտների և նրանց կորիզների առաջացումը վերաբերվում է բակտերիաների խոշոր բջի մեջ փոքր գեֆեկտային բջի թափանցմանը, ժամանակակից բդելովիրրիո ձևով (սկզբնական գամետոգամիա), որը դեռևս չի բաշխվել ունցիպիենտին, բայց նրա բրոմոտոր թափանցել է գոնորի բջիների մեջ տրանսդուկցիայի հանապարհով, առաջացնելով նոր բջի կորիզ: Արևելույն ժամանակ այս բջի թափանցել է և այլ բջիներ, հետագայում առաջացնելով միտոքոնդրիաներ և բլորոպլաստներ: Փննարկվում է և նաև մի քանի այլ մոդելներ:

Abstract — A model for the evolution of the bacteria is proposed. The leading process is attributed to the struggle between them and the viruses, called „phagobacteriomachia“, which continues till now. It caused the inclusion of the genome of the prophage in that of the bacteria („initial symbiosis“), which resulted in a drastic increase of the latter (the biochemical evolution). So arised a new evolutionary trend called the „virrogenic trend“. The appearance of the eucaryots and of their nuclei was attributed to the penetration into a big bacterial cell of a small defective one alike that of modern bdellovibrio (initial gametogamy), which however did not destruct the recipient, the chromosome of which entered the do-

* Термин автора

nor cell via transduction, creating the nucleus of the new cell. At that time this cell entered also other cells, from which arised the mitochondria and chloroplasts. Some alternative models are discussed.

Ключевые слова: эволюция, вирусы, прокариоты, транспозоны

В последние годы все более убедительно доказывается симбиотическое происхождение многих клеточных органелл, что привело к расцвету старой теории симэмбриогенеза. Также доказано непостоянство генома организмов [23] и способность его элементов странствовать не только в клетках, но также из организма в организм («прыгающие гены»). Особенно большое впечатление произвело появление у многих прокариот новых для них генов, заимствованных ими у других, даже отдаленных штаммов, для их защиты от антибиотиков. Таким образом, создалось впечатление, что прокариоты способны черпать нужную им информацию наследственности из общего генофонда прокариот, т. е. что их большинство составляет единую генетическую популяцию, если понимать под панмиксом способность обмениваться информацией наследственности не только половым, но и любым из доступных путей, в том числе путем трансдукции, сексдукции, трансформации, обмена плазмидами и эписомами, обратной транскрипции, информационного удара, трансгенезиса, трансекции и т. д. [4]. Так что «значительная доля наследственной изменчивости вызывается... перемещающимися элементами [23, 6], чем, конечно, не исключается роль мутаций классического типа, хромосомных перестроек, амплификации генов, гаметогамии и разных эпигенетических преобразований. В свете этих данных модная в прошлом синтетическая теория Эволюции сейчас нуждается в пересмотре, как на это указывают, например, Дубинин или Макклиток [11, 49], тогда как симбиотическая теория отразилась и на молекулярном уровне. Так, сейчас многим «органеллам» прокариот охотно приписывают вирусное происхождение, а новым органеллам эукариот — клеточное, что не мешает существовать множеству одноклеточных симбионтов классического типа, тогда как многоклеточные симбионты способны лишь к сожительству, правда, весьма разнообразному. В этом отношении интересно напомнить наблюдения Жиара (Giard), который был поражен сходством в протекании процессов развития некоторых эндопаразитов и зародышей у плацентарных млекопитающих.

Из совокупности имеющихся данных следует, что одним из основных направлений процессов жизнедеятельности организмов является их стремление к объединению или симбиозу, это направление вызвано однородностью их нуклеотиновых кислот и универсальностью генетического кода, правда, с некоторыми отклонениями. Оно нашло свое отражение в единстве плана строения и организации всех клеток, в строении белков, мембран, в процессах метаболизма, эндоцитоза и т. д. Но, наряду с этим направлением, создалось и обратное, выражающееся в способности отличать свое от чужого, проявляющееся уже на молекулярном уровне, оно вызвано почти бесконечным разнообразием в строении и функциях белков и привело к стремлению клеток и организмов удалять чужое путем экзцитоза и отторжения тканей, в процессах выделения

разнообразнейших веществ и образований, в том числе гамет, яиц, детенышей и т. д., и во множестве антагонистических реакций.

Этим двум основным направлениям подчиняется вся жизнедеятельность организмов, но они оба подвергаются значительным изменениям и переплетениям, что отразилось на их громадном разнообразии, на условности представлений о целостности организма, как это явствует из примеров колоний или кормусов, из таких понятий, как таксоны, в том числе и видовой у разных групп организмов, в первую очередь у прокариот и эукариот, из загадочного отсутствия паразитов у всех вторичнокоротых [37] и т. д. Наконец, эти направления неизбежно отразились и на всем ходе Эволюции.

У прокариот этот ход в целом можно свести к следующему:

На примитивной Земле сначала возникли вирусоподобные структуры, которые размножились за счет скоплений органических веществ абиогенного происхождения, уже содержащих все вещества, необходимые для синтеза первых белков. Их можно назвать «эовирусами». От некоторых из них путем симбиоза создались первые клетки, с которыми уже несомненно прочие эовирусы должны были вступить в конкуренцию из-за пищевого субстрата. Но эовирусы могли научиться проникать в эти клетки из-за проницаемости примитивной клеточной мембраны, превратившись тем самым в вирусы. Соответственно, уже на заре жизни между вирусами и клетками должно было начаться сражение, бесперебойно продолжающееся до настоящего времени, но с переменным успехом, это сражение можно назвать «фагобактериомахией»*. Однако оно должно было привести к выработке у обоих партнеров соответствующей стратегии, которая не могла не оказать решающего влияния на всю их эволюцию. Со временем в это сражение включились и эукариоты.

Появление фотосинтеза часто приписывают обеднению природных запасов органических веществ, вызванному прожорливостью бактерий, но его в еще большей мере следует приписать активности эовирусов и силу их гораздо большей подвижности. Поэтому долгое время пролиферация бактерий должна была регулироваться всемогущими эовирусами и это до тех пор, пока обогащение атмосферы кислородом не привело к исчезновению и исходных клеток, и эовирусов. Но вирусы приспособились, тогда как анаэробные бактерии, хотя и выжили, но сильно пострадали, а аэробные размножились, сохранив, однако, в реликтовой форме процессы синтеза тех веществ, которые были свойственны анаэробам, сумев защитить их от окисления, что не помешало им использовать кислород для синтеза новых метаболитов путем удлинения цикла Кребса и создания новых метаболических процессов. На этом этапе основную массу прокариот должны были составлять продуценты: синезеленые бактерии и прохлорофиты (зеленые прокариоты).

Что же касается эволюции стратегии фагобактериомахии, то у клеток она должна была выразиться в создании эндоцитоза, связанного с появлением нужных рецепторов и лизосом. Это позволило клеткам пи-

* Термин автора.

таться и вирусам, хотя фагоцитоз и пиноцитоз появились лишь у эукариот. Но сейчас, в противоположность эукариотам, вирусы не являются питательным субстратом ни для одного прокариота, а эндоцитоз оказался удобным процессом для проникновения вирусов в клетки разными путями [12, 53, 57, 58], в частности, с помощью образований, подобных шприцу, испрыскивающих их геном в бактерию через ее мембрану или ворсинки (информационный удар) или путем быстрого освобождения из лизосомы [53]. В результате оба партнера были вынуждены перестроить свою стратегию.

От вирусов клетка может защищаться мутациями, но мутируют и вирусы, а большим преимуществом их является гораздо большая по сравнению с бактериями подвижность. Поэтому клетки усовершенствовали свою мембрану, аппарат белкового синтеза и т. д. Но и вирусы усовершенствовались и увеличили свой геном, в основном за счет генома клеток, так как многие вирусы клеточного происхождения, что, однако, вызвало их все большую специализацию в выборе жертв.

Поворотным моментом в эволюции прокариот следует считать появление нового направления, называемого нами «виrogenным». Оно создано благодаря способности генов вирусов включаться в геном прокариот, как это давно уже было установлено блестящими исследованиями Ф. Жакоба у лизогенных бактерий [12]. Им обнаружены плазмиды, называемые энзосомами, ДНК которых включается в хромосому бактерий временно или постоянно, вызывая иногда их конъюгацию и перенос генетической информации из клетки в клетку. Сейчас доказано существование такого «горизонтального» переноса генов путем трансдукции, сексдукции, с помощью транспозонов IS-элементов и т. д. Благодаря этому процессу («неходный иммунитет») клетки оказались защищенными от соответствующих вирусов [6], увеличив заодно свой геном, что со временем привело к громадному обогащению их метаболизма, который даже сейчас гораздо разнообразнее, чем у эукариот, сумевших лишь частично использовать их наследие, хотя эукариоты приобрели ряд ценных новых свойств, в том числе способность синтезировать стероиды, фагоцитоз и т. д. Этот процесс можно рассматривать как неходный образец превращения паразита в симбионт, столь характерный для одноклеточных.

Сейчас механизм перехода вируса в латентное состояние профага тщательно изучен на молекулярном уровне [53]. Он вызван воздействием двух регуляторных белков на два сайта, расположенных рядом на участке вирусной ДНК, когда они свободные, т. е. не заняты ингибиторами, что может быть достигнуто также воздействием извне, например, радиацией, причем освобождение сайта—сложный процесс, неодинаковый для каждого из них. В одном случае образуется профаг, в другом—вирус разрушает бактерию. Хотя такой механизм изучен у немногих бактерий, он должен существовать, пусть в виде ряда вариантов, у всех профагов. Иными словами, геном бактерий может включать те вирусные геномы, которые обладают установкой для переключения их деятельности, что привело к приобретению им лишь генов, которые уже неходно обладали переключающимся механизмом под воздействием

определенных импульсов, в том числе и в связи с метаболизмом клетки. Именно такой механизм мог породить клеточный онтогенез. Те же вирусы, которые не обладали нужной установкой, должны были либо погибнуть после уничтожения своего пищевого субстрата, либо превратиться в часть клеточного генома, неспособную активироваться.

Согласно предложенной трактовке, в геноме клеток должны существовать гены двух типов, в том числе гены, активные постоянно, и такие, которые активны временно, хотя те и другие могут мутировать. Первые, по-видимому, немногочисленные, известны, например, у акразий, о чем говорится ниже, гены второго типа, по-видимому, гораздо более многочисленные, подчиняются контролю клетки, что позволяет им управлять большинством процессов метаболизма, хотя известны и другие механизмы переключения деятельности некоторых клеточных функций [6, 23, 54].

Таким образом, основное направление эволюции прокариот привело к громадному обогащению их генома и метаболизма при скромных морфологических изменениях, по-видимому, потому, что такие изменения не могли отразиться на фагобактериомахиин. У эукариот метаболизм обогатился меньше, а частично обеднен, но морфология изменилась резко (морфологическая эволюция), уже у протистов, потому что они от вирусов защищены гораздо лучше, чем бактерии [2], как, впрочем, и все многоклеточные, но оказались окруженными новыми врагами и конкурентами. Так, многие водоросли обладают антибиотическими, а также бактерицидными свойствами, а хлореллы, изъятые из их хозяев, гидр или инфузорий, уничтожаются вирусами [61], чем выявляется еще одна полезная роль симбиоза, столь обычного у организмов.

В Эволюции самым загадочным моментом является, пожалуй, появление эукариот, до сих пор не нашедшее убедительного объяснения главным образом из-за отсутствия промежуточных форм, доступных полноценному исследованию. Правда, в свете теории симбиогенеза можно объяснить происхождение таких органелл, как митохондрии, пластиды, базальные гранулы жгутиков и ресничек, а также, по-видимому, любых структур, обладающих собственным аппаратом белкового синтеза. Но если в большинстве случаев им можно приписать монофилетическое происхождение, то пластиды, структура которых очень разнообразна, должны были образоваться от разных предков, в том числе и эукариотических. К сожалению, уточнение природы этих предков часто затрудняется из-за перехода части их генома в ядерный геном и связанной с этим процессом перестройки их структуры и функций. В частности, известны примеры хлоропластов прокариотического происхождения, проникнувших в эукариоты с помощью других эукариот [65]. Но все существующие гипотезы о происхождении ядра достаточно спорны. Сейчас наиболее правдоподобной моделью этого процесса можно, по-видимому, считать следующую.

Ядро образовалось из клетки мелкого прокариота, проникнувшей в клетку крупного таким же путем, каким и такие клетки проникают бактерии из рода *Buelleribrio*, хотя сейчас эти последние не пересекают клеточную мембрану, а свою жертву поедают, тогда как, согласно пред-

ложенной модели, допускается, что обе клетки выжили, а хромосома реципиента проникла в клетку донора путем трансдукции, так что в новом ядре появились две хромосомы. Но в создавшейся химере защитные приспособления реципиента против чужих элементов нарушились, что позволило проникнуть в него другим клеткам, в дальнейшем превратившимся в митохондрии и пластиды, а также спирохетам, но лишь этим последним удалось достигнуть ядра, да и то, вероятно, на более позднем этапе. Оболочка донора преобразовалась, в результате чего в ней создались поры, появились аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум. Таким образом, согласно этой модели, ядро и оргanelлы возникли в результате единого, хотя и длительного процесса, чем можно объяснить отсутствие сейчас промежуточных форм.

Кроме появления ядра основные новообразования эукариот сводятся к следующему: 1) появление вокруг их ДНК белкового матрикса; 2) в оболочке ядра образование пор; 3) образование ряда новых оргanelл, в том числе эукариотических хлоропластов; 4) появление мейоза, мейоза, гамет и полового процесса; 5) усовершенствование строения хромосом.

1) Белковый матрикс эукариот содержит кислые и щелочные белки (гистоны). Сейчас те и другие обнаружены у некоторых прокариот, а гистоны также у панцирных жгутиконосцев (*Dinoflagellida*), но они редки и матрикса не образуют [20]. Соответственно и разрыв между про- и эукариотами в этом отношении незначителен.

2) В клеточной оболочке прокариот пор нет, но их нет и в ядрах некоторых панцирных жгутиконосцев. «Наиболее значительна оболочка «прокариотического ядра» трофозонта *Noctiluca*..., она двухмембранная..., но полностью лишена пор. Однако к внутренней стороне оболочки прилегает множество (8—11 тысяч) пузырьков или ампул диаметром меньше одного мкм, которые ограничены парой концентрических мембран, пронизанных частыми типичными порами. Вещества, выходящие из ядра, проходят через пору в полость ампулы, а затем стенки каждой ампулы сливаются с оболочкой ядра, и ее содержимое изливается в цитоплазму через образовавшееся отверстие..., ампулы представляют собой постоянное впячивание обеих мембран ядерной оболочки и все время связаны узким выводным каналом с цитоплазмой..., отмечают выход гранул РНК... сходные ампулы обнаружены также у свободно живущих *Gymnodinium fuscum* [20: 115]. Эти данные позволяют наметить путь преобразования прокариотической мембраны в ядерную путем экзоцитоза. Известны также многие примеры резкого выпячивания стенки ядра в цитоплазму и обратно и отделение участков ядерных мембран, они могли привести к образованию аппарата Гольджи и эндоплазматической сети. «Широко распространено мнение, что ядерная оболочка—часть общей системы эндоплазматической сети клетки. Об этом говорит наличие рибосом и полисом на цитоплазматической стороне внешней ядерной мембраны, а также частые переходы внешней мембраны ядерной оболочки в мембрану цистерн гранулярной эндоплазматической сети... она же «может служить образующей поверхностью аппарата Гольджи (диктиосом). От нее отпочковы-

наются мелкие «переходные» пузырьки, которые, сливаясь между собой, образуют проксимальную цистерну диктиосомы. В результате диктиосома (часто единственная в клетке) непосредственно «сидит» на поверхности ядра... у гилермастигиды *Lophomonas blattarum* от наружной оболочки отходят длинные трубочки, покрытые многочисленными рибосомами [20: 36, 37]. Такие трубочки также могли породить эндоплазматическую сеть.

3) Уже самые примитивные бактерии имеют рибосомы, структурно мало чем отличающиеся от вирусов, они, по-видимому, как и плазмиды [52], вирусного происхождения. Особенно убедительно симбиотическое происхождение митохондрий, так как их генетический код несколько отличается от универсального [32], чем доказывается их происхождение от каких-то сейчас исчезнувших бактерий, если только такие бактерии не будут обнаружены в дальнейшем, а у них так много сходства с пластидами, что симбиотическое происхождение этих последних, постулированное давно, сейчас достаточно правдоподобно [18, 34], хотя их генетический код до сих пор не разгадан.

Замечательна однородность строения эукариотических жгутиков, обычно состоящих из 11 двойных микротрубочек (2+9), но с некоторыми отклонениями [30]. В частности, вместо двух срединных жгутиков может иметься лишь один, у млекопитающих существует дополнительное кольцо из 9 двойных микротрубочек и некоторое количество простых, дополнительные простые микротрубочки встречаются и у насекомых, но они иного строения, а у их сперматозоидов среди кокцид и двукрылых (*Sciaridae*) жгутик может насчитывать множество двойных микротрубочек, закрученных спирально, в пределах 350 (у *Rhynchoscirta sp.* [56]), тогда как в их соматических клетках жгутики типичные. Совокупность этих данных ратует в пользу монофилетического происхождения всех этих жгутиков и от прокариот, так как у жгутиконосца *Mixotrichia paradoxa* тело одето спирохетами, функционирующими как реснички, хотя оно также вооружено четырьмя жгутиками прокариотического типа строения [50], а типичные трубочки тубулина эукариот обнаружены у некоторых других спирохет [18], хотя остается выяснить, не возникли ли эти жгутики от перемешивающихся элементов.

Замечательно также, что деление всех этих симбионтов прокариотического типа и часто протекает асинхронно с клеточным, а amitoz известен лишь для макронуклеуса инфузорий и некоторых клеток многоклеточных (что приводит к неравномерному распределению их генов в потомстве), тогда как митоз не обнаружен ни в одном случае.

4) Митоз и мейоз специфичны для эукариот. Они удивительно разнообразны у протистов [20, 43] и замечательно однотипны у многоклеточных, всех их можно вывести из одного исходного процесса. «Примитивность закрытого внутриядерного плевромитоза признает большинство современных авторов» [20: 94], в том числе и сам Райков. В этом случае митотический аппарат расположен полностью в ядре, оболочка которого никогда не разрывается. При клеточном делении образуются рядом два независимых полуверетена, по-видимому, симбиотического происхождения, которые, мигрируя, в анафазе достигают два противо-

положительных полюса ядра, экваториальной пластинки нет. Центриоли и кинетохор имеются или отсутствуют, а за образование веретена ответствен «центр организации микротрубочек», который не связан с центриолями и в данном случае внутриядерный [20], ему также приписывают симбиотическое происхождение [18]. Эти данные также согласуются с предложенной выше моделью. Такой тип митоза известен у разных грибов, в том числе у дрожжей, плазмидиев, миксомицетов, водоросли *Vaucheria*, но отсутствует у панцирных жгутиконосцев, которых сейчас охотно выделяют в особый тип—*Mesocaryota*, рассматриваемый как ветвь, рано обособившуюся от прочих эукариот. Ее хромосомы имеют кольцевое строение, как у прокариот, и своеобразный закрытый внеядерный плевромитоз (диномитоз), при котором веретено располагается вне ядра [20].

Мейоз явно образовался из митоза, его наиболее примитивный тип, одноступенчатый мейоз, мало чем отличается от митоза, он создан путем конъюгации хромосом и может протекать как до, так и после гаметогамии [20], но связан с полным процессом, который рассматривается ниже, являясь этапом восстановления нормальной гаплоидной стадии существования примитивного организма, тогда как зигота necessarily представляет его покоящуюся стадию, полезную лишь для его выживания при неблагоприятных условиях среды (вариант анабиоза).

5) Особенности строения хромосом у эукариот сводятся к образованию нуклеосом, ядрышкового организатора, кинетофора, к продольной дифференцировке хромосом и к появлению нитронов, которые, однако, обнаружены и у некоторых прокариот. У протистов все эти особенности могут и отсутствовать, они, по-видимому, полифилетического происхождения, некоторые из них могли образоваться от перемещающихся элементов, в особенности от вирусов. Для многоклеточных также характерно разделение интерфазы на три этапа (G_1 , S , G_2), отсутствующих у прокариот, но у протистов они протекают с рядом вариантов, так что и здесь четкого скачка не наблюдается.

Таким образом, в происхождении эукариот главной загадкой является появление клетки, обладающей примитивным митотическим аппаратом, по крайней мере с двумя хромосомами (лишь пара хромосом имеется у многих протистов), так как в природе до сих пор таких клеток не обнаружено.

Но взаимодействие вирусов и клеток породило также процесс конъюгации бактерий и половой процесс эукариот.

Механизм полового процесса до сих пор не выяснен, но создается впечатление, что проникновение ДНК в чужую клетку вызвано определенным фактором, который можно назвать мужским. Как сейчас хорошо известно [12, 17], конъюгация бактерий связана с действием полового фактора, являющегося полинуклеотидом плазмидного происхождения. «Общая особенность фагов и плазмид это то, что у тех и у других имеются гены, кодирующие синтез специфических приспособлений для переноса генетического материала из клетки в клетку» [17: 606]. Аналогичный фактор должен иметься и у прочих организмов, и клетку он исходно должен был проникнуть вместе с профагом, сначала временно, а затем окончательно включившись в ее геном. Этот ген (или

набор генов) сохранился, по-видимому, у всех эукариот, у самцов он активен, у самок — ингибирован, изредка лишь временно, о чем свидетельствует давно уже доказанная обополая потенция всех эукариот [44].

Сейчас часто допускают, что многоклеточные образовались от некоторых жгутиконосцев [13, 43], у которых кариогамия известна лишь у немногих видов и ни в одном случае не изучена полностью на современном уровне, даже у излюбленного протистологами рода *Хламидомонас* [39], иногда относимого к одноклеточным зеленым водорослям. Однако и того, что известно, достаточно для признания потенциального наличия у всех гамет прогамной стадии с образованием гаметонов, синтезируемых клеткой лишь на этой стадии. Эти гаметоны выделяются в наружную среду, превращая другие клетки в гамету противоположного пола и вызывая сближение гамет обоих полов, сейчас их часто относят к феромонам. Они являются белками, синтезируемыми обоими партнерами в определенной последовательности. Такие гаметоны обнаружены у некоторых протистов, водорослей и грибов, в том числе у дрожжей, а у прокариот пока лишь у *Streptococcus faecalis* [60], у которого они имеются в некоторых плазмидях, способствуя их конъюгации. Эти гаметоны должны быть вирусного происхождения, так как, согласно предложенной выше модели, геном эукариот должен был сохранить богатый набор вирусных генов, в том числе и гены, исходно токсические для клеток, от них могли образоваться колицины и родственные соединения, а также разные подвижные элементы. Но клетки, выделяющие гаметоны, должны быть защищены от их воздействия по той же причине, по которой колициногенные бактерии защищены от своих колицинов, лизогенные клетки — от своих профагов, парамитии — от своих риккетсий (каппа-частиц), клетки — от своих эндогенных вирусов, ядовитые животные — от своих ядов, а организмы, подвергшиеся инфекции — своими иммунными реакциями. Но у жгутиконосцев гаметоны повреждают гаметы того же пола, а прогамные клетки многоклеточных могут погибнуть от чужих гаметонов, так что лишь их части удастся образовать гаметы, а еще меньшей — зиготу.

В ходе Эволюции действие гаметонов должно было отразиться не только на кариогамии, но также на управлении всего хода онтогенеза, на гибели некоторых клеток, на дифференцировке, замедлении, ускорении или торможении роста и деления других, на их метаболизме и даже на всей жизнедеятельности организма, придав ему его целостность, но по-разному в разных органах и тканях, а также у разных таксонов. Именно благодаря гаметонам оказалось возможным образование многоклеточных, так как все многоклеточные обладают половым процессом или его производными и, следовательно, выделяют гаметоны. Но гаметоны получили со временем разные наименования, как гормоны, феромоны, биогенетически активные вещества, факторы роста и т. д. Иными словами, именно половой процесс оказался исходным стимулом для создания и развития онтогенеза многоклеточных.

Сохранились ли следы от исходных этапов этого онтогенеза?

По-существу, все прокариоты одноклеточные, но многие из них образуют скопления, иногда похожие на примитивные водоросли, а у некоторых из них намечаются зачатки онтогенеза [64]. Такой онтогенез известен у *Caulobacter crescentus*, у которого могут образоваться два типа клеток, один из них снабжен стебельком, с помощью которого клетка прикрепляется к субстрату, а другой несет жгутик и может плавать. *Streptomyces coelicola* разрастается в мицелий с «воздушными» проростками, содержащими цепочки спор. У *Bacillus subtilis* при нехватке пищи может появиться двухклеточный спорангий, в одной из этих клеток образуется эндоспора, освобождающаяся после лизиса спорангия. У *Mycococcus xanthus* также при нехватке пищи клетки сливаются в крупные скопления, часть из них гибнет, прочие образуют грибное тело, содержащее споры в результате химического взаимодействия между клетками.

Эти примеры явно напоминают некоторые процессы у примитивных эукариот, особенно разительно сравнение *Mycococcus* с акразиями.

Акразии—одноклеточные миксаебы, питающиеся бактериями [44], при голодании они выделяют акразин, который оказался циклическим АМФ [48]. Под его воздействием акразии слипаются в многоклеточные образования—сорокарпы, окруженные оболочкой и напоминающие примитивные конидии. В них 95% клеток погибает, а 5% образуют цисты. Со временем сорокарпы разрушаются, а цисты освобождаются и могут длительное время оставаться в состоянии анабиоза, прекращающегося с появлением пищи. Оболочка сорокарпов состоит из полисахаридов [66], синтезированных ферментами, всегда имеющимися в клетках акразий, но в норме синтезирующими гликоген. При нехватке пищи эти ферменты переключаются на синтез полисахаридов оболочки сорокарпов. Ни гамет, ни гамонов не образуется.

Менее примитивный онтогенез известен у солнечника *Actinophrys sol*. Здесь диплоидный трофозонт, переходя в покоящуюся стадию, окружает себя цистой и делится в ней редукционно, создавая две клетки и четыре ядра, из которых два, по одному в каждой клетке, дегенерируют, а оставшиеся сливаются, причем одно из них активно, а другое пассивно. В результате образуется зигота, которая в дальнейшем дробится и превращается в новые трофозонты. В этом цикле уже обособлена прогамная стадия, соответствующая редукционному делению клетки, проявляется разная активность гаплоидных изогамет и образуется зигота, но из двух клеток, гибель двух других можно приписать действию гамонов, а весь процесс напоминает зигогамию грибов. У родственного вида, *Actinosphaerium eichhorni*, цикл сходный, но усложняется образованием плазмодия с большим количеством ядер. Перед началом полового цикла 95% этих ядер погибают, совсем как у акразий, а остальные ядра мицелируются. Эти скромные данные в какой-то мере намекают этапы становления прогамной стадии.

В ходе эволюции эукариот половой процесс приобретает все большее значение, тогда как роль вирусов менее ясна. В частности, в морях и океанах, в которых длительное время протекал основной ход эволюции многоклеточных, роль вирусов сейчас, по-видимому, второстепенная.

Среди протистов [2] описано несколько специфических вирусов у амёб, плазмодиев и некоторых других групп. Некоторые протисты питаются вирусами, другие могут их сохранять, инактивировать или размножать, в том числе и штаммы, патогенные для многоклеточных. Описаны явления, подобные лизогении, иногда называемые виrogenезом. Но в какой мере протисты страдают от вирусов до сих пор не ясно, хотя они защищены от вирусов явно лучше, чем прокариоты. Среди беспозвоночных [4, 17] сколько-нибудь подробные данные имеются лишь для насекомых, которые могут сильно поражаться вирусами, у них также обнаружены профины, особенно тщательно изученные у дрозофилы [23], как и разные перемещающиеся элементы. У наземных растений вирусные заболевания обычны, у морских они, вероятно, редки.

Вирусные заболевания обычны и у позвоночных, в том числе у рыб и земноводных, но их высокий полиморфизм ограничивает интенсивность эпизоотий. Однако даже у человека численность населения до последнего времени в основном снижалась болезнями, в особенности детскими, часто вирусного происхождения, а удивительная сложность, а также совершенство и своеобразие иммунного аппарата позвоночных свидетельствуют о его длительной эволюции и громадной ценности для этих организмов. Хотя сейчас еще невозможно наметить вехи этой эволюции, она должна была неизбежно отразиться на всей филогении позвоночных.

В Эволюции наблюдается последовательный рост клеточного генома, но со значительными и часто неожиданными отклонениями у эукариот [6].

У вирусов и плазмид молекулярный вес генома может достигать 10^6 Дальтон, а у бактерий 10^9 и более. Так, у фага T4 он равен $0,9 \times 10^6$, у митохондрий мыши — 1×10^7 , у хлоропластов евглены — $0,9 \times 10^7$, у кишечной палочки — $2,5 \times 10^9$. У эукариот наибольший геном известен у некоторых амёб и напоротников (*Psilopsida*), что, однако, отчасти вызвано обилием интронов и полиплоидией. У дрожжей он в среднем равен $1,5 \times 10^9$, у дрозофилы — $1,1 \times 10^{11}$, у человека — $1,9 \times 10^{12}$ Д. У высших позвоночных он стремится стабилизироваться, у млекопитающих сходен с геномом человека, у пресмыкающихся в среднем ниже, но выше, чем у птиц, тогда как у рыб и земноводных он колеблется резко и может намного превысить объем генома всех прочих позвоночных. Так, геном американского чешуйчатника (рыба) в 35,4 раза крупнее, чем у человека. У растений геном также колеблется резко и без видимой связи с их филогенией. Однако по количеству структурных генов геном млекопитающих вряд ли превышает геном прокариот более чем на один порядок.

Возможные пути преобразования генома эукариот можно свести к следующим.

1) Мутагенный путь, под этим термином понимается перестройка последовательностей нескольких нуклеотидов, их вставки или делеции (микроделеции) в непочках ДНК под воздействием мутагенов классического типа или некоторых мелких перемещающихся элементов. Хотя мутации могут привести к изменениям в морфологии или физиологии

клеток, эти изменения градуальны, а поскольку большинство из них вредно, то организмы уже исходно стремились от них защититься, что достигнуто:

а) вырождением генетического кода, ограничивающим диапазон эффективных мутаций, б) заменой одноцепочной РНК генома двуцепочной ДНК и ее репарацией, в) переходом от гаплоидии к диплоидии и полипloidии, известных уже у протистов, г) к выработке защитных реакций, в особенности с помощью ферментов и полисахаридов (олигосахаридов [25]), д) элиминацией вредных мутантов.

Тем не менее и у многоклеточных мутации играют большую роль, как это, в частности, явствует из тщательного сравнения геномов человека и шимпанзе, которые незначительно отличаются друг от друга [68, 69].

2) Вирогенный путь, приведший к резкому и скачкообразному приросту генома прокариот с помощью перемещающихся элементов. От мутагенного этот путь отличается главным образом тем, что не изменяет строения уже имеющихся генов, но включает в геном новые, хотя известны и промежуточные явления. Именно этот путь блестяще применяется сейчас в генной инженерии, чем подтверждается его эффективность. Однако его роль в эволюции эукариот выяснена недостаточно, хотя весьма показательны последние работы по мозаичному строению многих генов [36, 59], которое заведомо создано этим путем. Также неясно, в какой мере эукариоты способны использовать гены прокариот и в какой приобрели новые вирусные геномы, а также какие признаки они способны передавать прокариотам, хотя известно много примеров вирусных включений в геном многоклеточных, в том числе человека и ряда млекопитающих, как молодых, так и очень древних, иногда и от протистов, чем доказывается возможность сохранения таких включений на протяжении миллиардов лет, тогда как обнаружены и молодые включения, например, у дрозофилы (смотреть ниже). Недавно [51] была опубликована статья о нахождении полного генома вируса Эпштейна-Барра в человеческих лимфоцитах, в том числе включенного в цепочку ДНК в виде вполне типичной эписомы, хотя этот вирус не обнаружен ни у одного примитивного многоклеточного.

Прирост генома в значительной мере связан с пролиферацией некоторых генов и с дальнейшей специализацией их потомства, но этиология этого процесса спорная. Правда, сейчас установлено, что ревертаза вызывает амплификацию генов рибосомной РНК у дрозофилы, амфибий и на определенной стадии онтогенеза в ее дальнейшую транскрипцию с образованием новых генов. «Все эти данные делают весьма правдоподобным тот факт, что амплификация генов происходит посредством обратной транскриптазы» [5: 336], следовательно, вирогенным путем. Но при амплификации генов допускается, что «чаще гены дублируются благодаря неравному кроссинговеру» [23: 7], следовательно, половым путем.

В свете изложенных выше соображений наиболее вероятным процессом образования повторов можно считать следующий.

Поскольку основная масса генов должна была образоваться из профагов, эти гены могли сохранить способность отделяться от своих хромосом, как это происходит у лизогенных бактерий. Но у них профаж включается в капсид и разрушает клетку. Но если этот процесс будет нарушен, например, вследствие мутации, так, что капсид не образуется, вирус не сможет выйти из клетки, но способен снова включиться в состояние, и, возможно, многократно, что приведет к накоплению повторов любого типа. Однако даже если удастся доказать существование такого процесса, из этого не следует правомочность отрицания наличия и других путей образования повторов, в том числе и через кроссинговер.

Как бы то ни было, повторы могут перестраиваться, образуя семейства «супергенов» [45], обладающих сходной, но не тождественной структурой, и выполняющих разные функции. Таких семейств известно много, но они способны объяснить лишь часть прироста генома.

Поскольку виругенный путь приводит к включению в геном новых генов, именно ему следует приписать появление многих скачков в ходе Эволюции. Но этот путь, явно доминирующий у прокариот, у эукариот, вероятно, затухал и был частично заменен полиплоидией.

3) Половой путь явно образовался из процесса конъюгации бактерий, при котором хромосома донора переносится в реципиент, правда, почти всегда лишь частично [6]. Хотя конъюгация—производное виругенного пути, она создала новый процесс, связанный с переносом и рекомбинацией хромосом, следовательно, с еще более крупными отрезками ДНК, чем при виругенном пути, так как в яйцеклетку проникает целый набор хромосом и их отрезков, но обычно лишь от особей одного и того же вида, что приводит к резкому обогащению генофонда, но лишь изредка к видообразованию и слабо отражается на общем ходе Эволюции. К половому пути относятся также все хромосомные перестройки, связанные с кроссинговером, партеногенез, апогамия и родственные процессы, а также полиплоидия. Уже тот факт, что половой процесс обычен у многоклеточных, свидетельствует о его большой ценности для выживания популяций, но роль гибридов у животных и растений разная.

У растений почти каждая клетка способна создать новый организм и воспроизводиться, даже лишь вегетативным путем на протяжении многих тысячелетий, в результате чего даже стерильные гибриды могут сохраняться, расселяться и размножаться, если обладают нужными преимуществами в борьбе за существование, а также стать фертильными путем амфилоидии. Поэтому биологическая изоляция может быть легко обойденной, а половой процесс может являться в весьма разнообразных формах, сочетая апогамию и полиплоидию, в том числе и автогамию, автополиплоидию, аллополиплоидию, автоаллополиплоидию, агамоспермию, анеуплоидию, аноспорию, диплоспорию, псевдогамию и т. д. [8]. Этими путями гибридная стерильность компенсируется образованием множественных межвидовых форм, как микровиды или сингамеоны, которые таксонами не признаются, но создают «сечетчатую» эволюцию, при которой видовая специфика затухает. Таким образом появляется промежуточная форма Эволюции между панмиксом прокариот и эволюцией животных, у которых все организмы обра-

уются из зиготы или ее партеногенетического аналога. Поэтому, тогда как у растений известно много видов явно гибридного происхождения [41], в том числе и созданных человеком, а для многих других оно очень вероятно, у животных достоверные примеры видовых гибридов редки [1], а партеногенез—редкое исключение [64], хотя полиплоидные соматические клетки обычны.

Прибавим, что хотя ботаники обычно отрицают возможность образования новых таксонов надвидового ранга, даже родов, путем сетчатой эволюции [8], давно уже приведены примеры родовых признаков, явно мозаичного типа [19, 47], хотя пути такой гибридизации остаются невыясненными.

Но изменчивостью генома вопросы Эволюции далеко не исчерпываются. В частности, большое значение имеет природа связей генотипа с фенотипом, но по этому вопросу, увы, никаких четких современных данных нет, а эффект Болдуина до сих пор не разгадан. Этот эффект уже в начале века был сформулирован почти одновременно гремья биологами [24, 27]. Согласно ему, в популяциях закрепляются лишь те мутации, которые соответствуют в них уже имеющимся модификациям, т. е. когда они являются генокопиями. Если такой эффект в самом деле существует, то он должен был резко отразиться на всей Эволюции, но проверить его существование до сих пор не удалось, так как результаты проведенных для этой цели опытов можно истолковать по-разному [11]. Также загадочно уже старое указание о наличии почти у всех модификаций своих генокопий, а у мутаций—фенокопий [42], так как природа этих корреляций непонятна, как, впрочем, и многие другие особенности связей генотипа с фенотипом.

Для понимания хода Эволюции большую ценность представляют работы акад. Шмальгаузена [24], выдвинувшего понятие о двух типах отбора [27]. Прекрасной иллюстрацией этих представлений может служить выдающаяся работа Криштофовича по полихронным флорам [16], в которой описывается чередование длительных геологических периодов, во время которых эволюция растительности как бы замирала, с короткими периодами ее бурного преобразования, синхронными с резкими климатическими сдвигами. Сходные явления известны и для фауны [26], за рубежом они привели к выдвиганию новой модели хода Эволюции [38], а уже в начале прошлого века Кювье (G. Cuvier) опубликовал свое учение о катаклизмах, сейчас возрожденное в новой версии [29], правда, достаточно спорной.

Однако этими представлениями вопрос о роли в Эволюции естественного отбора не исчерпывается [28].

Роль симбиогенеза в Эволюции обсуждается издавна. Основной вехой в этом направлении послужило обнаружение симбиотического происхождения лишайников, впервые описанного де Бари [33] в 1879 г., хотя уже в 1867 г. Фаминцын и Баранецкий установили их двойственную природу [18]. В дальнейшем лишайники изучались многими, в том числе и отечественными, ботаниками Фаминцыным, Мерзжковским, Козо-Полянским и т. д. [22]. Издавна защищалась гипотеза симбиогенетического происхождения хлоропластов, хотя лишь недавно удалось

их воспроизводить искусственно. За последние годы теория симбиогенеза обогатилась новыми данными [18] и находит все большее признание. Наоборот, представление о «прыгающих генах», выдвинутое почти полвека тому назад, широкое признание нашло лишь недавно. В этом вопросе экстремальную позицию занял Кордьюм [14].

Согласно его «информационной концепции Эволюции», виды — это системы, открытые для обмена информацией прямо или косвенно... со всеми живыми существами Земли» [14: 118], «вид без информационного обмена с остальной живой материей способен лишь к микроэволюции», «новые таксоны появляются чаще всего не незаметно, а вдруг и сразу в виде готовой популяции» [14: 134], а в геноме эукариот всегда имеется «спящая» ДНК экзогенного происхождения как производное обмена информацией с внешней средой, которая, однако, в дальнейшем в основном элиминируется, но может привести, хотя и кратковременно, к образованию нецелесообразных структур, способных быть в дальнейшем переработанными клеткой.

Здесь вряд ли уместно подвергать эту концепцию детальному обсуждению, тем более что она вызвала уже достаточно обильную критику, поэтому мы ограничимся лишь несколькими замечаниями.

В эволюции животных четко прослеживается тенденция все лучше защищаться от воздействий внешней среды, уже у протистов, путем образования ядра, защитных покровов, в том числе раковины, и т. д. Параллельно повышается целостность организма, все более четко обособляются особи и таксоны, и совершенствуются иммунные реакции, диапазон изменчивости популяционного генофонда ограничивается, хотя и обогащается половым процессом. А ведь если Кордьюм прав, каждый вид был бы обречен на постоянное перерождение с образованием уйма химер, тогда как и те немногие химеры, которые известны науке, заведомо не создались перемещающимися элементами. Наконец, ни в громадном опыте селекционеров, ни в еще большем опыте врачей, ни в уже многочисленных генных картах, ни в палеонтологической летописи, ни в сравнении генома человека и шимпанзе, упомянутом выше, никаких данных в пользу концепции Кордьюма не обнаружено, на что сетует и он сам. Поэтому все имеющиеся данные свидетельствуют о постепенном затухании роли перемещающихся элементов в ходе Эволюции, хотя жизнь хранит еще множество неразгаданных тайн.

Согласно предложенной выше трактовке, сначала возникли вирусы, а затем клетки. Хотя это предположение выдвинуто давно, оно до сих пор оспаривается, но предложить приемлемую модель исходного появления не вируса, а клетки, нелегко, уже из-за ее гораздо более сложного строения и наличия в ней всех компонентов вирусных структур.

В геноме, наряду со структурными генами, обнаружены и регуляторные, а также различные отрезки, в том числе интроны и перемещающиеся элементы.

Интроны [55] известны у архебактерий, вирусов и эукариот, в том числе и в их митохондриях, их роль спорная, как и происхождение [59]. Гильберт предполагает, что они могли произойти путем накопления мелких экзонов между отрезками, лишенными всяких функций, сейчас он,

следуя Дулиттлу (R. F. Doolittle) допускает [41], что все гены исходно содержали интроны, но у прокариот и древних эукариот, как дрожжи, они постепенно элиминировались. Однако и у древних групп могут образоваться молодые гены, а хорошо изученный процесс интеграции в геном профагов и транспозонов в никаких интронах не нуждается.

Что же касается перемещающихся элементов, то их можно распределить по трем категориям [23]:

а) IS—элементы. Это простые вставочные последовательности, содержащие лишь гены, необходимые для их транспозиции (около тысячи нуклеотидов), они могут реплицироваться и перемещаться в клеточном геноме.

б) Tn—элементы. Это транспозоны, построенные как IS—элементы, но содержащие также дополнительные гены, чередующиеся с генами IS—элементов.

в) Эписомы. Это сложные плазмиды, способные воспроизводиться самостоятельно, покидать хромосомы и включаться в них, они часто содержат IS—элементы и другие транспозоны. К эписомам относятся также умеренные фаги, способные переносить бактериальные гены в чужие клетки путем трансдукции. Некоторые фаги включаются лишь в определенный сайт хромосом бактерий, другие, как фаг Mu,—в любой сайт бактерий, фагов или плазмид. У многоклеточных, в особенности у дрозофилы, обнаружены аналогичные элементы.

г) особая группа внутриклеточных транспозонов свойственна молекулам иммуноглобулинов.

В клетках дрозофилы найдено множество микоплазм и спироплазм, вирусов, в том числе и вирус сигма, который может включаться в хромосомы или оставаться вирионом, элемент дельта, со сходными свойствами, но способный убивать клетку хозяина. Он считается клеточного происхождения. Имеются и транспозоны, в том числе мобильные диспергированные гены (МДГ), составляющие около 20% генома клетки, фактор дисгенеза, палиндромы, которых в одной клетке может быть несколько тысяч, как, впрочем, и у других животных. Палиндромы клеточного происхождения, МДГ часто рассматриваются как преобразованные вирусы [23], их обилию часто приписывают нестабильность генов у дрозофилы. «Вероятно, любой ген может приобрести нестабильное состояние» [23: 203]. Однако эта нестабильность проявляется очень редко, как об этом свидетельствует широкое применение генных карт, в частности, у дрозофилы. Возможно, что транспозоны, как и другие мутагены, часто элиминируются отбором и по той же причине, но сохраняются когда они полезны.

Но каково происхождение транспозонов?

Согласно Хесину [23], их происхождение клеточное, но исходно образовались IS—элементы в силу их большой простоты, хотя он допускает обратимость этого процесса и признает возможность их происхождения от фагов [23: 89], считая, что генную гипотезу «пока нельзя ни доказать, ни опровергнуть» [23: 293]. Однако трудно понять, каким образом создавался исходный набор лишь тех генов, которые нужны этим элементам, тогда как их отбор от других транспозонов выгля-

дит гораздо более правдоподобным. Гораздо перспективнее представления Б. Макклинток, приводимые ниже. Интересно также обнаружение Ту-ретротранспозонов у дрожжей и элементы типа *copia* у дрозофилы, которые очень похожи на ретровирусы. А ретротранспозонам дрожжей близки А-частицы позвоночных, также лишенные определенных функций, как и процессированные псевдогены, в том числе отрезки *Alu* у мышей и человека, замечательные обилием повторов. Все эти образования должны были создаваться путем обратной транскрипции, у многих видов они составляют до 10% их генома. «Могут ли ретротранспозоны являться ключом для объяснения отсутствия интронов у дрожжей (и дрозофилы)?» [31: 482].

Различия в направлении эволюции у прокариот и эукариот отмечались давно, своеобразную трактовку предложил Кинг [46], который характеризует прокариот наличием у них регуляторов, в основном транскрибирующих гены, которые расположены у них испочкой. Эти регуляторы взаимодействуют с субстратом и промоторами ДНК. Но у эукариот, в особенности у высших, гены часто регулируются по отдельности благодаря обилию вставок ДНК, не обладающих структурными функциями, в особенности у генов, играющих ведущую роль в жизнедеятельности эукариот. Кинг считает, что между структурными генами и их регуляторами должны обязательно иметься транспозоны, которые накапливаются в интронах, без них Эволюция ему представляется невозможной, а мутациям он относит лишь второстепенную роль из-за их предполагаемой редкости и скромности ими вызываемых перестроек геномов, тогда как Эволюция якобы требует их крупных перестроек, вроде тех, которые должны вызвать транспозоны. Этим последним приписывается также «эндогенная» эволюция, так как они могут проникать в половые клетки, отпочковываясь от соматических клеток. Но модель Кинга ни на каких примерах не проверена, она непригодна для дрозофилы, а одной точечной мутации достаточно, чтобы создать или разрушить промоторы, хелиперы, энхансеры, онкогены и т. д. Прибавим, что Кинг приводит интересный, хотя и неполный обзор «прыгающих генов», приписывая им и вирусам общее происхождение, что звучит по нашей трактовке.

Первые представления о симбиотической природе ядра исходят, по-видимому, к Бовери (Boveri, 1906), рассматривавшим ядро как «консорциум» бактерий. Сходную трактовку выдвигали и некоторые отечественные биологи, но конкретной модели ими не предлагалось, в частности и Кордюмом, допускавшим лишь, что ядро—возможное производное от «объединения нескольких разнородных геномов» [14: 76]. Еще менее вероятно его вирусное происхождение, уже потому, что все симбионты вирусного происхождения обнаружены уже у прокариот, а новые симбионты эукариот являются клетками. Конечно, у этих симбионтов всегда имеется аппарат белкового синтеза. В ядре такой аппарат был в прошлом описан, но эти данные были в дальнейшем опровергнуты. Однако сейчас появились новые указания о синтезе в ядре белков [21], хотя они нуждаются в уточнении.

Вопрос о происхождении ядра обсуждался и Маргулис [18], но, хотя она является рьяным поборником симбиогенеза, ей представляется,

что ядро и цитоплазма эукариотических клеток составляют части единой системы, которая не могла возникнуть этим путем, а ядро обособилось благодаря образованию мембраны, появившейся после митохондрий и в связи с ними для защиты ДНК от окисляющих ферментов митохондрий. Однако ее воззрениям противоречит существование химер. В частности, в лаборатории давно уже получены зиготы и даже гибриды разнообразного происхождения, которые существуют и в природе, чем доказывается достаточная пластичность взаимоотношений ядра и цитоплазмы.

Вопрос происхождения эукариот рассматривался также Вёзе, который выводит все организмы от «прогенота», от которого произошли параллельно археобактерии, эубактерии и древняя эукариота, эта последняя рассматривается как предшественник ядра. Настоящие эукариоты возникли в результате ее слияния с эубактериями, от них образовались также митохондрии и хлоропласты [9].

Согласно предложенной выше модели, образование ядра следует рассматривать как исходный процесс гаметогамии у прокариот, который отличается от гаметогамии эукариот в основном примитивностью прокариотических гамет. Эта модель в значительной мере созвучна представлениям Б. Макклинток.

В докладе, прочитанном ею в связи с присуждением Нобелевской премии [49], она приписывает ведущее значение ответной реакции клетки на проникновение в нее чужеродной ДНК, или, по ее выражению, «геномному шоку». Этот шок крайне разнообразен, в частности, он ответствен за образование транспозонов. Различаются реакции, вырабатываемые клеткой на обычные возбуждения, как половой шок, и непредвиденные, которые могут привести к крупному репрограммированию генома и играть в Эволюции ведущую роль. Приводятся примеры реакции клеток на введение в нее обломков хромосом, ее особенно поражающие, на проникновение вирусов, при образовании гибридов, в случае изменения набора генов, кодирующих тРНК, в культурах растительных (но не животных) клеток, при стрессе, на мутагены и т. д. Эти представления рассматриваются как новая очередная революция в генетике. Они вполне созвучны предложенной выше модели происхождения ядра, в особенности при допущении об образовании ядра в связи с проникновением в реципиент донора с обломанной хромосомой, что при трансдукции является не исключением, а правилом, а также изложенным выше представлением о вирусогенном направлении Эволюции.

Сохранились ли промежуточные формы между прокариотами и эукариотами?

Некоторые из них уже упомянуты выше, но пример *Pelomyxa palustris*, единственного представителя типа *Caryoblasta*, загадочен.

Этот вид — гигантская многоядерная амеба, ядра которой делятся прямым делением. Нет ни хромосом, ни кинетохора, ни центриолей, ни звезд, ни митотического веретена, ни митохондрий, но имеются мембранные трубочки, образованные, по-видимому, эндоплазматическим ретикулумом, которые протягиваются от мембраны ее перинуклеарных симбиотических бактерий к ядерным порам хозяина, они, вероятно, служат

путями распределения бактерий-симбионтов при делении ядер [18]. К сожалению, культивирование этих амёб до сих пор не удавалось, что затрудняет их изучение.

Если этот вид на самом деле представляет промежуточную форму между про- и эукариотами, то предложенная выше модель неприемлема, но более вероятно, что он является выродившейся формой, так как отсутствие хромосом иначе непонятно. Во всяком случае, он не освещает путь происхождения митоза. По-видимому, остается лишь ждать дополнительной информации.

Что же касается палеонтологических данных, то они, увы, не показательны. Самыми древними остатками эукариот сейчас считают акри-тархов, которым приписывается давность в 1,4 миллиарда лет [3], предполагается, что они являются следами примитивных эукариотических зеленых водорослей.

Предложенная в этой статье модель эволюции прокариот исходит из представления о наличии в жизнедеятельности организмов двух главных направлений, вызванных, с одной стороны, их монофилетической природой, обуславливающей возможность объединения их геномов на самых различных уровнях, даже при некоторых расхождениях в их генетическом коде, а с другой—специализацией их белков, приведшей к все большему обособлению как особей, так и таксонов.

На первобытной Земле симбиотическое направление Эволюции должно было привести к образованию первых клеток и вирусов, между которыми, уже исходно началась борьба за существование—«фагобактериомахия», длящаяся до сих пор и создавшая «виrogenное» направление в Эволюции, приведшее со временем к колоссальному обогащению их генома и, еще больше, их общего генофонда, в результате чего возник богатейший метаболизм, лишь частично унаследованный эукариотами, вплоть до человека.

В противовес нынешним взаимосвязям, благодаря которым хищник часто превращается в санитаря, а паразит—в симбионта, в фагобактериомахии фаги исходно уничтожали клетки, но с появлением лизосом хищники превратились в жертвы, а затем снова в хищников, а клетки сумели защититься, превращая фагов в профагов. Однако профаги даже после своего включения в геном хозяина сохранили известную самостоятельность, для хозяина иногда полезную, а иногда и вредную.

Предложенная модель образования эукариот, значительно отличающаяся от всех существующих, исходит из предположения о существовании в прошлом прокариот, сейчас не сохранившихся, а способность клеток к слиянию породила гаметогамию и половой процесс.

В дальнейшей эволюции эукариот ведущее значение приписывается гамонам и их производным. Послужив исходно элементом полового процесса, гамоны стали в дальнейшем регулировать все функции организма, что явилось обязательной предпосылкой для создания многоклеточных. Соответственно изменился и весь ход Эволюции. У прокариот он был направлен на пролиферацию генов и обогащение генофонда (биохимическая Эволюция), тогда как у эукариот генный набор обогатился меньше, но уже у протистов структура усложняется резко (мор-

фологическая Эволюция). По существу, новым в этой трактовке является лишь допущение о происхождении от гамонов всех факторов, управляющих основной жизнедеятельностью многоклеточных.

Однако в процессе Эволюции еще слишком многое остается загадочным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боркин Л. Я., Дарьский Н. С. Ж. общ. биол., 41 (4): 185, 1980.
2. Взаимодействие простейших и вирусов, Протозоология, 6, Л., 1982.
3. Видаль Г. В. В мире науки, 114, 1984.
4. Воробьева Н. Н. (ред.), Вирусы насекомых. Тр. биол. кн-га, 22, Новосибирск, 1974.
5. Гершензон С. М. Усп. совр. биол., 75 (9): 323, 1973.
6. Гершензон С. М. Основы современной генетики. Киев, 1979.
7. Гольдфарб Д. М. Ж. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 25 (4): 372, 1980.
8. Грант В. Видообразование у растений. М., 1984.
9. Дарнелл Дж. Э. В мире науки, 12: 28, 1985.
10. Дубинин Н. П. Эволюция популяций и раса. М., 1966.
11. Дубинин Н. П. Усп. совр. биол., 99 (1): 3, 1985.
12. Жакоб Ф., Бреннер С., Кузин Ф. В. В кн.: Синтез и структура нуклеиновых кислот: 381, М., 1966.
13. Захваткин А. А. Сравнительная эмбриология низших беспозвоночных. М., 1919.
14. Кордюм В. А. Эволюция и биосфера. Киев, 1982.
15. Корнберг А. Синтез ДНК. М., 1977.
16. Криштофович А. Н. Мат-лы по истории флоры и растительности СССР, 2: 21, 1946.
17. Лурья С., Дарнелл Дж., Балтимор Э., Кампбелл Э. Общая вирусология. М., 1981.
18. Маргалис Л. Роль симбиоза в эволюции клетки. М., 1983.
19. Попов М. Тр. по прикладн. бот. и селекции, 17: 221, Л., 1927.
20. Райков И. Б. Ядро простейших. Л., 1978.
21. Стент Г. К., Кэлинджер Р. Молекулярная генетика. М., 1981.
22. Хакина Л. Н. Проблемы симбиогенеза. Л., 1981.
23. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1981.
24. Шмальгаузен И. И. Факторы Эволюции. Теория стабилизирующего отбора. М., 1968.
25. Эберсгейм П., Дарвилл А. Г. В мире науки, 11: 16, 1985.
26. Яблоков-Хизорян С. М. Зоол. ж., 12 (10): 1435, 1963.
27. Яблоков-Хизорян С. М. Ж. общ. биол., 29 (6): 645, 1968.
28. Яблоков-Хизорян С. М. Биолог. ж. Армении, 39, (6): 688, 1986.
29. Alvarez L. W., Alvarez W., Asaro F., Michel H. V. Science, 203: 1095, 1980.
30. Baccetti B. et al. In: The functional anatomy Spermatozoon. Pergamon pr. Oxford etc.: 141, 1975.
31. Baltimore D. Cell, 19: 481, 1985.
32. Barret B. G., Bankier A. T., Drouin J. Nature, 252: 599, 1971.
33. Bary A. de. Die Erscheinung der Symbiose, Strassburg, 1979.
34. Boschetti A. Biogenese der Chloroplasten und Mitochondrien. Fischer, Stuttgart N.-Y., 1978.
35. Britten R. J., Kohne D. E. Scient. Amer., 222 (4): 24, 1970.
36. Callahan R. et al. Science, 228: 1208, 1985.
37. Caullery M. Le parasitisme et la symbiose, 2-e ed., Drouin, Paris, 1950.
38. Eldredge N., Gould S. J. In: Schopf ed., Models in Palaeobiology. Freeman etc., 82, S. Francisco: 1972.
39. Foerster H., Wiese L., Braunitzer G. Z. Naturforsch., 116 (6): 315, 1956.
40. Gallet G. P., Gottlieb L. D. Evolution, 36 (8): 1158, 1982.
41. Gilbert W. Science, 228: 823, 1985.
42. Goldschmidt R. B. Theoretical Genetics. Berkeley Univ., Calif. pr., 1953.

43. Grasse P. P., ed. *Traité de Zoologie*. 1. fasc. 1. Masson, Paris, 1952.
44. Hartmann M. *Die Sexualität*, 2^e Ed., Stuttgart, 1956.
45. Hood L. et al. *Cell*, 1540:225, 1985.
46. King C. C. *J. theor. Biol.*, 114, (3):447, 1985.
47. Lohs J. *Evolution by means of hybridisation*. Hague, 1916.
48. Lyman Ch. P. et al. *Science*, 212:668, 1981.
49. MacClintock B. *Science*, 226:792, 1984.
50. Margulis L. *Scient. Amer.*, 235 (2):48, 1971.
51. Matsuo T. et al. *Science*, 226:1322, 1984.
52. Novick R. P. *Scient. Amer.*, 243 (6):77, 1980.
53. Plashner M., Johnson A. A., Pabo C. O. *Scient. Amer.*, 247 (5):106, 1982.
54. Rosenfeld M. G., Amara S. G., Evans R. M. *Science*, 225:1315, 1984.
55. Schmidt F. *Cell*, 41:339, 1985.
56. Shay J. W. In: *Functional anatomy Spermatozoon*. Pergamon pr., Oxford etc.: 223, 1975.
57. Silverstein S. C., Christmas J. K., Acs G. *Annual Revue Bioch.*, 375, 1976.
58. Simons K., Garoff H., Hellenius M. *Scient. Amer.*, 241 (2):46, 1982.
59. Sudhof Th. et al. *Science*, 228:893, 1985.
60. Suzuki A. et al. *Science*, 226:849, 1984.
61. Van Etten J. L. et al. *Science*, 219:994, 1983.
62. Wahli et al. *Science*, 212:298, 1981.
63. White J., Kleiman M., Hellenius M. Q. *Rev. Biol., Physiol.*, 16 (2):151, 1:83.
64. White M. J. D. *Modes of speciation*. S. Francisco, W. Freeman co., 1978.
65. Wilcox L. W., Wedemayer J. *Science*, 227:192, 1985.
66. Wright B. E. *Science*, 153:830, 1966.
67. Youngman P. et al. *Science*, 229:285, 1985.
68. Yunis J. J., Prakash O. *Science*, 215:1525, 1982.
69. Yunis J. J., Sawyer J. R., Dunham M. *Science*, 208:1145, 1980.

Поступило 17.III 1986 г.

ОЧИСТКА ЦИСТАТИНОВ ИЗ МОЗГА БЫКА

А. Г. АГАДЖАНИН, Т. Н. АКОПЯН, А. М. АРЗУМАНЯН, А. А. АРУТЮНЯН,
Р. А. КАЗАРЯН, Л. В. КАРАБАШЯН

Институт экспериментальной биологии АН Армянской ССР, Ереван

Ключевые слова: мозг, цистеиновые протеиназы, белковый ингибитор.

Исследования последних лет позволяют многие нейроактивные пептиды рассматривать в качестве нейротрансмиттеров или нейромодуляторов [11]. Поскольку для большинства пептидов не удается обнаружить системы обратного захвата нервными окончаниями, протеолитическое расщепление представляется наиболее вероятным путем их биологической инактивации. Рядом авторов установлено, что как цитозоль, так и плазматические мембраны синапсом содержат спектр ферментов, способных расщеплять биоактивные пептиды [4, 5]. Результаты изучения влияния различных ингибиторов на эти ферменты показали, что в процессе деградации пептидов основную роль играют цистеиновые и металлосодежащие протеазы. Хотя исследования по изучению расщепления нейропептидов под действием изолированных ферментов и ферментативных систем ЦНС интенсивно развиваются, мало что известно о путях регуляции этих ферментов.

Известно, что регуляция действия протеолитических ферментов в клетке может осуществляться путем их взаимодействия со специфическими ингибиторами белковой природы. В частности, установлено, что ряд тканей животных и человека содержат белковые ингибиторы (мол. масса 10—14 кДа), подавляющие активность цистеиновых протеиназ [6, 8]. По предложению Барретта [2], эти ингибиторы, по аналогии с выделенным из яичного белка ингибитором цистеиновых протеиназ, были названы цистатинами.

В данной работе приводятся результаты очистки и изучения некоторых свойств двух ингибиторов цистеиновых протеиназ из мозга быка.

Материал и методика. Определение молекулярной массы очищенных ингибиторов проводили с помощью гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке гелфадекса G-75 (Pharmacia, Швеция) [3]. В качестве стандартных белков использовали альбумин—67, овальбумин—45, миоглобин—17,8, цитохром С—12,3 кДа (Serva, ФРГ). Иммобилизацию папаина на сефарозе 4В, активированной ВгCN-ом, проводили по описанному методу [2]. Электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-натрия проводили, не используя 15%-ный гель в трис/глициновом буфере (pH 8,9) [9]. Гели окрашивали в 0,5%-ном кумаси R-250. Белок определяли по методу Лоури [10], используя

зую в качестве стандартного белка альбумин бычьей сыворотки. Изoeлектрофокусирование проводили в колодке ($V=110$ мл, IKB), используя амфолиты при pH 3—10 (Pharmacia, Швеция). Активность папаина оценивали по реакции расщепления пиримидиаль-Р-гемоглобина [1]. Ингибиторную активность полученных белков определяли в пересчете на степень ингибирования папаина. За единицу активности ингибиторного белка принимали такое его количество, которое ингибирует активность 0,1 мкг папаина. При изучении свойств цистатинов SH-связывающие, восстанавливающие и деиндурирующие реагенты отдельно инкубировали с цистатином в течение 30 минут. Значение K_i высчитали по [7].

Результаты и обсуждение. Очистку цистатинов проводили следующим образом: экстракт мозга (0,025 М фосфатный буфер, pH 6,5, содержащий 10^{-3} М ЭДТА, 1%-ный NaCl и 1%-ный бутанол) после центрифугирования при 2000 г подвергали щелочной обработке (pH 11) с помощью 3 н NaOH и после 2-часового охлаждения pH раствора доводили до 6,5 добавлением 2 н HCl. Смесь вновь охлаждали в течение 2 ч, после чего центрифугировали 2000 г 30 минут. Ингибиторный материал выделяли из полученного супернатанта путем фракционирования ацетоном (50—70%). Полученный осадок растворяли в 0,05 М фосфатном буфере (pH 6,5), содержащем 0,5 М NaCl и 0,1%-ный тритон X-100. Экстракцию ингибиторной активности проводили в течение 18 ч при 4° на магнитной мешалке. Смесь центрифугировали, и разделение белков в супернатанте проводили путем гель-фильтрации на колонке сефадекса G-75 (4,5×45 см), уравновешенной 0,05 М фосфатным буфером (pH 6,5). Ингибиторный материал элюировался двумя пиками активности, соответствующими молекулярным массам 25 и 11 кДа. Дальнейшую очистку ингибиторов осуществляли с помощью аффинной хроматографии на колонке сефарозы 4В, на которой предварительно был иммобилизован карбоксиметилированный папаин. На колонку, уравновешенную 0,05 М NaCl и 0,1%-ным тритоном X-100, в отдельности наносили ингибиторный материал с M_r 25 и 11 кДа и проводили элюцию балластных белков тем же буфером. Цистатины элюировали с колонки с помощью 0,05 М K_2HPO_4 (pH 11,5), содержащего 0,5 М NaCl и 0,1%-ный тритон X-100. Полученные белковые зоны с ингибиторной активностью сгущали с помощью фильтра Амикон (UM-2). При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС натрий цистатин с молекулярной массой 11 кДа обнаруживается в виде одной белковой полосы, мигрирующей параллельно с цитохромом С.

В табл. 1 просуммированы результаты очистки цистатинов из мозга быка. Как видно из приведенных данных, один мкг каждого из очищенных ингибиторов подавляет активность 1,6 и 0,83 мкг папаина соответственно, что указывает на эквимоллярную стехиометрию ингибирования. Значения K_i равны $2,8 \times 10^{-11}$ М для белка с молекулярной массой 25 кДа и $1,3 \times 10^{-11}$ М для белка с молекулярной массой 11 кДа.

Изучение некоторых свойств изолированных цистатинов показывает, что на активность ингибиторов не влияют SH-связывающие реагенты, такие, как β -АМВ, 5,5'-дитиобис(2-нитробензойная кислота), практически не действуют также и восстанавливающие агенты — дитиотре-

Таблица 1. Очистка цистатинов из мозга быка

Стадии очистки	Белок, мг	Общая активность, ед.	Удельная активность, ед./мг	Выход активности, %
Экстракт после щелочной обработки	18650	87600	4.9	—
Фракционирование ацетоном	1140	63200	54.5	72.2
Сефадекс G-75	1—280	9880	35.3	11.3
	11—155	41450	274	47.3
КМ—папаин сефароза 4В	1—0.625	5630	8160	6.4
	11—1.4	27825	19570	31.8

Таблица 2. Влияние некоторых соединений на активность цистатинов из мозга быка

Соединение	Концентрация, М	Активность, %	
		Инг. I (25кДа)	Инг. II (11кДа)
L-цистеин	10^{-2}	82	95
Дитиотрейтол	10^{-9}	85	90
n-ХМБ ^а	5×10^{-4}	100	100
Дитионис (2-нитробенз. кислота)	5×10^{-4}	100	100
Мочевина	6	86	100
Гуанидин хлорид	4	75	50
pH 7 (экспозиция 10 мин при 80°)		46	57
pH 2 (экспозиция 10 мин при 80°)		53	48

тол. цистеин. Активность ингибиторов понижается на 10–40% в присутствии депатурирующих агентов—мочевины (6 М), гуанидин гидрохлорида (4 М) (табл. 2). Экспозиция цистатинов при 80° и pH 2 и 7 приводит примерно к пятидесятипроцентной потере активности.

Изоэлектрическое фокусирование цистатинов показало, что белок с молекулярной массой 25 кДа локализуется в основном в зоне pH 4,7 (минорные компоненты обнаруживаются в областях pH 5,82; 7,3; 8,95), а ингибитор с молекулярной массой 11 кДа—в области pH 5,23. Исследование спектра действия ингибиторов показало, что очищенные цистатины, кроме папаина, подавляют активность и других цистеиновых протеиназ, таких, как фичин, катепсины В и Н, но не влияют на активность трипсина, химотрипсина, катепсина Д, субтилизина и термолизина.

Одна из возможных биологических функций этих ингибиторов может состоять в защите нейрoактивных пептидов и других важных растворимых белков от протеолиза, в частности, под действием лизосомальных протеиназ. В настоящее время этот вопрос находится в стадии изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Akopyan T. N., Barchudaryan N. A., Karabashyan L. V., Arutunyan A. A., Lajtha A. *Neurochem. Res.*, 4 365—370, 1979.
2. Anastasi A., Brown M. A., Kumbhani A. A., Nicklin M. J. H., Sayers C. A., Senter D. C., Barrett A. J. *Biochem. J.*, 211, 129—138, 1983.
3. Andrews P. *Biochem. J.*, 96, 595—606, 1965.
4. Arzumanyan A. M., Arutunyan A. A., Akopyan T. N. *Neurochem. Res.*, 10, 12, 1623—1634, 1985.
5. Berger H., Fechner K., Albrecht E., Niedrich H. *Biochem. Pharmacol.*, 28, 3173—3180, 1979.
6. Green G. D. J., Kumbhani A. A., Davis E., Barrett A. J. *Biochem. J.*, 218, 3, 939—946, 1984.
7. Green N., Work E. *Biochem. J.*, 54, 347—352, 1953.
8. Kopitar M., Stern F., Marks N. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 112, 3, 1000—1006, 1983.
9. Laemli V. K. *Nature*, 227, 680—685, 1970.
10. Lowry O. H., Resenbrough N. J., Farr A. L., Randal R. I. *J. Biol. Chem.*, 193, 265—275, 1951.
11. Snyder S. H., Innis R. B. *Ann. Rev. Biochem.*, 4, 755—782, 1979.

Поступило 24.XI 1986 г.

Бюлл. ж. Армения, т. 40, № 4, 323—325, 1987

УДК 579.842.11.083.131

ГЕМОЛИТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ У НЕКОТОРЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМЕЙСТВА *ENTEROBACTERIACEAE*

С. Т. МНАЦКАНОВ

Армянский НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А. Б. Александяна

Ключевые слова: гемолитическая активность, гемолизины, энтеробактерии.

Гемолитическая активность энтеробактерий, в частности *Escherichia coli*, является одним из первых факторов патогенности, обнаруженных у представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Еще в 1925 году А. Н. Добрихотова отмечала значительную роль гемолитических *E. coli* в этиологии токсических диспепсий у детей. Гемолитические эшерихии были выделены во многих регионах, особенно при групповых кишечных заболеваниях неустановленной этиологии [5]. Установлено, что у штаммов кишечной палочки, выделенных при диареех, частота продукции гемолизинов колебалась в пределах 53—86,5% [1, 8]. Гемолитические эшерихии играют большую роль в инфекционной патологии животных [2, 3, 4]. Однако способность к продукции гемолизинов выявляется не только у *E. coli*. Показано, что гемолитическая активность высокостабильна и резко выражена у сальмонелл [7]. Способность к синтезу гемолизина была обнаружена и у штамма *Proteus morganii*, выделенного у ребенка с тяжелой токсической диспепсией [5].

В то же время остается малоизученной частота распространения способности продуцировать гемолизины у многих представителей семей-

ства *Enterobacteriaceae*. Выяснению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Материал и методика. Было исследовано 2588 культур различных представителей семейства кишечных бактерий, выделенных от детей и домашних животных с диарейными заболеваниями. Данные о видовом составе и количестве исследованных штаммов каждого вида приведены в таблице. Определение гемолитической активности проводилось на специально разработанной нами среде [6].

Результаты и обсуждение. Из 2588 исследованных штаммов 954 ($36,9 \pm 0,9\%$) обладали гемолитической активностью. Данные о гемолитической активности различных представителей семейства *Enterobacteriaceae* приведены в таблице.

Гемолитическая активность у различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*

Вид энтеробактерий	Всего исследовано штаммов	Из них	
		число гемолитически активных	%
<i>E. coli</i>	2225	877	$39,4 \pm 1,0$
<i>S. sonnei</i>	20	0	0
<i>S. typhimurium</i>	70	23	$28,6 \pm 5,4$
<i>Citrobacter spp.</i>	35	11	$31,4 \pm 7,8$
<i>Arizona spp.</i>	16	5	$31,2 \pm 11,6$
<i>H. alvei</i>	21	3	$14,3 \pm 7,6$
<i>E. aerogenes</i>	2	0	0
<i>E. cloacae</i>	6	0	0
<i>Serratia spp.</i>	60	14	$23,3 \pm 5,4$
<i>Y. enterocolitica</i>	133	24	$18,1 \pm 3,3$
Всего	2588	954	$36,9 \pm 0,9$

Как видно из приведенных результатов, весьма высокая гемолитическая активность обнаружена у *E. coli* ($39,4 \pm 1,0\%$). Высокой степенью гемолитической активности характеризовались и другие представители этого семейства: *Citrobacter spp.*, *Arizona spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella typhimurium*. Частота встречаемости гемолитических штаммов у них варьировала в пределах $23,3$ — $31,4\%$. Нам не удалось выявить гемолитических штаммов у *Enterobacter aerogenes* и *E. cloacae*, так как малочисленность исследованных штаммов не позволила сделать четкого заключения о способности продуцировать гемолизин этими представителями семейства *Enterobacteriaceae*.

Небезынтересно было сравнить результаты определения гемолитической активности *E. coli*, выделенных от больных и здоровых детей. Оказалось, что из 640 штаммов, выделенных от больных детей, 180 ($28,1 \pm 1,8\%$) продуцировали гемолизин, тогда как из 300 штаммов, выделенных от здоровых детей, лишь 7 ($2,3 \pm 0,9\%$) оказались гемолитическими.

На основании этих результатов можно предположить, что способность к продуцированию гемолизина у энтеробактерий, и частности у *E. coli*, является одним из важных факторов патогенности. Вместе с тем можно заключить также, что на территории Армении наблюдается

широкая циркуляция различных представителей семейства кишечных бактерий, способных к продукции гемолизина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляя О. С., Сутялова А. А. ЖМЭИ, 5, 66, 1978.
2. Бычевой И. Ф. Ветеринария, 10, 51, 1975.
3. Бычевой И. Ф. Ветеринария, 5, 42, 1979.
4. Еремеев М. Н. Ветеринария, 2, 40, 1975.
5. Кудлай Д. Г. Внесхромосомные факторы наследственности бактерий и их значение в инфекционной патологии. М., 1977.
6. Минацканов С. Т., Коцимян М. Е., Лиходуд В. Г., Раскин Б. М., Акопян Р. Г., Лобова Е. А., Денисова С. В. Лаб. дело, 8, 498, 1984.
7. Румянцев С. Н., Перкус Л. В. ЖМЭИ, 11, 69, 1972.

Поступило 17.XI 1986 г.

Бюлог. ж. Армении, т. 40, № 4, 325—327, 1987

УДК 576.8.575.24.577.15.591.8

АКТИВНОСТЬ L-АСПАРАГИНАЗЫ И L-ГЛУТАМИНАЗЫ РИБОСОМНЫХ МУТАНТОВ *ESCHERICHIA COLI*

Э. Г. МУГНЕЦЯН, К. Р. СТЕПАНИН

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

Ключевые слова: мутанты рибосомные *E. coli*, аспарагиназа, глутаминаза.

Изучение выделенных нами ранее рибосомных мутантов различных штаммов *E. coli* выявило pleiotропное действие мутаций к стрептомицину-устойчивости (СМ-у), специфическое различение генетической информации [2, 4], различие в уровне спонтанного и индуцированного мутагенеза у стрептомицинчувствительных (СМ-ч) штаммов *E. coli* и их СМ-у мутантов [3, 5]. Различие между СМ-ч и СМ-у обнаружено и при изучении нитрогеназной активности *Rhizobium japonicum* в искусственной симбиотической системе с культурой каллусной ткани растения [1].

Интересно влияние СМ-у мутации на уровень активности ферментов *E. coli*, в частности, ферментов с идентифицированной противоположной активностью.

Цель настоящей работы состояла в определении активности L-аспарагиназы и L-глутаминазы у лабораторных и природных штаммов *E. coli*, выделенных из фекалий практически здоровых лиц и онкологических больных одинаковых возрастных групп, не принимавших антибиотиков в течение 6 месяцев.

Материал и методика. В работе использованы лабораторные штаммы *E. coli*, их СМ-у мутанты и природные штаммы, выделенные на среде Эндо и отсутствие антибиотика—стрептомицина (СМ). Отношение бактериальных культур к антибиотикам проверялось методом дисков и в присутствии СМ в полиоценной среде Эндо-500 мкг/на чашку. Бактериальные культуры выращивали из отдельных независимых колоний в полиоценной жидкой питательной среде: рыбный бульон, пептонная вода—1/1,2 мл/л, 40%-ная глюкоза. Культура выращивалась в 750-мл-литровых колбах до $5 \cdot 10^8$ кл/мл

Активность L-аспарагиназы и L-глутаминазы лабораторных и природных штаммов *E. coli* и их стрептомицинустойчивых мутантов

Штаммы и их происхождение	Способность сбраживать лактозу	Потребность в факторах роста	Отношение к стрепто- мицину	Активность аспа- рагиназы, мкг N/1 ₂ мг сухих клеток	%	Активность глутаминазы, мкг NH ₃ мг сухих клеток	%
K12 ВНИИ Генетика	+	прототроф	СМ — ч	118	100	40.0	
1/K12 оригинальный спонтанный мутант	+	прототроф	СМ — у	44	37		
591 ВНИИ Генетика	—	прототроф	СМ — ч	108	100	40.0	100
1/591 оригинальный нитрозо-гуанидининдуциро- ванный мутант	—	ауксотроф	СМ — у	75	70	29.6	74
27 природный штамм практически здоровой жел- шны	+	прототроф	СМ — ч	101	100	37.6	100
1/27 индуцирован УФ-лучами	+	прототроф	СМ — у	71	70	22.8	70
В ВНИИ Генетика	+	прототроф	СМ — ч	63	100	28.4	100
1/В оригинальный нитрозо-гуанидининдуцирован- ный мутант	—	ауксотроф	СМ — у	43	68	22.0	61
15, 28, 85 выделены из фекалий больных раком	—	ауксотроф	СМ — у	72			
44, 41, 83 толстой кишки	—	прототроф	СМ — у	60			
16 ВНИИ Генетика	—	прототроф	СМ — у	34			
180	+	прототроф	СМ — ч	62	100		
1/180 оригинальный спонтанный мутант	—	прототроф	СМ — у	53	68		

л объеме 200 мл без аэрации при 37°. Изучено свыше 20 независимых культур в 3 повторностях. Характеристики культур приводятся в таблице.

В качестве ферментативного препарата использованы высушенные при 30° в течение 25—30 ч бактериальные клетки. Активность ферментов определяли инкубированием препарата в течение 60 мин при 37° в присутствии L-аспарагина или L-глутамината с последующим определением отщепившегося NH_3 микродиффузионным методом Зеллвассона в модификации Силаковой с соавт. [6].

Активность ферментов выражали в мкг NH_3 на мг сухих клеток. Инкубационная смесь (4 мл) состояла из 2,5 мг высушенных бактерий, 50 мМоль L-аспарагина или L-глутамината и 0,05 М Na_2HPO_4 буфера, pH 8,3.

Результаты и обсуждение. Результаты исследования показали, что штаммы *E. coli* K12, 594, В, несущие дикую аллель *grsL* локуса, ответственного за СМ-ч, обладают сравнительно высокой активностью как L-аспарагиназы, так и L-глутаминазы. Бактериальные культуры *E. coli*, выделенные из отдельных независимых фекальных жидкостей практически здоровых лиц, наряду с СМ-ч, характеризуются высокой активностью этих ферментов. Спонтанная и индуцированная физическими и химическими факторами мутация *grsL* локуса приводит к СМ-у или СМ-зависимости, что связано с изменением S 12 белка 30 S субъединицы рибосом *E. coli* [7, 8]. Эта мутация изменяет физиолого-морфологические характеристики колониеобразующих клеток [4, 5]. Результаты настоящего сообщения свидетельствуют о снижении активности L-аспарагиназы и L-глутаминазы у рибосомных мутантов независимо от источника и способа их выделения и других характеристик (способности сбраживать лактозу, потребности в факторах роста и др.). У некоторых СМ-у мутантов, выделенных как из лабораторных, так и природных штаммов, активность L-аспарагиназы снижена более чем на 60%. Штаммы с высокой L-аспарагиназной активностью обладали также сравнительно высокой L-глутаминазной активностью, которая у всех изученных штаммов была ниже аспарагиназной и составляла примерно 40% ее.

Трудно экспериментально оценить и тем самым объяснить установленный факт понижения L-аспарагиназной и глутаминазной активности СМ-устойчивых мутантов как следствие количественного или качественного изменения ферментов в результате рибосомной мутации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мугнецян Э. Г. Мат-лы респ. конф. Арм. отд. БОГ и С им. Н. И. Вавилова, Ереван, 1982.
2. Мугнецян Э. Г., Хачатрян Т. А. Тр. IV съезда ВОГ и С им. Н. И. Вавилова. Кишинев, 1982.
3. Мугнецян Э. Г., Хачатрян С. А. Биолог. ж. Армении, 35, 7, 1982.
4. Оганесян М. Г., Мугнецян Э. Г. Биолог. ж. Армении, 29, 11, 1976.
5. Оганесян М. Г., Мугнецян Э. Г. Биолог. ж. Армении, 35, 9, 1982.
6. Силакова А. Н., Тредш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. хим., 8, М., 1962.
7. Piggot P. et al. J. Bacteriology, 110, 1972.
8. Pongs O., Nierhus, Febs Lett., 41, 1974.
9. Rosset R. et al. J. Mol. Biol., 39, 1969.

Поступило 9.VI 1986 г.

БАКТЕРИЦИДНЫЕ СВОЙСТВА ХЛОРИСТЫХ СОЛЕЙ АЛКИЛОКСИКАРБОНИЛМЕТИЛ-ДИМЕТИЛ (4-ФЕНИЛОКСИ-2,3-ДИХЛОР-2-БУТЕНИЛ)-АММОНИЯ

А. В. БАБАХАНИЯ, Ж. Р. БАБАЯН, Г. С. АКОПЯН

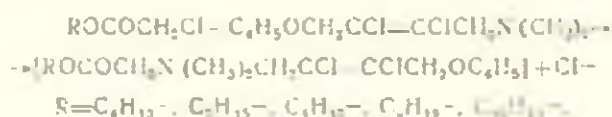
Армянский государственный педагогический институт им. Х. Абовяна,
Армянский НИИ эпидемиологии, вирусологии и медицинской
паразитологии им. А. Б. Алексаняна, Ереван

Ключевые слова: вещества поверхностно-активные, кишечная палочка, золотистый стафилококк

Среди поверхностно-активных веществ, обладающих бактерицидной активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, особое место занимают четвертичные аммониевые соединения (ЧАС) [3, 5]. Ранее была установлена бактерицидная активность четвертичных солей аммония [6] и уротропиния [1, 7], содержащих хлор (дихлор) неперелетную группу.

Продолжая исследования в области синтеза и изучения насыщен-ных поверхностно-активных ЧАС с целью изыскания новых эффективных дезинфицирующих средств, мы изучали бактерицидные свойства хлористых солей четырехзамещенного аммония, содержащих в молекуле наряду с алкилоксикарбонилметильным радикалом, обеспечивающим поверхностную активность, 4-фенилокси-2,3-дихлор-2-бутенильную группу.

Материал и методика. Изучена бактерицидная активность пяти ненасыщенных ЧАС в отношении кишечной палочки и золотистого стафилококка. Соединения синтезированы взаимодействием 1-диметиламино-2,3-дихлор-4-фенилокси-2-бутена [2] в стехиометрических количествах с алкиловыми эфирами монохлоруксусной кислоты:



Полученные соли представляют собой хорошо растворимые в воде белые кристаллические вещества.

Синтезированные ЧАС были испытаны на бактерицидность согласно «Инструкции по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств», утвержденной Минздравом СССР от 5.05.68 г. за № 739-68 [1], методом обеззараживания батистовых тест-объектов, обсемененных 2 млрд. микробной суспензией «тапочных штаммов» кишечной палочки (шт. 1257) и золотистого стафилококка (шт. 906) в виде 0,05-, 0,025-, 0,0125- и 0,01%-ных водных растворов (экспозиции 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин).

Результаты и обсуждение. Результаты изучения бактерицидных свойств синтезированных нами хлористых солей алкилоксикарбонилметил-диметил (4-фенилокси-2,3-дихлор-2-бутенил) аммония (табл.) показывают, что все эти соединения активны как в отношении кишечной палочки (шт. 1257), так и, особенно, золотистого стафилококка (шт. 906). Установлена зависимость между бактерицидной активностью и

Бактерицидная активность ЧАС общей формулы $[ROCOCH_2 N(CH_3)_2 CH_2 CCl = CClCH_2 OC_6H_5]^+ Cl^-$

Соединение	R	Испытанные кон- центрации раство- ров, %	Табель микроорганизмов, мин	
			кишечная палочка	золотистый стафилококк
I	$C_6H_{13}-$	0.05	25	15
		0.025	более 30	30
II	$C_7H_{15}-$	0.05	15	5
		0.025	30	20
III	$C_8H_{17}-$	0.05	10	5
		0.025	25	10
IV	$C_9H_{19}-$	0.05	5	5
		0.025	20	5
		0.0125	более 30	15
		0.01	более 30	более 30
V	$C_{10}H_{21}-$	0.05	5	5
		0.025	10	5
		0.0125	25	10
		0.01	более 30	20

длиной углеводородного радикала соединений: чем длиннее углеводородная цепь, тем выше антимикробная активность (от соединения I до соединения V).

Таким образом, синтезированные нами хлористые соли алкоксикарбонилметил-диметил (4-фенилокси-2,3-дихлор-2-бутенил) аммония обладают высокой бактерицидной активностью в отношении грамотрицательных и, особенно, грамположительных бактерий и могут быть использованы в качестве обеззараживающих средств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алагесян Р. Г., Бабахян А. В., Асатрян Ф. А. Тез. докл. науч. конф. ЕрЗВН. 12, Ереван, 1980.
2. Бабахян А. В., Худавердян Г. А., Бабалян В. О., Бабилян А. Т. Арм. хим. ж., 7, 465, 1982.
3. Вашков В. И. Тр. ВНИИДнС, 1, 15, 1971.
4. Инструкции по определению бактерицидных свойств новых дезинфицирующих средств, утвержденная МЗ СССР от 6 мая 1968 г. № 739-68.
5. Чалмерс Л. Химические средства в быту и промышленности. Л., 1969.
6. Babakhanjan A. V., Alagezjan R. G. 20 international dairy congress. Paris, June 26-30, 602, 1978.
7. Babakhanjan A. V., Alagezjan R. G., Babajan V. O. XXI international dairy congress. Brief communications Volume 1 Book One, Moscow, June, 12-16, 119, 1982.

Поступило 21 I 1987 г.

ПОЛУЧЕНИЕ МОНОКСЕНИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ *ENTAMOEBA MOSHKOVSKII*

В. И. ХАЧОЯН, В. Б. ТАТЕВОСЯН

Ереванский государственный медицинский институт, кафедра биологии

Ключевые слова: амеба, культура поликсеническая *E. moshkovskii*, способ иммунобиологической аксенизации.

Получение аксенических культур амеб связано с определенными трудностями, в частности, довольно сложно освободиться от сопутствующей бактериальной флоры. Затруднения возникают и при приготовлении многокомпонентной среды для выращивания амеб. Несмотря на это, Дيامонду [5, 6] впервые удалось получить аксеническую культуру *E. histolytica*.

Для освобождения от сопутствующей микрофлоры нами ранее были использованы различные среды и ряд антибиотиков [2], а также метод клонирования. Однако оказалось, что с помощью этих методов не всегда удается освободиться от бактерий, в частности, аксенизация крайне затрудняется при наличии в среде антибиотикустойчивых микроорганизмов. Исходя из этого, мы решили применить новый принцип освобождения поликсенической культуры от сопутствующей микрофлоры.

Материал и методика. В опытах была использована поликсеническая культура *Entamoeba moshkovskii* [3, 4, 7]. Культуры поддерживались в среде Павловой при комнатной температуре (16—22°).

Для иммунизации были использованы кролики породы шиншилла массой 2,6—3,2 кг. Антиген готовили из микробной массы, которую получали путем посева культуральной жидкости на чашки Петри с сахарным агаром. В дальнейшем идентифицированные бактерии смывали и из смыва готовили антиген, в котором концентрация микробных тел соответствовала 20 ед. стандарта чистоты.

Четырехкратную иммунизацию кроликов производили указанным антигеном внутривенно через день. При первой инъекции вводили 0,5 мл антигена, при последующих — по 0,75 мл. Спустя десять дней после последней инъекции из ушной вены животных брали 1,5 мл крови для контрольного определения титра агглютининов [1]. При высоком титре агглютининов в полученных сыворотках их использовали в опытах. Кровь брали из сердца кроликов, сыворотку готовили обычным способом. Антимикробный титр полученных сывороток определяли с помощью реакции агглютинации. Он был довольно высоким и равнялся 1:6400.

Результаты и обсуждение. Обычно для каждого опыта при получении моноксенической культуры из поликсенической использовали четыре контрольных и десять опытных пробирок с хорошим ростом *E. moshkovskii*. Для очистки культур от сопутствующей микрофлоры в каждую пробирку с 5 мл среды добавляли по 0,5 мл антисыворотки с титром 1:6400.

Спустя двое суток наблюдалось резкое подавление роста сопутствующей микрофлоры: микроорганизмы теряли подвижность, склеивались

между собой и опускались на дно пробирки, а амёбы интенсивно размножались. Микроскопирование показало, что в среде в основном происходит агломерация и агглютинация бактерий. При проверке сохранившегося вида бактерий на чувствительность к антибиотикам было обнаружено, что он чувствителен к левомицетину, тетрациклину и эритромицину. В дальнейшем в среду вместе с сывороткой вносили эти три антибиотика: тетрациклина и эритромицина—по 1000 ед. на мл среды, а левомицетина—500 ед. на мл среды.

При последующих пересевах культуральная среда оставалась светлой, при контрольном посеве надосадочной жидкости из опытных пробирок был выделен только один вид грамположительных палочек, в отличие от исходной поликсенической культуры. В контрольных пробирках наблюдался обильный рост посторонней микрофлоры и помутнение среды. Опыты проводились в нескольких повторностях, и во всех случаях данные были одинаковые.

Таким образом, применение иммунной сыворотки значительно ускоряет и облегчает получение моноксенической культуры *E. moshkowskii* из поликсенической.

Дальнейшее совершенствование иммунобиологического способа аксенизации может оказаться эффективным при получении аксенической культуры энтамеб.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герберт У. Дк. Ветеринарная иммунология. М., 1974.
2. Карапетян А. Е., Татевосян В. Б., Манучарян Л. Ш. Современные проблемы паразитологии. Мат-лы к III съезду Всесоюзн. об-ва паразитологов. 151, Вильнюс, 1982 г.
3. Чалая Л. Е. Мед. паразитол. и паразитар. болезни, 10, 2, 244—252, 1941.
4. Чалая Л. Е. Мед. паразитол. и паразитар. болезни, 16, 5, 66—70, 1947.
5. Diamond L. S. Science, 34, 3475, 336—337, 1961.
6. Diamond L. S. Arch. invest. med., 177—54, 1980.
7. Schaglla M., Gatt S., Stroselli M., Granoli J., Villa M.—S. Ann. parasitol. hum. et comp., 58, 413—422, 1983.

Поступило 24.X.1985 г.

Бюллет. ж. Армении, г. 40, № 4. 331—333, 1987

УДК 633.661.6/7

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЗЕРНА СОРТОВ ОЗИМОЙ МЯГКОЙ ПШЕНИЦЫ СЕЛЕКЦИИ АРМ. НИИЗ

Б. Е. НИКОГОСЯН, Г. Е. САФАРЯН

НИИ земледелия Госагропрома Армянской ССР, г. Эчмиадзин

Ключевые слова: пшеница озимая мягкая, физические свойства

В настоящей статье приводятся результаты исследования физических свойств зерна сортов и перспективных линий озимой пшеницы селекции АрмНИИЗ.

Определение массы 1000 зерен, натурального веса и стекловидности зерна проводилось по ГОСТу.

Полученные данные (табл.) свидетельствуют о том, что изучаемые новые сорта в основном имеют крупные зерна, а масса 1000 зерен, в зависимости от сортовых особенностей, в среднем колеблется в пределах 43,6 (Альбидум 6)—52,1 г (Кангун 20), у стандарта Безостая 1 она составляет 44,5 г. К сортам с наибольшей массой 1000 зерен относятся также Севани 4 и Армянка 60 (50,9—50,0 г.).

Физические свойства зерна сортов озимой мягкой пшеницы в условиях Мерцаванской зональной опытной станции

Сорта	Масса 1000 зерен, г		Стекловидность зерна, %		Натуральный вес зерна, г/л	
	М	Р	М	Р	М	Р
Безостая 1 (стандарт)	44,5	3,8	64	17	826	24
Кангун 20	52,1	5,8	50	21	794	25
Армянка 60	50,0	1,8	67	23	803	9
Альбидум 6	43,6	3,3	38	51	806	10
Альбидум 7	48,9	2,5	35	29	804	29
Альбидум 8	49,8	2,8	51	47	805	27
Грекум 39	47,0	1,2	28	38	814	14
Грекум 11	46,5	4,2	47	21	820	16
Грекум 13	46,3	4,2	59	18	828	24
Грекум 15	46,5	5,9	62	12	821	25
Севани 4	50,9	1,2	58	36	821	8
Эритроспермум 19	44,7	2,2	42	45	816	16
Эритроспермум 21	46,6	4,6	58	29	821	15
Лютеценс 23	48,2	3,6	43	39	818	18
Лютеценс 93	45,6	3,4	47	44	817	10

Известно, что масса 1000 зерен зависит от величины зерна и его плотности. Эти показатели, имея сортовой характер, изменяются в зависимости от погодных условий. Так, по средним данным, в пределах одного сорта варьирование массы 1000 зерен по годам составляет 1,2—5,9 г, а между сортами—8,5 г. Степень модифицируемости массы 1000 зерен в зависимости от погодных условий года у сортов неодинаковы (V, % 1,23—5,30). Меньше подвергается изменениям масса 1000 зерен у сортов Грекум 39, Севани 4 и Армянка 60, варьирование по годам у них составляет соответственно 1,2; 1,2 и 1,8 г. Однородно крупными зернами особенно отличается сорт Севани 4, у которого масса 1000 зерен составляет 50,3—51,5 г и по годам подвергается незначительным изменениям (V, %—1,23).

Масса 1000 зерен значительно варьирует по годам у сортов Кангун 20 и Грекум 15 соответственно 5,8 (V, % 4,98) и 5,9 г (V, % 5,30).

Исходя из результатов наших исследований, можно утверждать, что масса 1000 зерен пшеницы имеет достаточно стабильный сортовой характер. Наряду с другими важными показателями, отбор селекционного материала по массе 1000 зерен имеет важное значение в практической селекции для выделения крупнозерных сортов.

В селекционной практике важное место отводится стекловидности зерна (его консистенции), имеющей большое значение для выбора режима переработки. Более стекловидное зерно дает больший выход ос-

овных промежуточных продуктов, при прочих одинаковых условиях. Такое зерно легче вымалывается и дает больший выход муки высших сортов, чем мунистое зерно. Если наилучшим показателем стекловидности зерна в нашем исследовании считать 60% и выше, то можно выделить сорта Армянка 60 (67%), Безостая 1 (стандарт—64%) и Грекум 15 (62%). Стекловидность зерен изменяется в зависимости от погодных условий года. По средним данным, колебание стекловидности зерен по годам у одного и того же сорта составляет от 12 до 51%, а между сортами—до 39%. Такие сорта, как Грекум 15, Грекум 13, Грекум 11, Кангун 20 и Армянка 60, по стекловидности зерна сравнительно стабильны, у них за 4 года, по средним данным, колебание составило соответственно 12, 18, 21, 21 и 23%, у Безостая 1—17%, между тем как сорта Лютеценс 23, Эритроспермум 19, Альбидум 8 и Альбидум 6 относятся к нестабильным сортам, варьирование этого показателя по годам составляет 39—51%.

Итак, в итоге четырехлетних исследований нами установлено, что стекловидность зерна изучаемых сортов по средним данным, в зависимости от погодных условий, колеблется в пределах 28—67%.

Натурный вес (масса единицы объема пшеницы) один из критериев качества пшеницы. Это очень важный показатель во всех системах классификации зерна, представляющий собой (хотя и приближенный) критерий предполагаемого выхода муки из данного зерна. Однако натурный вес нельзя считать безусловно точным и надежным индексом для расчета выхода муки, так как на него влияет форма зерна, однородность его размеров, плотность зерна и т. д.

Натурный вес зерна изучаемых сортов в наших исследованиях был высоким. За 4 года этот показатель варьировал в пределах 782—842 г/л, размах по сортам составлял 60 г/л.

Так, кроме сорта Кангун 20 (794 г/л), у всех остальных сортов натурный вес зерна выше 800 г/л. Наиболее высокими показателями отличаются сорта Грекум 13 (828 г/л), Грекум 15 (821), Севани 4 (821), Эритроспермум 21 (821) и Грекум 11 (820), которые находятся на уровне сильной пшеницы Безостая 1 (826 г/л). Остальные сорта уступают стандарту в среднем на 6—39 г/л.

Натурный вес изменяется в зависимости от сорта и года возделывания, однако наибольшее значение имеют сортовые особенности. Так, по средним данным, колебание между сортами составляет 34 г/л, а по годам у одного и того же сорта 8—29 г/л. Такое незначительное варьирование ($V, \% = 0,42—1,62$) натурнн веса свидетельствует о высокой стабильности этого показателя.

Таким образом, количественные признаки зерна изменяются в зависимости от сорта и условий выращивания. На массу 1000 зерен и натурный вес зерна наибольшее влияние оказывает сорт пшеницы, а на стекловидность зерна—условия выращивания.

По физическим свойствам зерна наибольший интерес для селекции представляют сорта Безостая 1, Армянка 60, Севани 4, Грекум 13 и Грекум 15.

ВЛИЯНИЕ КОРТИЗОНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА АДЕНОЗИНА И АМФ-ДЕЗАМИНАЗУ В НЕКОТОРЫХ ОРГАНАХ КРЫС

Ц. М. ПЕРСИЯН, Э. А. ГУЛЯН, М. Г. КОЧАРЯН, Г. П. КЕГИШЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, Ереван

В работе представлены данные относительно влияния кортизона на активность ферментов метаболизма аденозина: 5-нуклеотидазу, аденозин-дезаминазу и АМФ-дезаминазу, фермента, регулирующего уровень содержания АМФ, являющегося субстратом 5-нуклеотидазной реакции.

Значительные сдвиги выявлены в активности 5'-нуклеотидазы под влиянием кортизона в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М и $5 \cdot 10^{-6}$ М в опытах *in vitro*. Так, в печени активность фермента угнетается на 50% и, напротив, возрастает в почечной ткани на 90%. Активность аденозин- и АМФ-дезаминаз не изменяется в этих условиях ни в одной из исследуемых тканей (мозг, печень, почки, сердце).

Введение кортизона (5 мг на 100 г массы животного) приводит к значительному снижению удельной активности указанных ферментов, что является следствием резкого повышения концентрации белка, особенно выраженного через 4 ч после инъекции гормона. Увеличение активности аденозин- и АМФ-дезаминаз в сердечной мышце при введении кортизона (на 60% и 80% соответственно), вероятно, происходит вследствие индукции ферментов и является одним из первичных механизмов удаления аденозина, избыток которого в этой ткани может привести к нарушению коронарного кровообращения.

Исследования показали, что в печени и почках активность 5'-нуклеотидазы претерпевает некоторые изменения не только вследствие того, что эти ткани являются органами-мишенями действия кортикостероидов, но это может быть обусловлено тем, что именно в этих органах, наряду с мембраносвязанной, имеется растворимая форма фермента, что расширяет его регуляторные возможности.

13 с., 5 табл., библиогр. 20 назв.

Полный текст статьи деп. в ВИНТИ

Поступило 28 VII 1986 г.

ГИСТОСТРУКТУРНЫЕ СДВИГИ В ОРГАНАХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ АМПИЦИЛЛИНА

А. А. НАВАСАРДЯН, А. А. СТЕПАНИ, Н. С. СОГОЯН

Ереванский зооветеринарный институт

Изучены гистоструктурные изменения некоторых органов (селезенка, печень, почки, легкие, сердце) белых мышей в условиях длительного применения ампициллина (в течение 5 дней два раза в сутки), начатого одновременно с иммунизацией гетерогенным эритроцитарным антигеном.

Полученные данные показали, что реакция в изученных органах на иммунизацию и введение ампициллина отражает морфофункциональные особенности каждого из органов.

Установлено, что основные изменения в гистоструктуре органов как в опыте, так и в контроле развивались на 7-, 14-й день после иммунизации. Так, в паренхиме органов опытных животных, по сравнению с контрольными, отмечается слабая клеточная реакция. В селезенке синусы заполнены клеточными элементами, среди которых встречаются лимфоциты и слущенные клетки эндотелия, плазматические клетки (редко) и мегакарионы. Ретикулярная ткань несколько разрыхлена и местами клеточно инфильтрирована. Фолликулы увеличены, однако реактивные центры не выявляются, вместо них выявляется однородная равномерная расплывчатая структура.

В печени нарушена балочная структура органа, цитоплазма гепатоцитов мелкозернистая, границы между клетками часто сливаются. В цитоплазме наблюдается вакуолизация.

В почках клеточные инфильтраты затушевывают структуру клубочков.

В легочной ткани отмечается утолщение межальвеолярных перегородок и стенок сосудов за счет клеточной инфильтрации. Они нередко заполняют просветы альвеол.

В сердечных миоцитах местами исчезает исчерченность.

В дальнейшем на 21-, 28-й дни исследования указанные изменения проявляются значительно слабее, идет процесс восстановления.

Таким образом, ампициллин, введенный в индуктивной фазе иммуногенеза в организм белых мышей, иммунизированных гетерогенным эритроцитарным антигеном, оказывает влияние на гистоструктуру органов животных, подавляя тем самым иммуноморфологические сдвиги.

7 с., библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи деп. в ВНИИТИ, № 809-B87 от 5.11.1987 г.

Поступило 22.XI 1986 г.

ПРОХОЖДЕНИЕ МЕЙОЗА У ТОМАТА ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИББЕРЕЛЛОВОЙ КИСЛОТЫ В M_1

С. Г. ЕРВАНДЯН, Н. Н. БЕГЛАРИН

Ереванский государственный университет, кафедра цитологии

Проведено цитогенетическое исследование микроспороцитов растений трех сортов томата (Юбилейный 261, Звартноц 412, Токун), выращенных из семян, обработанных 0,02%-ным раствором гибберелловой кислоты (ГК) в M_1 . Изучены различные фазы первого и второго мейотических делений (I и II метафазы, I и II ана-, телофазы, тетрады). На каждой стадии проанализировано не менее 500 клеток на вариант.

Сопоставление данных цитогенетического анализа мейоза показало, что у испытанных сортов томата частота и спектр отклонений идентичны. Наряду с этим, как в контрольном, так и в подопытных вариантах выявлена некоторая сортовая специфичность. Следует отметить, что воздействии ГК на мейоциты растений изученных сортов томата неоднородно и трудно установить определенную закономерность. Если у сортов Звартноц 412 и Токун по сравнению с контролем во всех стадиях деления наблюдалось снижение частоты мейотических нарушений (за исключением стадий тетрады), то у сорта Юбилейный 261 эта закономерность полностью не выявлена.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффект действия испытуемой оптимальной для томата концентрации ГК (0,02%) на процесс мейоза (независимо от сортовых особенностей) в M_1 незначителен.

7 с., библиогр. 12 назв.

Полный текст статьи дешифрован в ВИНТИ, № 810-В87 от 3.11.1987 г.

Поступило 29.V.1986 г.

МИКРОФЛОРА ВОЗДУХА ЖИВОТНОВОДЧЕСКИХ ФЕРМ И ЕЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ

Г. А. ШАКАРЯН, Т. К. СЕВЯН, З. М. АКОПЯН

Ереванский зооветеринарный институт

В задачу настоящих исследований входило выяснение бактериальной обсемененности воздушной среды животноводческих помещений и чувствительность выделенных микроорганизмов к антибиотикам в колхозе им. Джалалидзе (с. Кучак) Аларского района АрмССР.

Изучалась бактериальная загрязненность воздуха коровника, помещения, где находились телки 1—2-летние, телятника (1—2-месяч-

ные), овчарни, а также наружного воздуха территории на расстоянии примерно 100 м от животноводческих ферм.

Определялось общее число микроорганизмов, количество кишечных палочек, стафилококков, в том числе патогенных, а также сальмонелл, которые в основном характеризуют санитарно-гигиеническое состояние воздуха помещений.

Результаты наших исследований показали, что в наибольшей степени как в зимний, так и в летний периоды года был загрязнен воздух помещения коровника: зимой—27,4 тыс., летом—24,6 тыс. микр. тел в 1 м³ (хотя это количество значительно ниже рекомендуемых норм и отвечает зоогигиеническим требованиям).

В пределах нормы был загрязнен микробами также воздух телятника и помещения для нетелей, причем общее количество микроорганизмов зимой примерно в 2—3 раза было ниже, чем летом.

Общее количество микроорганизмов в воздухе овчарни как в зимний, так и в летний периоды года было значительно ниже рекомендуемых норм—5 тыс. микр. кл. в 1 м³ воздуха.

Из воздуха животноводческих объектов выделено определенное количество кишечных палочек. Значительное количество *E. coli* зарегистрировано летом в воздухе овчарни—12,7 тыс. микр. кл. в 1 м³.

При изучении морфологических особенностей выделенных культур выяснилось, что в данном хозяйстве в зимние и летние периоды года преобладали палочковидные микроорганизмы, из них примерно 17% составляли спорообразующие бактерии. Из шаровидных микроорганизмов примерно 30,3% составляли стафилококки, остальные были из рода монококков.

Изучалась также чувствительность шаровидных и палочковидных микроорганизмов, выделенных из воздуха животноводческих объектов, испражнений телят и ягнят, а также сена, к бициллину—3, тетрахлориду, левомицетину и мономицину.

Исходя из вышесказанного, рекомендуем временно воздержаться от применения в колхозе им. Джапаридзе, с. Кучак, Анаранского района пенициллиновых антибиотиков, а применять мономицин, левомицетин и тетрахлорид, к которым микроорганизмы проявили высокую чувствительность.

7 с., библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ, № 815-B87 от 5.II 1987 г.

Поступило 11.XI 1986 г.

О ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ ПОЛИМЕРНОЙ КЛЕЕВОЙ КОМПОЗИЦИИ КЛМ-1

А. А. МЕДОЯН, А. Н. ДЖАНДЖАПЯН, Г. В. АГАРОНЯН

ВНИИГИНТОКС, г. Ереван

Проведены токсикологические и санитарно-химические исследования полимерного клея КЛМ-1, предназначенного для использования в приборостроении для приклеивания металлических табличек, этикеток с надписями к оборудованию, приборам. В приборах бытового назначения клей не применяется.

В задачу исследования входило определение качественного состава и концентрации в воздухе веществ, мигрирующих из клеевой композиции, а также изучение кожно-раздражающих, кожно-резорбтивных и сенсибилизирующих свойств клея.

Исходя из рецептуры клея, ожидалась миграция в воздух таких вредных веществ, как хлоропрен, толуилдипиризоксанат, толуилсдизамин, винилхлорид, формальдегид, метанол, дибутилфталат, тиурам, дифенилгуанидин, кантакс, а также растворители — этилацетат и бензин. Определение указанных веществ проводилось общепринятыми в санитарно-химической практике фотометрическими и газохроматографическими методами, чувствительность которых дает возможность определить химические вещества на уровне ПДКр.з.

Для выявления периода наиболее интенсивной миграции летучих компонентов из клеевого слоя изучалась также кинетика изменения его массы.

Опыты по определению кожно-раздражающего, кожно-резорбтивного действия проводили на кроликах и белых крысах, сенсибилизирующие свойства изучали на морских свинках.

Результаты санитарно-химических исследований показали, что при воздухообмене 1 об/час имеет место превышение ПДКр.з. содержания бензина в воздухе, что вполне нормализуется при воздухообмене 3 об/час. Другие ожидаемые мигрирующие вещества не обнаружены.

Результаты токсикологических исследований показали, что клей КЛМ-1 не обладает кожно-раздражающими и кожно-резорбтивными свойствами. Он характеризуется слабо выраженными сенсибилизирующими свойствами, так как вызывает положительную реакцию специфического лизиса лейкоцитов у подопытных животных (показатель РСЛЛ > 10%).

Таким образом, результаты исследований показывают, что клей КЛМ-1 можно использовать по назначению, если предотвратить его непосредственный контакт с кожными покровами, а в производственных помещениях обеспечить воздухообмен не менее чем 3 об/час.

8 с., ил., библиогр. 7 назв.

Поступило 29.XI 1985 г.

Полный текст статьи дешифрован в ВНИИТИ, № 811-В87, от 5.II 1987 г.

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ЗАЩИТЫ ПЛОДОВЫХ КУЛЬТУР ОТ МОНИЛИОЗА

Э. А. ОГАНЯН

Армянский сельскохозяйственный институт, Ереван

Биологический метод борьбы с вредителями и болезнями приобретает все большую производственную значимость, однако по возбудителям монилиозов исследований мало.

В АрмССР возбудителями монилиального ожога и плодовой гнили разных семечковых и косточковых пород являются *Monilia fructigena* Pers., *M. cinerea* Bon., *M. cydoniae* Schell. Эпифитогии монилиального ожога айвы послужили причиной выкорчевывания многих гектаров насаждений айвы. Наряду с химическими методами, автором проводились исследования по биологическому методу борьбы с монилиозами.

Изучен антагонизм разных групп почвенных микроорганизмов: споровые бактерии, неспороносные бактерии, актиномицеты, азотобактерии, всего 666 штаммов, из коих 126 оказались антагонистами. Наибольшее количество выявлено среди споровых и неспороносных бактерий, затем среди актиномицетов. Эти микробы-антагонисты имеют важное значение для уменьшения инфекционного запаса почвы.

Следующим этапом работы было изучение действия антибиотиков на монилиальные грибы (*in vitro*). Исследованы 38 различных антибиотиков, в том числе трихотексин, полиоксин, касумин, леворин, полимиксин. Установлено, что наибольшую активность с фунгицидным действием как на споры, так и на мицелий монилиальных грибов имеет трихотексин (100 ед/мл).

Действие антибиотиков сравнивали с используемыми стандартными фунгицидами (бордоская жидкость, цинеб, ДНОК). В настоящее время большой интерес представляют вопросы интегрированного метода борьбы. Комбинированное использование антибиотиков с малыми дозами фунгицидов имеет практическое значение для борьбы с монилиозами.

8 с., табл. 3, библиогр. 9 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВИНИТИ, № 1016-В87 от 11.11.1987 г.

Поступило 18.VI 1986 г.

ВЛИЯНИЕ СЕМЕРОНА НА ФРАКЦИИ АЗОТА В БЕЛОКОЧАННОЙ КАПУСТЕ

А. Л. БАЛАЯН, Л. А. АДЖЕМЯН, Р. Г. НАЗАРЯН

Институт защиты растений Госагропрома Армянской ССР, п. Мерцаван

В борьбе против однолетних двудольных сорняков на посадках бело-кочанной капусты высокую эффективность проявил семерон. Обладая высокой биологической активностью, этот гербицид может оказать влияние на направленность метаболических процессов в растении.

В литературе мы не нашли данных о влиянии семерона на азотный обмен указанной культуры, являющийся ключевым в метаболизме растений. Наши исследования посвящены изучению этого вопроса.

Опыты были заложены по следующей схеме: 1) контроль (за вегетационный период проведены 4 ручные прополки); 2) $N_{20}P_{15}K_{20}$; 3) семерон; 4) семерон + $N_{20}P_{15}K_{20}$.

Растения опрыскивали семероном в фазе 2—4 листьев. Минеральные удобрения в виде подкормки ($N_{20}P_{15}K_{20}$) были внесены через 30 дней после обработки гербицидом. Пробы листьев капусты брали через час, а в дальнейшем через 30, 40, 60, 80 дней после обработки. Пробы же кочана и корней — лишь через 60 и 80 дней после обработки.

Анализы показали, что гербицид не вызывает существенных изменений в содержании фракций азота в листьях в течение 40 дней после опрыскивания. На 60-й день в обработанных листьях отмечено повышение количества общего азота за счет белкового (на 16%). В дальнейшем разница в содержании форм азота шла на убыль и через 80 дней не отмечалось отклонений от контроля.

Обратная картина наблюдалась в кочане, где под влиянием семерона через 60 дней происходило снижение содержания белкового азота на 20,5%; через 80 дней имело место повышение количества небелкового азота, вероятно, за счет притока аминокислот (они составляют основную долю небелковой фракции азота) из корней, где уровень его был ниже контроля. Приток аминокислот привел к усилению синтеза белков в кочане обработанных растений.

Результаты наших исследований в условиях лизиметров показали, что в дальнейшем семерон не оказывает отрицательного влияния на содержание белкового азота в кочане.

В опытах с подкормкой обработанных растений капусты было установлено, что спустя 10 дней происходит повышение содержания белкового азота в листьях на 9,2%. Однако следует отметить, что стимулирующее действие гербицида в указанных условиях проявилось лишь в этот срок. В целом подкормка капусты минеральными удобрениями на фоне гербицида не вызывает заметных отклонений от контроля.

Таким образом, семерон, в целом, не оказывает отрицательного влияния на азотный обмен белокочанной капусты как на фоне подкормки минеральными удобрениями, так и без нее.

6 с., табл. 1, библиогр. 6 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ, № 809-В87 от 5.11.1987 г.

Поступило 5.11.1987 г.

ОБ АНТИМИКРОБНЫХ СВОЙСТВАХ ЭФИРНОГО МАСЛА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ИРИСА

З. В. МАРШАВИНА, Л. К. АСЛАНЯНЦ, Э. А. МАРОЯН

Институт микробиологии АН Армянской ССР, г. Абовян

Испытывалось действие эфирного масла на ряд бактерий, в частности, на *Escherichia coli* 5003, *Bac. subtilis* ATCC—6633 *Staphylococcus aureus* 5233, *Candida albicans*. Бактерицидную активность изучали методом серийных разведений эфирного масла из маточного спиртового раствора (10 мг/мл). Антимикробное действие проявлялось в образовании стерильных зон вокруг цилиндриков с препаратом эфирного масла на фоне газонов культур. Радиус зон колебался в 3—7 мм.

Подавляющий эффект эфирное масло оказывало в концентрации 20 мкг/мл, особенно сильно на кишечную палочку. Бактерицидное действие проявлялось в течение пяти дней, после чего стерильные зоны за-растали.

Полученный эффект можно объяснить влиянием летучих компонентов эфирного масла на обмен веществ у вышеуказанных культур микроорганизмов.

Биологические свойства эфирного масла не ограничиваются антимикробными свойствами. Анализ показал наличие в эфирном масле культуры клеток ириса 10—20% токоферолов.

5 с., библиогр. 10 назв.

Полный текст статьи депонирован в ВНИИТИ, № 3123 В67, от 4.V 1987 г.

Поступило 11.11 1987 г.

ВОСПОМИНАНИЯ О ПРОФЕССОРЕ И. Л. БЕДЕЛЯНЕ

(к 110-летию со дня рождения)

Профессор Иоаким Лазаревич Беделян был моим первым учителем в области физиологии растений, и воспоминания о нем являются яркими страницами моей научной жизни.

Когда в Ереване в начале двадцатых годов создавался Университет, профессор И. Л. Беделян, оставив Ростов, переехал в Ереван. Здесь во вновь созданном Университете организует он кафедру анатомии и физиологии растений. Это был 1923 год — начальный период становления Университета, который, проходил в тяжелых условиях: не хватало лекционных аудиторий, не было лабораторных комнат и оборудования. Вот тогда в небольшой аудитории III курса агрономического факультета начинал свои лекции по физиологии растений И. Л. Беделян. С первой же лекции он захватил внимание студентов, и все увлеченно слушали его богатую содержанием, стройную и доходчивую речь на прекрасном армянском языке. Так было и в течение всех последующих лет — Иоаким Лазаревич был широко эрудированным и талантливым лектором и обладал разносторонними знаниями.

И. Л. Беделян родился в 1874 году в Краснодаре, среднее образование получил в духовной семинарии города Ростова на Дону и, хотя до переезда в Ереван он не бывал в Армении, армянский язык был ему столь же близок, как и русский. Знал он и немецкий, и французский языки, так как после окончания Сельскохозяйственной академии работал в Петербурге, Мюнхене, Париже, Берлине и Копенгагене.

Рассказывая о различных сторонах жизнедеятельности растений, Иоаким Лазаревич в своих лекциях много внимания уделял взаимодействию органов и целостного растительного организма, связям между функцией и строением органа и с особым подъемом читал разделы, касающиеся роста и движения растений — тропизмы, так-

сисы и эстини, морфогенез и формообразование.

Из рекомендуемых учебных пособий Иоаким Лазаревич выделял, как особенно важные, учебники по физиологии растений Д. П. Ивановского и Носа. Сам же создал на армянском языке капитальный учебник «Физиология растений», ставший ценным пособием для студентов. Таким же ценным пособием явилась и написанная им вторая книга, «Анатомия растений».

С течением времени одновременно с чтением лекций Иоаким Лазаревич организовал практикумы по физиологии и анатомии растений в предоставленном кафедре флигеле во дворе Университета, которые расширялись по мере увеличения возможностей получения материалов, приборов и реактивов.

Внешне всегда подтянутый, аккуратный, с красивыми чертами лица точечного носа и добрыми глазами, он внимательно относился к студентам, к их просьбам и нуждам, не допускал пренебрежительного отношения к занятиям и вместе с тем много помогал и способствовал развитию у студентов интереса к науке и научным открытиям. В среде студенчества и профессорско-преподавательского состава Иоаким Лазаревич пользовался большой любовью и популярностью как ученый, талантливый педагог и человек высокой культуры.

До переезда в Ереван научная деятельность И. Л. Беделяна проходила как в нашей стране, так и за рубежом. Он работал в Никитском ботаническом саду, в Ростовском университете, во Флоренции, в лабораториях Берлинского и Копенгагенского университетов. Именно в этих лабораториях определялось основное направление научных исследований Иоакима Лазаревича, которое заключалось в изучении вопросов строения и функции устьиц у кактусов, сравнительном изучении интенсивности испарения у суккулентных растений

и мезофитов, роли различных приспособительных признаков — листового залета, являющегося покровом и др. в регуляции испарения. В этой области И. Л. Беделяном в период с 1910 по 1938 гг. была опубликована серия статей, начинающаяся с доклада, сделанного им на XII съезде естественных испытателей и врачей, «О роли анатомического метода и освещении экологических и биологических фактов».

И. Л. Беделян занимался также изучением тропизмов растений и позднее, уже на кафедре физиологии и анатомии растений Ереванского университета, им вместе с сотрудниками кафедры проводились исследования по изучению различного типа тропизмов в лабораторных условиях.

И. Л. Беделян как с научными, так и с этнографическими целями побывал во многих странах мира — был на островах Северного Ледовитого океана, в Египте, Индии, в ряде стран Европы и привозил оттуда различные научные и достопримечательные материалы.

Профессор Беделян И. Л. обладал большими научно-организационными способностями — он принимал участие в организации в Ереване в 1928 году Зооветеринарного института имени Закавказской и основал там кафедру ботаники, где проводилось обучение на русском языке по всем разделам этой дисциплины. А когда агрономический факультет Университета был преобразован в биологический и одновременно был создан Армянский сельскохозяйственный институт, то и в этом институте Иосифом Лазаревичем была основана кафедра, кафедра физиологии растений и микробиологии.

Таким образом, И. Л. Беделян с полным правом вошел в историю развития науки в Армении как основоположник физиологии растений, и многие поколения специалистов — биологов и агрономов, обучавшихся в Университете, Зооветеринарном и Сельскохозяйственном институтах являются учениками профессора И. Л. Беделяна.

Мне очень повезло в жизни, когда я получил предложение от Иосифа Лазаревича в самом начале существования кафедры в Зооветеринарном институте занять место ассистента и помогать ему при чтении лекций и проведении практических занятий. Здесь мне стали близки все стороны педагогической деятельности Иосифа Лазаревича, и я смог убедиться в том, что он был всецело предан делу подготовки новых молодых кадров и развитию науки.

Мне было поручено проведение практических занятий по морфологии и физиологии растений. Много времени занимала организация практикума по физиологии растений, который мы запови готовили, беря за основу опубликованный практикум проф. А. А. Рихтера, проводимый в Саратовском университете. Студенты с большим интересом занимались небольшими опытами по различным разделам физиологии растений. Сложной аппаратуры на кафедре не было, поэтому приходилось довольствоваться малым практикумом, который, тем не менее, тщательно способствовал ознакомлению студентов с методами изучения жизни растений.

В эти годы (1928—1930 гг.) под влиянием лекций И. Л. Беделяна мною были начаты первые экспериментальные исследования по фототропизму растений, точнее по изучению влияния света разного качества, одностороннее излучающего из этилированных проростков овса и гороха. Растения сначала выращивались в полной темноте в отдельных камерах, а затем через специальную щель подвергались воздействию синего или красного света.

Иосиф Лазаревич с большим вниманием относился к этим предварительным опытам, давал советы, делился своим большим жизненным опытом, и наши отношения, не утрачивая делового характера, стали дружескими, мы часто беседовали на темы, далеко выходящие за пределы взаимоотношений профессора и ассистента. Иосиф Лазаревич стал мне близким человеком. Когда же выяснилась необходимость в более строгой постановке дальнейших опытов по фототропизму, Иосиф Лазаревич решил командировать меня на стажировку в Киев к известному специалисту по фитогормонам проф. Н. Г. Холодному и вместе с заведующим кафедрой растениеводства проф. Н. А. Троицким написал ему лично. Хотя эта командировка и не состоялась, но уже в 1931 году И. Л. Беделян поддержал мое желание и направил меня в аспирантуру Академии наук СССР в Ленинград, где я был принят в качестве аспиранта в лабораторию физиологии и биохимии растений (ЛБНФР). На период первого вегетационного сезона я был направлен в ВПР (Всесоюзный институт растениеводства), в отдел физиологии, где работал под руководством проф. Н. А. Максимовича, а осенью с приходом проф. А. А. Рихтера, избранного академиком и назначенного заведующим лабораторией, вернулся в ЛБНФР.

Именно в этот год сформировалась основная линия моего научного направления, в котором значительную роль сыграли установленные Д. И. Ивановским этапы всего тропического процесса и целом: раздражение и воспринимающем (рецепторном) органе, возникновение стимула, перемещение стимула в другой орган, реакция. Принцип расчлененности отдельных этапов фототропизма был применен мною в фотопериодизме, где главным критерием было цветение, и это явилось началом большой работы, у истоков которой лежали интересы и советы И. Л. Беделяна.

В моем кабинете в Москве в Институте физиологии растений АН СССР имеется галерея портретов моих непосредственных учителей—акад. А. А. Рихтера и Н. А. Максимов, проф. Г. С. Зайцева и тех ученых, с которыми я близко общался,—акад. Н. Н. Вавилова, Н. Г. Холодного, Д. Н. Прянишникова и других, галерея начинается с портрета проф. И. Л. Беделяна.

Иоаким Лазаревич был разносторонне образованным человеком—любил художественную литературу, искусство, живопись, музыку. Произведения А. С. Грибоедова, и А. П. Чехова Иоаким Лазаревич любил особенно и специально изучал творчество этих замечательных писателей. В связи с этим вспоминается такая история. На работу только что открытой кафедры земледелия Университета поступает молодой ассистент Аксель Бакуни, который только что закончил агрономический факультет бывшего Харьковского политехнического института и некоторое время проводил с нами практические занятия по частному земледелию. Иоаким Лазаревич имел отношение к этой кафедре, так как один год читал небольшой курс по общему земледелию. Вероятно, Иоаким Лазаревич произвел впечатление на А. Бакуни своими незаурядными знаниями в области литературы. Во всяком случае спустя несколько лет А. Бакуни обратился именно к Иоакиму Лазаревичу уже от имени Армянского отделения РАПИП

выступить с докладом о творчестве А. С. Грибоедова в связи с годою первой постановки пьесы А. С. Грибоедова «Горе от ума» в Ереване. Иоаким Лазаревич охотно согласился и сделал прекрасный доклад.

И. Л. Беделян был человеком большой души, высокой морали, доброжелательным, с тонким чувством юмора, любил общество, часто приглашал молодежь к себе на вечер,—много рассказывал, шутил. Лишь очень редко появлялась на лице горечь, когда он говорил нам: «Цените семью» (сам он большую часть жизни прожил одиноким).

Иоаким Лазаревич был единственным в городе обладателем механического пианино с большим, приспособленным к нему ящиком, куда вкладывались ноты—произведения в исполнении выдающихся пианистов. Мы наслаждались этой музыкой в немалой мере, чем сам хозяин.

После почти десятилетнего перерыва состоялась наша последняя встреча, когда Иоаким Лазаревич в сопровождении племянника Арташеса Ивановича Хримяна приехал в Москву и остановился у нас на квартире. Все мы были опечалены состоянием Иоакима Лазаревича—он тяжело болел и приехал проконсультироваться о возможном операционном вмешательстве. Но операция не состоялась. Иоаким Лазаревич перенес это решение консилиума стоически и до отъезда не менял налаженного порядка дня—по вечерам мы беседовали на разные темы, но больше всего читали вслух по очереди, Арташес и мы с моей супругой Тамарой, рассказы А. П. Чехова, которые Иоаким Лазаревич называл сам, и радовались, что они приносят ему наслаждение и успокоение.

Ушел от нас И. Л. Беделян рано, когда он мог сделать еще много ценного для науки, для воспитания молодежи, для поддержания высокой человеческой морали, личностью которой он был.

Академик АН СССР и АН АрмССР
М. Х. ЧАПЛАНЯН

КРИТИКА И БИБЛИОГРАФИЯ

Поруцкий Г. В. Н. Г. Холодный. Избранные труды (гл. ред. К. М. Сытник), Киев. Наукова думка, 1982, 443 с.

Рецензируемая книга — юбилейный сборник, изданный АН УССР к 100-летию выдающегося ученого, действительного члена Московского общества испытателей природы, академика АН УССР Николая Григорьевича Холодного, включает 20 работ, написанных за период с 1930 по 1951 г. Работам Н. Г. Холодного предшествует вводная статья К. М. Сытника и малозвестный портрет ученого.

Н. Г. Холодный оставил богатое интеллектуальное наследие. Оно и составило основу юбилейного сборника. Публикуются впервые «Воспоминания и мысли натуралиста» (автобиография ученого, с. 25—139), «Мысли натуралиста о природе и человеке», (с. 139—207) и другие ранее не опубликованные работы.

Датированные 1944 г. «Воспоминания и мысли натуралиста» представляют собой не только документальныи рассказ о развитии целей раздела физиологии растений микробиологии, эндокринологии (см. также «Успехи эндокринологии растений за последнее десятилетие», с. 383—401), но содержат приметы времени и обнаруживают острую социальную зоркость автора (см. также «Успехи материалистической диалектики в физиологии растений и микробиологии», с. 343—349). Воспоминания и мысли ученого — это и история и современность, и связь времен, теория и практика научной работы в природе и лаборатории, это деловой отчет об открытом и установленном, смелый взгляд вперед и мудрое завещание последующим поколениям.

С паразитальной глубиной Холодный анализирует творчество своих учителей: О. В. Баранецкого, С. Г. Навашина, А. Н. Гиларова, Г. Н. Челпанова, Н. В. Цингера и др. Слово «гормон», ставшее революционным парадоксом биологии XX века, Николай Гри-

горьевич услышал впервые из уст Г. Н. Челпанова. Из воспоминаний Холодного мы узнаем не только о биологических и философских проблемах, которые волновали ученого и его современников, но, скажем, и о характере О. В. Баранецкого, С. Г. Навашина и др. (см. также «Чему учил С. Г. Навашин как естественный деятель», с. 289—295).

Точность изображения объектов исследований, особенно микроскопических объектов, выполненных Холодным, всегда поражала биологов. Этим он обязан своему учителю С. Г. Навашину. У него он перенимал мастерство и микроскопической техники и любовь к препарату. Рисунки позволяли ученому глубже проникать в сложные явления природы. Запоминается зарисовка Холодным горы Яман-Тау, в которой красота Южного Урала объединены в широкую панораму (и гимназии Николай Григорьевич прошел курс рисования у художника Г. А. Маларова). К этому необходимо добавить, что Холодный был страстным путешественником. По рисункам и книгам ученого К. Паустовский учился читать великую книгу природы.

Переполненный идеями ученый часто менял направления своих научных исследований, но сквозь разнообразие его научных исканий чаще всего просвечивали практические задачи. Это относится к гормонизации растений, «истеканию» зерна, облесению Днепровских лесов и пр. Предпринятое ученым исследование микрофлоры железистых и серных вод Кавказа было связано с проблемами здравоохранения. Ветком этих исканий ученого являлись также классические работы, как «Железобактерии», «Фитогормоны», «Новое о воздушном питании растений», «Среди природы и в лаборатории». Сборник «Среди природы и

в лаборатории» был издан МОНП в 1948 г. при непосредственном участии С. Ю. Липшица.

Приблизительно в 1937 г. Холодный задумал книгу, посвященную антропокосмическим проблемам — итогу своей переписки с В. И. Вернадским, С. Н. Виноградским, Б. Л. Личковым, А. А. Богомольцем, А. А. Любицким и др. Вплотную этой книгой он занялся в 1942—43 гг. в Сочи и Кировске. Первый вариант книги был напечатан издательством «АРМФАН». Книга печаталась на бумаге, переданной издательству И. А. Орбели из фонда президента АН Армянской ССР. «Мысли» Н. Г. Холодного опередили свое время более чем на четверть века. Книга эта в дальнейшем непрерывно перерабатывалась в зависимости от замечаний В. И. Вернадского и других корреспондентов ученого. Новые разделы науки о природе и космосе послужили основой для изложения в «Мыслях» космического миропонимания природы, анализа космических исканий В. И. Вернадского и других ученых, их опыта освоения нашей планеты как единого космического, геологического, биогенного и антропогенного процесса. Поэтому антропокосмизм на современном его этапе Н. Г. Холодный определяет как попытку «пересмотреть вопрос о месте человека в природе и о взаимоотношениях его с космосом на основе естественно-научных знаний нашего времени и философии диалектического материализма» (с. 191).

Эпистолярное наследие Холодного — богатый источник мыслей, идей об эволюции материи, мироздания и живого вещества,

возникновения жизни, изменчивости, наследственности, целесообразности в биологии и др.*. Из эпистолярного наследия ученого в юбилейный сборник не вошла его переписка с отечественными и зарубежными биологами. Это материал для следующего тома, который готовили ученики Николая Григорьевича И. И. Белоконов и А. Ф. Оскерко, а также друг и сотрудник ученого профессор А. П. Афанасьев.

Есть в книге некоторые огрехи, правда, легко устранимые. Не расшифрованы фамилии современников Холодного, которые обозначены автором заглавными буквами; друга юности ученого, профессионального революционера Дмитрия Стихия (с. 44), профессора Киевского университета И. Д. Бордяловского (с. 52), харьковского профессора физиолога А. П. Котлумбеского, (с. 64); неправильно указаны инициалы Б. М. Козо-Полянского (с. 24). Встречаются досадные опечатки и пропуски в отдельных статьях сборника. Так, например, в предисловии к «Мыслям натуралиста и природе и человеке» Н. Г. Холодный писал: «Автор не думает, что эти его мысли будут полностью разделены и поддержаны большинством современных советских натуралистов и философов». Вместо слова «эти» напечатано «если», что лишает смысла целое предложение, (с. 141), на с. 143 (тезис 5) пропущено слово «шаги», на с. 165 (тезис 47) пропущены слова (respective, организмов) и др. Эти огрехи досадны, но не снижают ценности самого факта публикации замечательного и поучительного эпистолярного наследия Н. Г. Холодного.

* См. Г. В. Порункин. «Філософська думка», 1984, № 4, с. 122—123.

