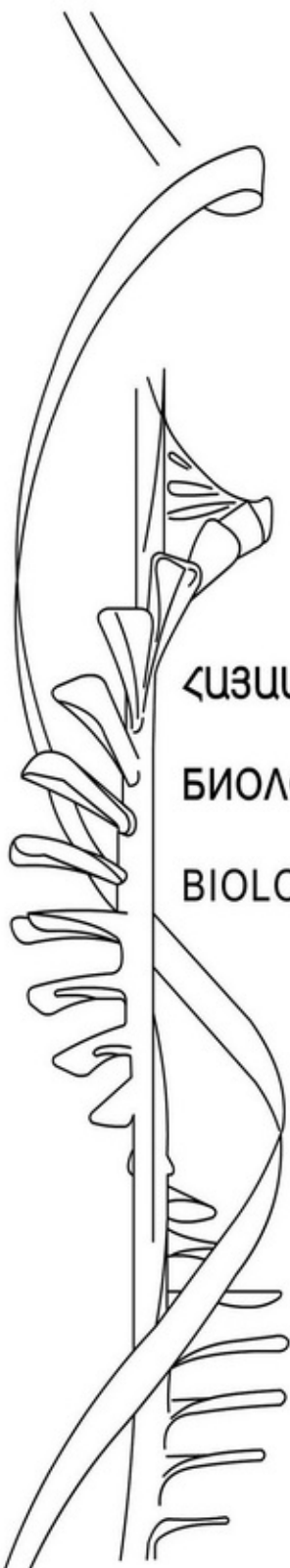


ISSN 0366-5119

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



ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆՐԵՍ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

BIOLOGICAL JOURNAL OF ARMENIA

«Հայտանի կենսաբանական հանդեսը» իրատարակվում է Հայաստանի Հանրապետության գիտությունների ազգային ակադեմիայի կողմից և տպագրում է հոդվածներ բուսաբանության, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաքիմիայի, կենսաֆիզիկայի, մանրէաբանության, գենետիկայի և ընդհանուր ու կիոարական կենսաբանության այլ րնագավառների վերաբերյալ:

“Биологический журнал Армении” публикует оригинальные статьи по ботанике, зоологии, физиологии, биохимии, биофизике, микробиологии, генетике и другим отраслям общей и прикладной биологии.

Խմբագրական կոլեգիա՝ Է.Կ.Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ծ.Մ.Ավագյան, Հ.Գ.Բակլավադյան, Մ.Ա.Դավթյան, Ժ.Ի.Հակոբյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ), Ռ.Մ.Հարությունյան, Վ.Հ.Ղազարյան, Պ.Ա.Նանգիլյան, Կ.Գ.Ղաքաչյուզյան, Ս.Խ.Մայրապետյան, Ա.Հ.Մուսիսյան, Ռ.Հ.Պապանյան (պատասխանատու քարտուղար)

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է.Կ.Աֆրիկյան (նախագահ), Է.Զ.Գաբրիելյան, Ա.Ա.Գալոյան, Ա.Լ.Թախտաչյան, Պ.Ա.Խորշոդյան, Ռ.Տ.Ղարիբջանյան, Կ.Ս.Պաղոսյան, Ա.Գ.Փանոսյան, Լ.Լ.Օսիպյան

Редакционная коллегия: Э.К.Африкян (главный редактор), Ц.М.Авакян, Ж.И.Акопян (заместитель главного редактора), Р.М.Арутюнян, О.Г.Баклаваджян, П.А.Гандилян, М.А.Давтян, В.О.Казарян, К.Г.Карагезян, С.Х.Майрапетян, С.О.Мовсесян, Р.О.Папанян (ответственный секретарь)

Редакционный совет: Э.К.Африкян (председатель), Э.Ц.Габриелян, А.А.Галоян, Б.Т.Гарибджанян, Л.Л.Осипян, А.Г.Паносян, К.С.Погосян, А.Л.Техтаджян, П.А.Хуршудян

Ответственный за номер Э.К.Африкян

Сдано в набор 10.08.95 г. Подписано к печати 20.09.95 г.

Бумага No.2, 70x1081/16. Печать офсетная. Печ.лист 4,5 Усл.печ.лист 6,5

Учет.изд. 5,0. Тираж 230. Заказ 7. Издат. 7736.

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

Издательство “Гитутюн”, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24г.

Типография Центра научной информации НАН Армении.

Адрес: Ереван-1, ул. Абовяна 15

Վարդանյան Ն.Ս., Աֆրիկյան Ի.Կ. Նոր ֆակուլտետի վստահության օրսքիդսցնող բակտերիա Հայաստանի սովետական հանրապետության	3
Վարդանյան Ն.Ս. Մետաղների կորզումը մեղոֆիլ և քերմոֆիլ տեմոլիքտուրաֆրակուերիաներով	8
Խաչատուրյան Ա.Ա., Ղսզանյան Ն.Լ., Խաչատուրյան Ն.Ս. Աղամյան Մ.Օ. Խաչիկյան Լ.Ա. Հայաստանի հիմնական հայաստիայելում բացիլները Լքստրեմոֆիլ ձևերի Լկոլոգիայի մասին	12
Աղամյան Մ.Օ., Արսյան Վ.Հ. Աղասեր բացիլի ցիկլոմալառդերսսրլլմ գլլոկանտարսնսֆերսզր	19
Կիրակոզովա Ռ.Ա. Իկոդեքսարիմների որոշ ամսնցյալների օգասսզրոմը քրոմսսոզրսֆիսյոմ	24
Գասպարյան Ա.Վ. Բետս - ամիլսզի սսրսոմոմը ամլոյ սսլոյսսոսզսցնող բակաերիսնների սոս	28
Գասպարյան Ա.Վ. Bacillus polynyx - յի իմոքիլզացված բետս - ամիլսզի սսսս-ցոմը և բնոյսզրոսր	33
Չիսյան Կ.Վ., Խաչատուրյան Ա.Ա. Բիոս-զակսսոզիսոզսլլի սսրսոմվսոմոյոմը բսսիլների Լքստրեմոֆիլ ձևերի մոս	39
Չիսյան Կ.Վ., Արսյան Վ.Հ. Որոշ ցերմսսեր բսցիլների բնաս-զակսսոզիլսզսններ	43
Բաղդասարյան Ա.Ն. Ջերմսսեր բսցիլների և ճոսոզսյրսսնկների սսզարսսզսյին սկսիվոյոմեր	47
Բաղդասարյան Ա.Ն. Ասսրսրոսզի և սսսրսրսստ-բետս-ղնկսրբոյսիլսզի սրսսոդրիլների սրսսյանմսն մերոլների հնմմսսսկսն բնոյսզրոմը	51
Պիվսզյան Լ.Ա., Դսվրյան Ս.Ա., Խաչատուրյան Ն.Ս., Խաչատուրյան Ռ.Ն. Բսլսյան Ա.Ա. Ինոլիմսզների սսրսոմվսոմոյոմը միկոսկոսիլ սնկների մոս	56
Ավսզյան Ջ.Գ., Ավսզյան Ն.Ա., Աֆրիկյան Է.Կ. Բսցիլի սսզրոզն շսսմը որսնս ինոլիմսզի արսսոդրիլ	61
Նսլրսնդյան Ա.Ջ., Մսրետյան Գ.Ս., Բսղդասարյան Ի.Բ. Սոյսյի սսզարարսկսերիսնների ճոր շսսմների «կնսարսնսկսն» սզոսի ֆիքսսցիսյի սրոյոմսվսսոյրյան մսսին	64
Օրմսնյան Ժ.Խ., Թսղետյան Պ.Ե., Կինոյան Մ.Հ. Նսր հետսնկսրսյին բակտերիսլ շսսմներ րոմսկների դն սլ սյրսրի հսմսր	67
Կարսսետյան Ս.Գ. Հոդի սղսզերոման սլրոցնսլ և ճրս ցրս-սսլսյին ոեմիմի օսլիմիզացման սսլին	71

Դինույան Մ.Հ., Օրմսնյան Ժ.Խ., Չիլ-Հակոբյան Լ.Ա., Թադևոսյան Պ.Ե. Հագիլների նոր շատն կոլորալյան բզեզի դեմ պայքարելու նսմար	79
Դրայեյան Կ.Ա., Հովհաննիսյան Ջ.Ա., Ազատյան Ս.Ա. Յոդի սզդեցությունը քլորիայի կենսոնակության վրա	81

ԼՐԱՏՈՒ

Ագրիկյան Է.Կ., Խաչատուրյան Ա.Ա., Հարությունյան Ա.Ե. Մսնրների ափսնդսոդմսն հսնրսսնսսսսսն կենսոմն	83
---	----

СОДЕРЖАНИЕ

Вертания Н.С., Африкан Э.К. Новая факультативно автотрофная тиосульфатснсляющаа бадерия из сульфидных месторождений Армении	3
Вертания Н.С. Выщелачивание металлов мезофильными и термофильными хемолитотрофными бактериями	8
Хачатурян А.А., Казанчян Н.Л., Хачатурян Н.С., Адамян М.О., Хачикян Л.А. Об экологии экстремофильных форм бацилл в основных типах почв Армении	12
Адамян М.О., Абелян В.А. Цикломальтодекстрин-глюканотрансфераза гемофильного бацилла	19
Киракозова Р.А. Применение некоторых производных циклодекстринов в хроматографических анализах	24
Гаспарян А.В. Распространение бета-амилазы у аэробных спорообразующих бактерий	28
Гаспарян А.В. Получение и характеристика иммобилизованной бета- амилазы <i>Bacillus polymixa</i>	33
Читчян К.В., Хачатурян А.А. Распространение бета-галактозидазы у экстремо-фильных форм бацилл	39
Читчян К.В., Абелян В.А. Бета-галактозидазы некоторых термофильных бацилл	43
Багдасарян С.Н. Аспартазная активность термофильных бацилл и акциномицетов	47
Багдасарян С.Н. Сравнительная характеристика методов сохранения бактериальных продуцентов аспартазы и аспартаг-бета-декарбоксилазы	51
н Л.А., Давтян С.А., Хачатурян Н.С., Хачатурян Р.Н., Баляян А.М. Распространение инулиназ у микроскопических грибов	56

<i>Авакян З.Г., Айвазян Н.А., Африкян Э.К.</i> Аспорогенный штамм бацилла-продуцент инулиназы	61
<i>Напбандян А.Д., Матевосян Ф.С., Багдасарян И.Б.</i> Об эффективности фиксации "биологического азота" клубеньковыми бактериями сои	64

<i>Орманян Ж.Х., Татевосян П.Е., Киносян М.А.</i> Новые перспективные штаммы бактерий для борьбы с комарами	67
---	----

<i>Карапетян С.Г.</i> О процессе расселения почвы и оптимизации ее водно-солевого режима	71
--	----

<i>Киносян М.А., Орманян Ж.Х., Чил-Акопян П.А., Татевосян П.Е.</i> Новый штамм для борьбы с колорадским жуком	79
---	----

<i>Микаелян К.А., Оганесян Д.А., Азатян С.А.</i> Действие йода на жизнеспособность хлореллы	81
---	----

ХРОНИКА

<i>Африкян Э.К., Хачатурян А.А., Арутюнян А.Е.</i> Республиканский центр депонирования микробов Армении	83
---	----

CONTENTS

<i>Vartanian N.S., Afrikian E.G.</i> A new facultatively autotrophic thiosulfate oxidizing bacterium from Armenian sulfide ore deposits	3
---	---

<i>Vartanian N.S.</i> Metal recovery by mesophilic and thermophilic chemolithotrophic bacteria	8
--	---

<i>Khachatryan A.A., Kazanchian N.L., Khachatryan N.S., Adamyan M.O., Khachikian L.A.</i> About the ecology of extremophilic forms of bacilli in the main types of soils of Armenia	12
---	----

<i>Adamyan M.O., Abelian V.H.</i> Cyclomaltodextrin glucanotransferase from halophilic bacilli	19
--	----

<i>Kelakozova R.A.</i> Use of some cyclodextrin derivatives for chromatographic analysis	24
--	----

<i>Gasparyan A.V.</i> Distribution of beta-amylase in aerobic spore-forming bacteria	28
--	----

<i>Gasparyan A.V.</i> Isolation and characteristics of immobilized beta-amylase from <i>Bacillus polymyxa</i>	33
---	----

<i>Chitebian K.V., Khachatryan A.A.</i> Distribution of beta-galactosidase among the extremophilic forms of bacilli	39
---	----

<i>Chitebian K.V., Abelian V.A.</i> Beta-galactosidase of some thermophilic bacilli	43
---	----

<i>Bagdasarian C.N.</i> Aspartase activity of thermophilic bacilli and thermoactinomycetes	47
<i>Bagdasarian C.N.</i> Comparative characteristics of efficiency of conservation methods for maintenance of aspartase and aspartate-beta-decarboxylase activity of bacteria	51
<i>Pivazian L.A., Davtian S.A., Khachaturian N.S., Khachaturian K.N., Balalian A.M.</i> Distribution of inulinases among the microscopic fungi	56
<i>Avakian Z.G., Aivazian N.A., Afrikian E.G.</i> The asporogenous strain of bacillus-producer of inulinase	61
<i>Nalbandian A.D., Matevosian F.S., Bagdasarian U.B.</i> About the efficiency of the biological nitrogen fixation by the new strains of nodule-forming bacteria of soybean	64
<i>Ormanian Zh.Kh., Tadevosian P.E., Kinosian M.H.</i> New perspective bacterial strains to struggle against the mosquitos	67
<i>Karapetian S.G.</i> On the process of soil desalination and optimization of its water-saline conditions	71
<i>Kinosian M.H., Ormanian Zh.Kh., Chul-Hakobian L.A., Tadevosian P.E.</i> A new perspective strain in the struggle against the colorado beetle	79
<i>Mikaelian K.A., Oganeccian D.A., Azatian S.A.</i> The action of iod on capable of living of chlorella	81

CHRONICALE

<i>Afrikian E.G., Khachaturian A.A., Harutyunian A.E.</i> The state depository centre of microorganisms	81
---	----

1 (48) 1995

Биол. журн. Армении, 1 (48) 1995

УДК 579.846

НОВАЯ ФАКУЛЬТАТИВНО АВТОТРОФНАЯ ТИОСУЛЬФАТОКИСЛЯЮЩАЯ БАКТЕРИЯ ИЗ СУЛЬФИДНЫХ МЕСТОРОЖДЕНИЙ АРМЕНИИ

Н.С. ВАРТАНЯН, Э.К. АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из проб отвала руды Тандзутского месторождения выделена новая грамотрицательная бактерия, способная окислять тиосульфат в автотрофных условиях. Окисление бактериями тиосульфата стимулируется в присутствии органических веществ. Бактерии проявляют также способность к гетеротрофному росту на глюкозе, дрожжевом экстракте и гидролизате казеина.

Бактерия мезофильная с оптимумом pH 7,0. При начальном значении pH ниже 6,0 и выше 8,8 бактерии не развиваются. Однако при росте способны снижать pH среды до 4,7.

Предполагается, что выделенная бактерия представляет собой новый подвид факультативно автотрофных тионовых бактерий, окисляющих тиосульфат.

Տանձուտի հանքավայրի հանքարտադրային բաժանմանի նմուշներից անջատվել է նոր գրամբացարկուհի բակտերիա, որն ընդունակ է օքսիդացնել թիосульфատ ավտոտրոֆ պայմաններում: Թիосульфատի օքսիդացումը բակտերիայի կողմից խթանվում է օրգանական նյութերի առկայությամբ: Բակտերիան նաև կարող է ընթաց գլյուկոզի, շաքարամեղրային էքստրակտի և կազեինի հիդրոլիզատի վրա աճելու ընդունակություն:

Բակտերիան մեզոֆիլ է, օպտիմալ pH-7,0: Արտոտրոֆի սկզբնական 6,0-ից ցածր և 8,8-ից բարձր pH-ի պայմաններում բակտերիան չի զարգանում, սակայն աճման ընթացքում կարող է նվազեցնել մեդիումից ալկալիայի pH-ը մինչև 4,7: Անհրազդվում է, որ անջատված բակտերիան իրենից ներկայացնում է ֆակուլտատիվ ավտոտրոֆ թիոնային ֆակուլտատիվ-աուտոտրոֆ բակտերիաների նոր ենթատեսակ:

New Gram negative bacteria capable of oxidizing of thiosulfate in the autotrophic conditions from the dump samples of Tandzyl sulfide ore deposits has been isolated. Oxidation of thiosulfate by the bacterial culture was stimulated in the presence of organic compounds. The bacterial strain possessed also an ability of heterotrophic growth on the glucose, yeast extract and caseine hydrolyzate.

The bacteria are mesophilic, optimum pH 7,0, do not grow in the medium with initial pH below 6,0 and higher 8,8, but during growth reduce pH of the medium till 4,7.

The isolated bacterial strain represents a new subspecies of facultative autotrophic thiobacilli capable of oxidizing thiosulfate.

Факультативно автотрофные бактерии ... окисляющие тиосульфат ... тиобациллы.

Образование и накопление серы в природе связано с деятельностью тионовых бактерий, развивающихся при нейтральных и щелочных реакциях

предназначены способных окислять тиосульфат. Первые представители этой группы были открыты Натансоном, Бейеринком и другими исследователями еще в начале нашего столетия [3]. В настоящее время описано и характеризуется около десятка видов этих бактерий. Среди них облигатные хемолитотрофы *Thiobacillus thioparus* [3], *Thiobacillus neapolitanus* [8], факультативные аэротрофы *Thiobacillus novellus* и *Thiobacillus intermedius*, способные переключаться с автотрофного на гетеротрофный обмен [7,9]. Группу бактерий завершают гетеротрофы, окисляющие тиосульфат только в присутствии органических веществ [5].

Нами из Тандзутского месторождения Армении выделена новая разновидность факультативно автотрофных тионовых бактерий.

Целью настоящей работы являлись характеристика и изучение выделенной нами новой бактерии.

Материал и методы. Накопительные культуры были получены посевом проб отвала руды Тандзутского месторождения на среде Баалсруда [3]. В качестве источника энергии использовали тиосульфат. Чистую культуру получали высевом накопительной культуры на твердую среду того же солевого состава и содержащую 0,7% агарозы в качестве уплотняющего вещества.

Выращивание культуры проводили в конических колбах емкостью 250 мл, наполненных 50 мл среды. Инкубирование вели при 30° на водяном встряхивателе типа 357 с режимом работы 180 об/мин.

При изучении миксотрофии у бактерий в среду Баалсруда с тиосульфатом добавляли органические вещества в концентрации 0,02 %. Гетеротрофный рост бактерии изучался на среде Баалсруда, содержащей 0,1 % органического вещества в качестве единственного источника энергии. Для окраски клеток по Граму применяли метод Уокера. Для выявления спор использовали метод Циля-Ожешко [1], а также прогревание на водяной бане в течение 30 минут.

Количественный анализ тиосульфата проводили иодометрическим методом [4].

Результаты и обсуждение. **Культуральные и морфологические свойства.** При автотрофном росте в жидкой среде с тиосульфатом бактерии образуют пленку из бактериальных клеток и серы. По мере роста жидкость мутнеет и pH среды снижается до 4,7. На плотной среде с тиосульфатом бактерии образуют маленькие колонии диаметром 0,5-1,0 мм, желтые от выпавшей серы. Клетки выделенной бактерии представляют собой палочки размером 0,5-0,8 x 1,0-2,0 мкм. Клетки неподвижные. По Граму окрашиваются отрицательно. Спор не образуют.

Источники энергии и углерода. Выделенные бактерии растут автотрофно на среде, содержащей тиосульфат в качестве единственного источника энергии. Показателем роста при этом служат помутнение среды, образование пленки серы на поверхности жидкости и снижение pH среды. Рост бактерии способен поддерживать также органические вещества, такие как глюкоза, дрожжевой экстракт и гидролизат казеина (табл. 1).

Таблица 1. Рост культуры шт.1 в гетеротрофных условиях (время культивирования-42ч. содержание органических веществ-0,1%; начальный pH-7,9; 30°)

Наличие бактерий	Использованные органические вещества	Оптическая плотность	Конечный pH
Контроль без бактерий	глюкоза	-	7,85
Шт.1	глюкоза	0,30	7,30
Контроль без бактерий	дрожжевой экстракт	-	7,9
Шт.1	дрожжевой экстракт	0,35	7,85
Контроль без бактерий	гидролизат казеина		7,3
Шт.1	гидролизат казеина	0,32	7,7

Окисление бактериями тиосульфата стимулируется органическими веществами. Так, окисление тиосульфата ускоряется примерно в 3,0; 2,3 и 1,8 раза соответственно в присутствии в среде глюкозы, дрожжевого экстракта и гидролизата казеина в концентрации 0,02 % (табл. 2).

Таблица 2. Влияние органических веществ на окисление тиосульфата шт.1 (время культивирования- 45ч; начальный pH - 8,0; 30°)

Наличие бактерий	Использованные органические вещества	Окислено S ₂ O ₂ 3 г/л	Конечный pH
Контроль без бактерий	-	0	7,95
Шт.1	-	0,40	5,8
Контроль без бактерий	глюкоза	0	
Шт.1	глюкоза	0,17	8,45
Контроль без бактерий	дрожжевой экстракт	0	8,0
Шт.1	дрожжевой экстракт	0,90	8,55
Контроль без бактерий	гидролизат казеина	0	7,8
Шт.1	гидролизат казеина	0,75	8,4

Отношение к температуре и pH. Бактерии мезофильны. Рост при 28° наблюдается в диапазоне pH 6,2-8,5. Оптимальное значение pH -7,0. При начальном значении pH среды ниже 6,0 и выше 8,8 рост бактерии отсутствует (табл. 3). Незначительное уменьшение количества тиосульфата при pH 5,4 и 5,75, вероятно, связано с его

химическим окислением в кислых условиях, так как роста бактерий при этом не наблюдается.

Отношение к кислороду. При автотрофном и миксотрофном росте на среде с тиосульфатом бактерии положительно реагируют на аэрацию. Это связано как с потребностью организма в O_2 , так и CO_2 . В гетеротрофных условиях относительно хорошо растут и без аэрации.

По основным физиологическим свойствам выделенная бактерия проявляет сходство с известными облигатно хемолитотрофными, факультативно автотрофными и гетеротрофными тионовыми бактериями, развивающимися в нейтральных и щелочных условиях [5]. Однако отличается от них по тем и или иным признакам.

Таблица 3. Окисление тиосульфата шт. 1 при разных начальных значениях pH среды культивирования-43ч. содержание $S_2O_3^{2-}$ - 2,64 г/л (300°)

Наличие бактерий	Начальный	Окислено $S_2O_3^{2-}$ г/л	Конечный pH
Контроль без бактерий	5,4	0,16	5,05
Шт. 1	5,4	0,12	5,05
Контроль без бактерий	5,75	0,4	5,4
Шт. 1	5,75	0,14	5,4
Контроль без бактерий	6,25	0	6,25
Шт. 1	6,25	0,21	4,8
Контроль без бактерий	6,5	0	6,5
Шт. 1	6,5	0,30	4,7
Контроль без бактерий	6,95	0	6,95
Шт. 1	6,95	0,72	4,7
Контроль без бактерий	7,7	0	7,7
Шт. 1	7,7	0,66	6,9
Контроль без бактерий	8,5	0	8,4
Шт. 1	8,5	0,25	6,4
Контроль без бактерий	8,8	0	8,6
Шт. 1	8,8	0	8,6
Контроль без бактерий	9,2	0	9,0
Шт. 1	9,2	0	9,0

Так, в отличие от облигатно хемолитотрофной бактерии *T. thioaratus* выделенная бактерия способна к хемосорганотрофному росту на глюкозе, дрожжевом экстракте и гидролизате казеина. Кроме того, оптимум pH у выделенной бактерии 7,0, тогда как у *T. thioaratus* он составляет 8,5-9,8. Отмечено также четкое морфологическое отличие выделенной бактерии от *T. thioaratus*. У другой облигатно хемолитотрофной бактерии *T. neorodanensis* продуктом

окисления тиосульфата являются тетратионат и полиотионаты, а не сера.

В отличие от гетеротрофных бактерий *Thiobacillus parmetabolis* [6] и *Thiobacillus delicatus* [5] потребность выделенной бактерии в органическом веществе необлигатная. Бактерии могут развиваться автотрофно на тиосульфате, однако оптимальными для роста являются миксотрофные условия.

В этом отношении бактерия более близка к факультативно автотрофным организмам *T. novellus*, *T. intermedius* и *Thiobacillus versutus* (*Thiobacillus* A2). Однако *T. novellus* не способна уславивать сахара. Что касается бактерии *T. intermedius*, то она отличается более выраженной кислотоустойчивостью. Оптимальное значение pH у *T. intermedius* составляет 4,0, пределы pH 1,9-7,0 [5]. Бактерии *T. versutus* проявляют способность к росту в анаэробных условиях на среде с KNO₃ и органическими соединениями.

Таким образом, несмотря на некоторое морфологическое и физиологическое различие, выделенная бактерия более близка к факультативно автотрофным тионовым бактериям. Предполагается, что она представляет собой новый подвид факультативно автотрофных тионовых бактерий, развивающихся в нейтральной или щелочной среде и окисляющих тиосульфат. Однако для определения точного таксономического положения выделенной бактерии необходимо исследовать ряд систематически важных биохимических и генетических признаков.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороца) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии. I, 66. М., 1983.
2. Захаркин Г.А. Питотрофные микроорганизмы. 122. М., 1972.
3. Караванко Г.П., Кузнецов С.И., Големин А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд. М., 1972.
4. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., 1970.
5. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Eds. Staley J.T., Bryant M.P., Pfennig N., Holt J.G. 3. 1842, 1989.
6. London J., Rittenberg S.C. Arch. Microbiol., 59. 219, 1957.
7. Lu W.P. FEMS Microbiol. Lett., 34,3,313-317, 1985.
8. Trydinger P.A., Meyer T.E., Bartsch R.C., Kamen M.D. Arch. Microbiol., 141. 4, 273-278. 1985.
9. Wood A.P., Kelly D.P. J. Gen. Microbiol., 125, 1, 55-62, 1981.

Поступила 11.X.1994.

ВЫЩЕПАЧИВАНИЕ МЕТАЛЛОВ МЕЗОФИЛЬНЫМИ И ТЕРМОФИЛЬНЫМИ ХЕМОЛИТОТРОФНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

Н.С.ВАРТАНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Проведено сравнительное изучение активности мезофильных и термофильных серо- и железooksисляющих хемолитотрофных бактерий в окислении пирита и отвала руды Шамлугского месторождения. Установлено преимущество термофильных бактерий в извлечении металлов даже при ведении процесса выщелачивания в мезофильных условиях.

Применение ассоциаций разных видов хемолитотрофных бактерий в процессах выщелачивания показало, что эффективность "универсальных" серо- и железooksисляющих бактерий в извлечении металлов значительно повышается при их совместном выращивании со специализированными сероooksисляющими бактериями.

Կոմպարիվ է պիրիտի և Շամլուղի հանքավայրի հանքաքարային քանոնի առարկության բերական մեզոֆիլ և թերմոֆիլ բակտերիաների օկսիդացումը համեմատական ուսումնասիրություն: Պարզվել է, թերմոֆիլ բակտերիաների առավելությունը մետաղների կորզման գործում նույնիսկ տաքավայրային պրոցեսը մեզոֆիլ պայմաններում վարելու: Քեմոլիտոտրոֆ բակտերիաների տարբեր տեսակների համակոորդյունների կիրառումը տաքավայրային պրոցեսում ցույց է տվել, որ ծծումբ և երկաթ օքսիդացնող ունիֆերտ բակտերիաների արդյունավետությունը մետաղների կորզման պրոցեսում զգալիորեն բարձրանում է ծծումբ օքսիդացնող մանուկոկոպիլում բակտերիաների հետ եւստանդ: Դժգոհումը սխալմաներում:

Comparative activities of mesophilic and thermophilic bacteria in leaching of pyrite and Shamlugh dump ores in Armenia have been studied. The superiority of thermophilic bacteria in metal recovery even when leaching process is carried out at the mesophilic conditions has been established. The efficiency of universal sulfur and iron oxidizing bacteria was considerably increased in the combination with sulfur oxidizing bacteria.

Хемолитотрофные бактерии-выщелачивание металлов.

В практике бактериального выщелачивания металлов из руд и отвалов в основном используются "универсальные" серо- и железooksисляющие бактерии *Thiobacillus ferrooxidans* [1]. Однако микрофлора сульфидных месторождений Армении представлена широким разнообразием хемолитотрофных бактерий. Среди них впервые описанные в Армении бактерии *Leptospirillum ferrooxidans*,

способные окислять только закисное железо [4], и *Thiobacillus organopagus*, участвующие в окислении восстановленных соединений серы [5].

Исследованиями ряда авторов показана перспективность использования термофильных бактерий в выщелачивании металлов, в частности, в предобработке золотосодержащих руд и концентратов с целью увеличения выхода ценного металла при его получении традиционным методом [7,9]. Нами из сульфидных месторождений республики выделен и описан новый подвид умеренно термофильной бактерии *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, способный окислять закисное железо и элементную серу [3]. Подробная морфофизиологическая характеристика представлена в ряде работ [2].

Настоящая работа посвящена изучению сравнительной активности мезофильных и выделенных нами термофильной серо- и железосооксиляющей бактерий и их ассоциаций в выщелачивании меди и железа.

Материал и методика. Объектом исследования служили выделенные нами следующие виды хемолитотрофных бактерий: *T. ferrooxidans* (шт.4), *L. ferrooxidans* (шт.50), *T. organoparus* (шт.13) и термофильный *S. thermosulfidooxidans* (шт.41). Бактериальному выщелачиванию подвергали минерал железа-пирит (FeS_2) и отвал 4-7 забалансовой руды "Шамлугского месторождения". Опыты по выщелачиванию проводили в колбах Эрленмейера в условиях периодического культивирования бактерий в режиме встряхивания (180 об/мин). В качестве выщелачивающего раствора служили среды: Летена [1] - при использовании мезофильных бактерий; Брайерли [1] - при использовании термофильной бактерии. Биомассу бактерий определяли по белку методом Лоури. Количество ионов железа определяли комплексометрически трилоном Б. Медь определяли колориметрически [6].

Результаты и обсуждение. В табл. I приведены данные сравнительной активности термоацидофильных и мезофильных серо- и железосооксиляющих бактерий в выщелачивании пирита.

Как показывают данные таблицы, окисление пирита ускоряется в 4,8 раза в присутствии *T. ferrooxidans* и 6,3 раза в присутствии *S. thermosulfidooxidans* (шт.41) по сравнению с химическим контролем. Следует отметить, что превосходство термоацидофильной бактерии в выщелачивании железа при окислении пирита наблюдается при температуре 30°C, не являющейся оптимальной для данной культуры

Таблица 1. Выщелачивание железа при окислении пирита мезофильными и термофильными серо- и железсокисляющими бактериями; (время культивирования -12 дней, т.ж- 1:20, 30°)

Использованные штаммы бактерий	pH начальный/ конечный	Количество выщелачен- ного Fe, мг/л	Биомасса, балок г/л
Контроль без бактерий	1,9/1,9	532±0	-
<i>T ferrooxidans</i> , шт 4	1,9/1,5	2576±21	0,048
<i>L ferrooxidans</i> , шт 50	1,9/2,0	532±14	0
<i>S thermosulfidooxidans</i> subp. asporogenes, шт 41	1,9/1,4	3360±13	0,089

Никакой активности в окислении пирита не проявляют бактерии *L.ferrooxidans*, способные окислять Fe^{2+} .

О высокой окислительной активности термоацидофильной бактерии свидетельствуют также данные об изменении pH среды и увеличении биомассы бактерий (табл. 1).

Выщелачивание отвала руды Шамлугского медно-колчеданного месторождения (Алаверди) проводилось в условиях периодического культивирования бактерий. Результаты опытов представлены в табл.2.

Таблица 2. Выщелачивание отвала руды Шамлугского месторождения чистыми культурами хемолитотрофных бактерий и их ассоциациями (время культивирования- 26 дней, pH 2,4, т.ж-1:5,30°)

Использованные штаммы бактерий	Конечный pH	Выделено мг/л	
		Fe	Cu
Контроль без бактерий	3,0	252±0	50
<i>T.ferrooxidans</i> , шт 4	1,8	2016±14	120
<i>L.ferrooxidans</i> , шт.50	2,85	532±14	60
<i>S thermosulfidooxidans</i> subsp. asporogenes шт.41	1,9	1992±21	120
<i>T.organoparus</i> шт.13	3,05	224±0	50
<i>T.ferrooxidans</i> шт.4+			
+ <i>T.organoparus</i> шт.13	1,8	2292±8	135
<i>L.ferrooxidans</i> шт.50+			
+ <i>T.organoparus</i> шт.13	2,9	730±14	70
<i>S Thermosulfidooxidans</i> subsp. asporogenes шт.41+			
+ <i>T.organoparus</i> шт.13	2,5	2346±13	130

Как показывают данные табл.2, по активности выделения железа и меди при выщелачивании отвала руды термоацидофильные бактерии не уступают *T.ferrooxidans*, ускоряя процесс примерно в 8 раз. В присутствии *L.ferrooxidans* выделение железа увеличивалось

всего в 2,1 раз. Никакого ускорения процесса окисления руды не наблюдалось при использовании сероокисляющей бактерии *T. organoparus*. Однако при совместном выращивании *T. organoparus* с культурами *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* и *S. thermosulfidoxidans* наблюдалось значительное увеличение скорости окисления Fe^{2+} по сравнению с монокультурами. Так, выделение железа при окислении руды ускорилось в 9,1; 2,9 и 9,3 раза в ассоциации *T. organoparus* соответственно с *T. ferrooxidans*, *L. ferrooxidans* и *S. thermosulfidoxidans*.

Ускорение процесса окисления руды ассоциацией ускоренно культивируемой бактерии *L. ferrooxidans* и сероокисляющей бактерии *T. organoparus* можно объяснить получением эффекта "универсальной" бактерии при их совместном выращивании. Что касается положительного эффекта ассоциации *T. organoparus* с "универсальными" бактериями, то это может быть связано с другой проблемой.

Известно, что сульфидоокисляющая способность хемолитотрофных бактерий складывается из собственно сульфидоокисляющей активности, а также серо- и железобактериальной активности [8]. Предполагается, что Fe^{2+} является предпочтительным субстратом для "универсальных" бактерий *T. ferrooxidans* и *S. thermosulfidoxidans*. Поскольку в выщелачивающих растворах всегда имеется достаточное его количество, то сероокисляющая активность этих бактерий зачастую подавляется или очень слабо выражается. Поэтому внесение сероокисляющей бактерии в выщелачивающую систему приводит к дополнительному образованию серной кислоты, что в свою очередь способствует ускорению окисления сульфидных минералов.

Таким образом, термоацидофильные бактерии *S. thermosulfidoxidans* превосходят *T. ferrooxidans* как в окислении сульфидных минералов, так и сульфидных руд. Внесение в выщелачивающую систему сероокисляющей бактерии приводит к значительной интенсификации процесса окисления как при участии *T. ferrooxidans*, так и *S. thermosulfidoxidans*.

Выполнение данной работы частично обеспечивалось грантами МНФ (Сороса) RY 1000 и Ассоциаций ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1 Биотехнология металлов. Под ред. Караадыко Г.И. и Грудева С.Н. М. Центр международных проектов ГКНТ, 1985.

2. Вартанян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Микробиология, 59, 3, 411-417, 1990.
3. Вартанян Н.С., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Пысенко А.М., Каравайко Г.И. Микробиология, 57, 2, 268-274, 1988.
4. Маркосян Г.Е. Биолог. журн. Армении, 25, 2, 26-29, 1972.
5. Маркосян Г.Е. Докл. АН СССР, 211, 5, 1205-1208, 1973.
6. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод М., 1970.
7. Balluff J., Ewart D.K., Hushes M.H., Poole R.K. J. Inorg. Biochem., 43, 2-3, 484, 1991.
8. Espejo R.T., Escobar B., Jedlicki E., Uribe P., Ohlbaum R.B. Appl. Envir. Microbiol., 54, 7, 164-169, 1988.
9. Hutchins S.R., Brierley J.A., Brierley C.L. Mining Eng. USA, 40, 4, 249-254, 1988.

Поступила 11.X.1994

Биолог. журн. Армении, 1 (48), 1995

УДК 576. 851. 5

ОБ ЭКОЛОГИИ ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ФОРМ БАЦИЛЛ В ОСНОВНЫХ ТИПАХ ПОЧВ АРМЕНИИ

А.А. ХАЧАТУРЯН, Н.Л. КАЗАНЧЯН, Н.С. ХАЧАТУРЯН, М.О. АДАМЯН, Л.А.
ХАЧИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510 г. Абовян

Установлено, что факультативно термофильные и алкалофильные формы бацилл распространены в разной степени во всех основных типах почв Армении. облигатные термофилы вида *Bacillus stearothermophilus* встречаются в черноземных, горно-каштановых, лугово-бурых орошаемых почвах и в мелиорированных солончаках. облигатно алкалофильные штаммы бацилл - *B. alcalophilus* и *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* обнаруживаются в каштановых, бурых и особенно в солончаковых почвах. Термо-ацидофильные штаммы выделяются из лесных почв и черноземов. Галофилы определяются в карбонатных черноземах, бурых и солончаковых почвах.

Հաստատված է, որ Հայաստանի բոլոր հիմնական հողատիպերում բացիլների ֆակուլտատիվ ջերմասեր և հիմնասեր ձևերը տարածված են տարբեր քանակությամբ: Օբլիգատ ջերմասեր *Bacillus stearothermophilus* տեսակի բացիլները հանդիպում են սևահողերում, միլիտրացված աղուտ-ալկալի հողերում: Օբլիգատ հիմնասեր *B. alcalophilus* և *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* տեսակների շտամները հայտնաբերվում են շագանակագույն, գորշ և, հատկապես, աղուտ-ալկալի հողերում:

Ջերմաթրոփիլները բացիլների շտամները մեկատեսցվում են անտառային և շագանակագույն հողերից:

Աղասեր բացիլները սրբվում են կարբոնատային սևահողերում, գորշ և աղուտ-ալկալի հողերում:

The distribution of various quantity of facultative thermophilic and alkalophilic forms of bacilli in all main types of soils of Armenia was revealed. The obligative thermophiles of species *Bacillus stearothermophilus* appeared in the chernozems, mountain-chestnut, meadow-brown irrigated and in meliorated salted soils. The obligative alkalophilic strains of bacilli *B. alcalophilus* and *B. alcalophilus "subsp. halodurans"* are found in chestnut, brown and especially in salted soils. The thermoeidophilic strains are distinguished in forest soils and chernozems. The halophiles are determined in carbonate chernozems, brown and salted soils.

Почвы - микрофлора, - бациллы - алкалофилы - термофилы - термо-
ацидофилы - галофилы.

Своеобразные особенности метаболизма экстремофильных микроорганизмов и способность противостоять экстремальным воздействиям могут быть использованы в производстве. Амилолитические, протеолитические и другие ценные ферменты этих микробов широко исследуются и находят свое применение в микробиологической промышленности [3, 4, 20]. Установлена приуроченность экстремофильных форм микроорганизмов к разнообразным естественным местам обитания с особыми условиями окружающей среды [1, 6, 7, 17].

Из специфических субстратов выделены и изучены штаммы бацилл, диагностированные как *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. macerans*, *B. laterosporus*, *B. brevis*, *B. sphaericus*, способные расти в диапазоне температур от 35° до 75°, и истинно термофильный вид *B. stearothermophilus* с температурным оптимумом роста 50-65° и максимумом 75° [1, 4, 7]. Среди бацилл обнаружено несколько организмов, устойчивых к щелочной и кислой средам с pH, приближающимся к 10 или к 3,5 - 4,0 [7, 14, 18]. Выделены и изучены штаммы *B. cereus* и *B. circulans*, устойчивые к щелочным условиям [4]. Из горячих и кислых горячих источников выделена гетеротрофная бактерия *B. acidocaldarius* с оптимумом pH среды роста от 2 до 6 и температурой от 45° до 75°. Выявлены штаммы *B. coagulans*, которые имеют оптимум pH среды роста от 3 до 4 и температурный оптимум 37-60° [14]. Известно, что бациллярные штаммы либо галотолерантны, то есть выдерживают присутствие высоких концентраций солей, либо умеренные галофилы, хорошо растущие в средах, содержащих 0,5 - 2,5 М хлористого натрия [1, 19].

В почвах Армении изучено лишь распространение алкалофилов и термофилов в солончаках [3, 6]. Между тем большое разнообразие эколого-географических условий Армении с ее выраженной вертикальной зональностью [5, 8] и значительная бациллярная заселенность разных почв [2, 9, 10] могут служить основой для экологических исследований в направлении изучения почв как мест обитания экстремофильных бацилл и источников выделения этих организмов.

Материал и методика. Выделение штаммов экстремофильных форм бацилл осуществляли методами накопительных культур и прямого высева разведения навески образца на питательные среды. Образцы почв брали с глубины 0-25 см. Условия культивирования и среды соответствовали требованиям выделяемой экстремофильной формы бацилл - для термофилов использовали пептон-крахмально-кукурузно-дрожжевую среду (рН 7.0-7.2), культивирование проводили при 56-60° в течение 24-48 ч. для алкалофилов использовали питательную среду Хорикоши [7] с рН среды 9-10,0 и с выращиванием при 30-37° в течение двух-пяти суток; для термо-ацидофилов применяли среду Брока [15] с инкубацией при 56-60° в течение 24-48 ч. Мезофильные и термоустойчивые бациллы выделяли на мясо-пептонном агаре (МПА) и МПА с сусло (1:1). Монокультуры сохраняли на специфических для каждой формы питательных средах.

Тестирование признаков для диагностики культур осуществляли согласно методам [15] с корректировкой условий в зависимости от потребностей изучаемой экстремофильной формы бацилл. Штаммы идентифицировали до вида с помощью диагностических ключей определителя Берге [12] и с учетом характеристик этих бактерий в первоисточниках [7, 13, 14, 17].

Результаты и обсуждение. Поскольку в специальных работах детали о описаны все эколого-географические зоны и типы почв Армении [5, 7], считаем возможным непосредственно перейти к характеристике бациллярной микрофлоры изученных нами основных типов почв.

В результате проведенных работ из анализируемых почвенных образцов выделены экстремофильные формы аэробных спорообразующих бактерий, относящихся к термофилам (255 штаммов), термо-ацидофилам (25 штаммов), алкалофилам (235 штаммов) и галофилам (37 штаммов). Штаммы тестированы, идентифицированы до вида и включены в коллекцию культур микробов Института микробиологии НАН РА (ИНМИА). Кроме того, для сопоставления численности и видового состава во всех образцах определены также мезофильные бациллы.

В таблице обобщены средние показатели количества разных форм бацилл, изолированных из почвенных образцов.

Микрофлора горно-луговых и черноземовидных почв довольно скудная, отличается средней активностью [9]. Как видно из табл., мезофильные бациллы определяются в пределах до 12,8-14,7 млн/г почвы. На этом фоне термофильные и алкалофильные формы бацилл (факультативы) выделяются также в небольшом количестве: от 0,2 до 1,2 тыс/г почвы - термофилы и от 0,5 до 12,4 тыс/г почвы - алкалофилы. На жизнедеятельность микроорганизмов в этих почвах неблагоприятно влияют холодный климат, реакция среды почвы и солнечные лучи.

В видовом отношении в этих почвах вместе с мезофильными видами *B. pumilus* и *B. circulans* определяются штаммы видов *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. mycoides* и *B. circulans* со сравнительно более высокими температурными пределами роста (+30° - +60°-факультативы) и штаммы видов *B. megaterium* и *B. cereus* - с алкалофильными признаками (рН роста 9,0).

Таблица. Распространение экстремофильных форм бацилл в основных типах почв Армении.

Типы почв	Число образцов	рН	М-бациллы, млн/г почвы	Экстремофилы тыс/г почвы			
				Т*	АК	ГФ	Т-АЦ
Горно-луговые	15	5,5-5,5	12,8	0,2	5,0	0	0
Черноземовидные	7	6,5-7,0	14,7	1,2	12,4	0	0
Горно-лесные							
бурые	12	5,6	15,7	16,2	3,4	0	0
коричневые	20	6,6	22,0	20,3	23,5	0	0,4
Черноземы							
выщелоченные	7	5,3	34,4	11,2	22,0	0	0
целина	8	5,8	31,2	11,8	26,0	0	0,2
Типичные							
целина	11	6,0	27,6	21,2	44,0	0	0
пашня	14	6,2	23,9	20,2	43,0	0,2	0
Карбонатные							
целина	10	6,9	24,5	12,5	54,0	4,0	0
пашни	18	8,0	23,6	13,3	60,0	10,0	0
Каштановые							
целина	10	7,5	15,0	16,0	10,0	0	0
пашни	20	7,5	18,4	20,0	24,5	0,4	0
Бурые, целина	6	7,2	2,8	12,0	20,3	2,0	0
пашня	6	7,5	4,7	14,0	33,0	4,4	0,2
Лугово-бурые							
орошаемые	10	8,2-9,0	15,8	14,0	30,0	37,0	0
Солонцы-солончаки							
целина	21	8,6-10,1	1,0	0,4	100	5,2	0
мелиорированные	25	7,8	6,4	0,8	100	10,0	0

*Условные обозначения: М-мезофилы, Т-термофилы, АК-алкалофилы, ГФ-галофилы, Т-АЦ-термо-ацидофилы.

Численность мезофильных бацилл в лесных бурых почвах горной лесной зоны Армении доходит до 15,7 млн/г почвы, количество термофилов и алкалофилов равно 16,2 и 3,4 тыс/г почвы соответственно.

Горные коричневые лесные почвы характеризуются гумусированностью в верхних горизонтах. Эти почвы обладают высокой биологической активностью [10, 11]. В них число аэробных

бацилл доходит до 22,0 млн/г почвы. Количество экстремофильных бацилл также сравнительно высоко: термофилов - 20, алкалофилов - 23,5 тыс/г почвы.

Выделенные из горно-лесных бурых и коричневых почв бациллы диагностированы как *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. circulans* и "*B. agglomeratus*". Факультативно термофильные формы из этих почв отнесены к *B. licheniformis* и *B. circulans*, а алкалофильные - к *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium* и *B. circulans*.

Черноземы Армении представлены выщелоченными, типичными и карбонатными подтипами. Исследования почвенных образцов черноземов для выявления экстремофильных форм бацилл показали, что на фоне высокого содержания мезофильных бацилл, что объясняется большим количеством органических веществ, эти почвы населены также термофильными и алкалофильными штаммами. При этом последних значительно больше в карбонатных черноземах. Аналогичная картина наблюдается в горно-каштановых и бурых (особенно орошаемых) почвах.

В черноземных почвах наряду с мезофильными видами *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. polymyxa* встречаются и алкалофильные формы этих же бацилл. Там же обнаруживается наличие штаммов облигатно-термофильного вида *B. stearothermophilus* и вида *B. circulans* с высокими температурными пределами роста (37-65°).

Горно-каштановые почвы, содержащие довольно большое количество органического вещества (до 15-18% гумуса), являются источником получения разных форм экстремофильных бацилл. Из образцов этого типа почв выделяются штаммы термофильного вида *B. stearothermophilus* и алкалофила - *B. alcalophilus* "subsp. *halodurans*".

В бурых и лугово-бурых орошаемых почвах наравне с мезофильными *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, "*B. idosus*" и *Bacillus* sp. ("*mesentericus*") определяются факультативные термофилы вида *B. licheniformis* и алкалофилы видов *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. megaterium*, а также облигатный алкалофил вида *B. alcalophilus*.

Солончаковые почвы Армении отличаются очень низкой биологической активностью, что обусловлено высоким содержанием солей и щелочной реакцией среды. В этих условиях среди мезофилов преобладают термостабильные, преимущественно черных и бурых цветов бациллярные формы ("*B. mesentericus*"). Их численность в

мелиорированных солончаках равна 6,4 млн/г почвы. Число алкалофильных бацилл как в содовых, так и в мелиорированных солончаках достигает 100,0 тыс/г почвы. Число термофилов в этих почвах невелико (0,4-0,8 тыс/г почвы).

Солончаковые почвы богаты облигатными алкалофильными формами бацилл видов *B. alcalophilus* и *B. alcalophilus "subsp. halodurans"*. А мелиорированные почвы, обогащенные органическими веществами и расположенные в Араратской равнине с жарким климатом, являются источником специфического облигатно термофильного вида *B. stearothermophilus*, там же нередко обнаруживаются облигатно термофильные штаммы вида *B. circulans*.

Галофильные штаммы бацилл, требующие для своего роста до 15-17 % NaCl в среде, также выявляются в солончаковых, бурых и каштановых почвах. По своим свойствам они приближаются к видам *B. sphaericus* и *B. fastidiosus*, однако для уточнения диагноза нуждаются в дальнейшем исследовании.

Термо-ацидофильные бациллы встречаются, но в небольшом количестве в лесных коричневых, выщелоченных черноземах и бурых почвах в условиях кислых или нейтральных pH почв. Изолируемые из этих почв термо-ацидофильные штаммы сходны по своим свойствам с видом *B. acidocaldarius*.

Таким образом, результаты исследований позволяют заключить, что факультативные термофильные и алкалофильные штаммы бацилл распространены в разной степени во всех изученных типах почв Армении. Облигатные термофилы определяются в черноземах, горно-каштановых лугово-бурых оршаемых и мелиорированных солончаках. Наиболее богатым источником алкалофильных и галофильных штаммов бацилл могут служить солончаковые почвы, как целинные, так и мелиорированные. В количественном отношении термофилов выделяется меньше, чем алкалофилов, что, вероятно, можно объяснить резко континентальным климатом Армении.

Одни и те же таксономические единицы могут проявлять различное отношение к температурам роста и pH среды.

Работа финансировалась грантами ЮНЕСКО (Сороса) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.



Авторы выражают искреннюю благодарность К.В. Читчан за активное участие в выделении штаммов из почвенных образцов и их тестировании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Археобактерии. Сборник научных трудов. Пушино, 163, 1968
2. Африкян Э.К. Тр. Сектора микробиол. АН Арм. ССР, 21-35, 1953
3. Биология термофильных микроорганизмов, 271, М., 1986
4. Квиннер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях, 520, М., 1981
5. Клопотовский Б.А. Изв. АН Арм. ССР, 7, 3-28, 1947
6. Кузнецова Е.И., Акопян Л.О., Африкян Э.Г. Биолог. журн. Армении, 29, 7, 89-90, 1976.
7. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.А. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах, 285, М., 1966
8. Почвы Армянской ССР (Краткая характеристика). Ереван, 383, 1976
9. Хачикян Л.А., Авунджян Э.С., Галстян А.Ш., Оганесян Н.А. Тр. НИИ почвоведения и агрохимии МСХ Арм. ССР, 143-150, 1974
10. Хачикян Л.А. Изв. с-х наук МСХ Арм. ССР, 4, 65-88, 1984
11. Хачикян Л.А., Саркисян Р.В. Тр. НИИ почвоведения и агрохимии, 21, 137-142, 1986
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2 Eds. Sneath P. H. A. May N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1104-1139, 1986
13. Boyer E. W., Ingle M. B., Mercer G. D. Int. J. Syst. Bacteriol., 23, 3, 238-242, 1973
14. Darland G., Brock T. D. J. Gen. Microbiol., 67, 9-15, 1971
15. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H. W. The Genus *Bacillus*. Agricult. Handbook 1427, Washington D. C., 283, 1973
16. Gould G. W., Cory J. E. L. Microbial growth and survival in extremes of environment. AP, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco, 265, 1980
17. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic microorganisms - a new microbial world. Tokyo, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 213, 1982
18. Rogers H. J., McConnel M., Burden I. D. J. Gen. Microbiol., 61, 155-171, 1970
19. Torsvic T., Dundas J. In: Methods in Enzymology. NY-L. AP, 88, 360-362, 1982
20. Zeikus J. G. Enzyme Microb. Technol., 1, 10, 243-252, 1979

Поступила 20.XI 1994

ЦИКОМАЛЬТОДЕКСТРИН ГЛЮКАНОТРАНСФЕРАЗА,
ГАЛОФИЛЬНОГО БАЦИЛЛА

М. О. АДАМЯН, В. А. АБЕЛЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Впервые обнаружена ВВВцикомальтодекстрин глюканотрансфераза у галофильного бацилла. Фермент очищен до электрофоретически гомогенного состояния осаждением его на полимере смеси альфа- и бета-циклодекстринов с последующей ионообменной и гель-проникающей хроматографией. Определены оптимальные условия проявления каталитической активности и некоторые биохимические свойства фермента.

Циклодекстринов և մուս ասարին սնգամ հալումարեովել է ցիկլոմալտոդեքստրին գլուկանոտրանսֆերազ ֆերմենտը: Ֆերմենտը մաքրվել է միջև և լեկալոսֆորեստիկ համասեռ վիճակ՝ ալֆա- և բետա- ցիկլոդեքստրինների խառնուրդի պոլիմերի վրա նստեցմամբ և խոն-փոխոսնակային բրամատոգրաֆիայի և գել-ֆրակտացիայի օգնությամբ: Որոշվել են ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվության համար լավագույն պայման-ները, ինչպես նաև որոշ կենսաքիմիական հատկություններ:

Among the halophilic bacilli the cyclomalto-dextrin glucanotransferase (CGTase) was identified in the first time. The enzyme was purified to an electrophoretically homogeneous state using cyclodextrin polymers as affinity supporters followed by chromatography on DEAE-Toyoperl and gel-filtration on Sephadex G-150. Several biochemical and physico-chemical properties of the enzyme obtained have been studied.

Галофильный бацилл - цикломальтодекстрин глюканотрансфераза - циклодекстрины

Цикломальтодекстрин глюканотрансфераза (1,4-альфа-Д-глюкан 4-альфа-Д-(1,4-альфа-Д-глюкано)-трансфераза, циклизирующая, КФ 2.4.1.19, ЦГТ-аза) способна осуществлять по крайней мере три различные реакции: внутримолекулярное и межмалекулярное трансгликозилирование, а также гидролиз крахмала или циклодекстринов (ЦД) [10].

Все известные до настоящего времени продуценты ЦГТ-азы принадлежат к мезофильным, термофильным и алкалофильным бактериям [1-3].

В настоящей работе приведены основные свойства ЦГТ-азы из галофильного бацилла.

Материал и методика. В работе использовали аэробную спорообразующую галофильную бактерию *Bacillus* sp. Г-177 из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении. Культуру выращивали в глубинных условиях при 37° в течение 48 ч на питательной среде следующего состава (г/л): картофельный крахмал-20,0; пептон-10,0;

дрожжевой экстракт-1,0; NaCl-150,0; KCl-2,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ -20,0; цитрат натрия-3,0; pH 7,0-7,2.

Для концентрирования фильтрата культуральной жидкости использовали ультрафильтрационные мембраны на полых волокнах AP-0,2 с фильтрующей способностью 15 кД.

Циклизирующую активность определяли метилоранж-малтотриозным методом [8]. За единицу активности принимали количество фермента, которое продуцировало 1 мкмоль ЦД в мин. Декстранизирующую активность определяли согласно описанному методу [3]. За единицу активности принимали количество фермента, которое за 10 мин в заданных условиях реакции конвертирует 50% крахмала.

Белок определяли по Лоури [7]. Гомогенность фермента проверяли электрофорезом в полиакриламидном геле (ПААГ 7,5%) с Ds-Na [6]. Окрашивание белковой полосы проводили Кумасси бриллиантово-голубым G-250 ("Sigma", США).

Аминокислотный состав ЦГТ-азы определяли на аминокислотном анализаторе ААА 339 фирмы "Mikrotechna" (Чехословакия) после гидролиза препаратов 6N HCl в течение 24ч при 105°.

Приготовление полимеров ЦД проводили согласно описанному методу [4].

Результаты и обсуждение. Для первичной зрфинной очистки ЦГТ-азы использование полимеров из чистых альфа-, бета- или гамма-ЦД не дало достаточно удовлетворительных результатов по специфическому связыванию фермента как в количественном отношении, так и по прочности. ЦГТ-аза десорбировалась простым промыванием теплой водой.

Наилучшие результаты получены с использованием полимера смеси альфа- и бета-ЦД, который отличался высокой связывающей способностью. Прочность и селективность полученных комплексов очень высокие - десорбция ЦГТ-азы не наблюдалась даже при промывании носителя 1M раствором NaCl.

Элюция была возможна только в присутствии альфа- или бета-ЦД. Полученный элюат диализовали против водопроводной воды, концентрировали ультрафильтрацией и пропускали через колонку с ДЭАЭ-тойоперлем 650 M (2x20 см). Элюирование белков проводили линейным градиентом раствора альфа-ЦД (0-10 mM) в 0,01 M фосфатном буфере (pH 7,0). Объединенные активные фракции диализовали против дистиллированной воды и концентрировали. Дальнейшую очистку осуществляли гель-фильтрацией на сефадексе G-150 (2x50 см).

Полученная ЦГТ-аза оказалась гомогенной по данным анализов на Ds-Na-ПААГ и гель-фильтрации на Биогеле Р-150 в присутствии 0,1% Ds-Na.

Результаты очистки суммированы в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика ЦГТ-азы галофильного штамма Г-77 на разных стадиях ее очистки.

Стадии	Общий белок, мг	Общая активность, ед	Выход, %	Специфическая активность, ед/мг белка	Степень очистки
Культуральная жидкость	722	1600	100	2,2	1,0
Адсорбция на поли- мере альфа- и бета-ЦД (1:1)	14,6	1200	75,5	82,0	37,3
Хроматография на ДЗАЗ-топосерле	6,3	860	54,1	136,0	62,0
Гель-фильтрация на Сефадексе G-150	5,1	775	48,7	152,0	69,1

Изученный фермент свою максимальную декстринизирующую активность проявлял в пределах pH 5,9-9,0 с оптимумом при pH 7,0 (табл. 2). Однако при 50° и в течение 1,5ч ЦГТ-аза практически полностью инактивировалась в диапазоне pH 4,5-5,5. Она проявляла высокую стабильность только в узком интервале pH, 6,5-7,5.

Таблица 2. Влияние pH на активность ЦГТ-азы галофильного бацилла (смесь 2% крахмала и фермента (10:1) в 0,01М буферном растворе инкубировали при 50° в течение 5 мин)

pH	Активность, % от максимальной
5,95	98,6
6,85	100
7,95	97,2
8,25	97
8,55	90,6
8,8	82,9
9,25	79,8

В зависимости от температуры активность фермента существенно не менялась - она практически одинакова в пределах температур 45-75° с оптимумом при 60-62° (табл. 3). ЦГТ-аза

достаточно стабильна при температурах до 55° однако при более высоких температурах происходит ее резкая инактивация.

В отличие от большинства известных ЦГТ-аз, стабильность которых в значительной степени зависит от присутствия ионов Ca^{+2} и ингибируется ионами железа, меди или бария [3, 5, 9], на данный фермент стабилизирующее влияние оказывают ионы Fe^{+3} , Co^{+2} , Ba^{+2} , а ингибирующее - Zn^{+2} .

Таблица 3. Влияние температуры на активность ЦГТ-азы галофильного бацилла (смесь 1 мл 2% крахмала (рН 7,0) и 0,1 мл ферментного раствора инкубировали при различных температурах в течение 10 мин).

Температура, °С	Активность от максимальной, %
41	87,6
46	93,2
51	96
56	98
62	100
66	99,3
70	99,1
76	96,3

Ионы Mn^{+2} , Mg^{+2} и Ca^{+2} практически не проявляют никакого эффекта (табл. 4).

Изучения аминокислотного состава ЦГТ-аз из галобацилла в целом не выявило каких-либо существенных отклонений от таковых, идентифицированных для ферментов из мезофильных, алкалофильных и термофильных бацилл [1], за исключением высокого содержания цистеина.

Определение K_m и V_{max} дало следующие результаты: $2,5 \pm 0,03$ мг/мл и $0,66 \pm 0,01$ мг/мин по крахмалу.

Очищенная ЦГТ-аза из 10% крахмала образовала бета-ЦД с выходом 27%, а в присутствии 5% толуола или 1% трихлорэтилена - 52%.

Изложенные данные выявляют ряд характерных свойств ЦГТ-азы, продуцируемой галофильным штаммом спорообразующих бактерий.

Таблица 4. Влияние различных ионов металлов на активность ЦГТ-азы (фермент диализовали против дистиллированной воды в течение 24 ч и инкубировали в водном растворе ионов, pH 7.0, при 500 30 мин)

Добавки	Концентрация, мМ	Остаточная активность, %
Без добавки	-	100
MnCl ₂	1,0	100,8
CaCl ₂	1,0	101,6
MgCl ₂	1,0	101,8
ZnCl ₂	1,0	67,8
FeCl ₃	0,5	102,8
CuCl ₂	0,5	98,9
CoCl ₂	0,5	102,4
BaCl ₂	0,5	102,3

Наиболее отличительной особенностью ее является высокая продуктивность бета-ЦД. С другой стороны, факт образования ЦГТ-азы галофильными бациллами имеет теоретическое значение и расширяет области поиска этих ферментов.

Авторы выражают признательность сотрудникам Института микробиологии НАН Армении Балаяну А.М. и Арутюнян А.Е. за содействие при выполнении данной работы.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНО (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян А.В., Авакян З.Г., Мелкумян А.Г., Балаян А.М., Узунян Л.В., Гаспарян А.В. Биохимия, 57, 430-437, 1992.
2. Абелян А.В., Балаян А.М., Авакян З.Г., Манукян Л.С., Узунян Л.В. Биохимия, 57, 438-443, 1992.
3. Абелян А.В., Гаспарян А.В., Авакян З.Г., Африкян Э.Г. Биохимия, 56, 578-582, 1991.
4. Абелян А.В., Ямамото Т., Африкян Э.Г. Биохимия, 59, 778-781, 1994.
5. Bovatto L. J., Backer D. P., Villetto J. R., Sicard P. J., Bonadomi S. J. Biotechnol and Appl Biochem., 15, 48-58, 1992.
6. Leammy V. K. Nature, 227, 680-685, 1970.
7. Lowry O. H., Rosenbrough N. G., Farr F. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
8. Makela M. J., Korpela T. K. Biochem Biophys. Methods, 15, 307-318, 1988.
9. Saborio J. G., Park Y. K. Rev. Microbiol., 23, 129-132, 1992.
10. Ertl J. Cyclodextrins and their inclusion complexes. 296, Budapest, 1982.

Поступила 21. X 1994

ПРИМЕНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВ В ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ АНАЛИЗАХ

Р.А.КИРАКОЗОВА

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Проведена сравнительная оценка разделительной способности сорбентов для газожидкостной хроматографии, содержащих производные бета-циклодекстрина в качестве неподвижной жидкой фазы. Отмечено повышение эффективности и селективности колонки при использовании ее для разделения различных органических соединений.

Ուսումնասիրվել են սուրբեր կրողների բաժանիչ ունակությունը գազ-հեղուկային քրոմատոգրաֆիայի սխեմաներում, որտեղ գաղես անշարժ հեղուկային ֆազու փաթուհակում են բետա-ցիկլոդեքստրին (բետա-Դ): Օլյգ 1 արված, որ բետա-Դ-ի օգտագործման շնորհիվ րաբարանում 1 բաժանիչ խողովակների արդյունավետությունը և սկիզբիվությունը սուրբեր օրգանական նյութերի հայտնաբերման համար:

The comparative study of the various beta-cyclodextrins, containing carriers for the gas-liquid chromatographic separation of the several organic compounds has been developend. The efficiency and selectivity of the carriers have been increased due to the cyclodextrin using.

Циклодекстрины - газожидкостная хроматография.

Уникальная способность циклодекстринов (ЦД) образовывать инклюзионные комплексы может быть успешно применена для хроматографического разделения различных органических соединений в том числе и рацемических смесей [5]. При этом их можно использовать также для исследования продуктов асимметрического синтеза и биотрансформации, а также стереоспецифических ферментативных реакций методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ). Считается, что для решения этой задачи определенную роль могут сыграть как свободные ЦД, так и их некоторые производные, используемые в качестве неподвижной жидкой фазы [4].

В данной статье приводятся результаты изучения разрезляющих свойств некоторых производных бета-ЦД при их применении в качестве жидкой фазы в условиях ГЖХ.

Материал и методика Бета-ЦД был получен в лаборатории биотрансформации нашего института. Синтез гептакис (2,6-ди-О-гептил-;бутил-;гексил)-бета-циклодекстрина осуществлен согласно описанному методу [3].

Метилловые эфиры аминокислот приготовлены по модифицированному методу [1].

В качестве носителя использовался Chromaton N-AW-HMDS с нанесенной на него жидкой фазой состава 5% OV-17 с различным содержанием производных бета-ЦД. Носитель контрольной колонки содержал только 5% OV-17.

Анализ проводился на хроматографе серии "ЦБЕТ-100". В работе использовались: ацетон и бензол хроматографической чистоты и реактивы отечественного производства марки "хч" и "чдк".

Результаты и обсуждение. Среди синтезированных производных бета-ЦД предварительный анализ позволил выбрать гептакис-(2,6-ди-О-гептил)-бета-ЦД, который в дальнейшем был использован для разделения и идентификации различных углеводов, спиртов, альдегидов, некоторых ароматических соединений, а также эфирных масел и метиловых эфиров аминокислот.

Анализ углеводов показал что они удерживаются слабее на носителе, содержащем производное ЦД, чем на контрольном сорбенте. Несмотря на это, введением в состав носителя ЦД удастся произвести более тонкий анализ использованных соединений. Так, число сопутствующих веществ идентифицированных в углеводородах от ундекана до пентадекана, несколько больше, чем в контрольном эксперименте. С другой стороны, эта закономерность не наблюдается в случае с циклогексаном и деканом (табл.1)

В случае с алифатическими спиртами от C₁ до C₈, а также этил-ацетатом, ацетоном, бутилацетатом, толуолом, ксилолом, бензолом никаких существенных отклонений не было отмечено. В то же время колонка с производным ЦД позволила обнаружить в бромгептане, кроме основного вещества, 6 сопутствующих соединений, а колонка с контрольной жидкой фазой - всего лишь 2 примеси.

Анализ метиловых эфиров аминокислот показал, что аминокислоты с ароматическими циклами сильнее удерживаются на колонке с бета-ЦД, в то время как удерживание остальных изученных веществ на обеих колонках остается неизменным. Ни в том, ни в другом случае не удалось обнаружить каких-либо примесей в эфирах аминокислот (табл.2)

тивенности колески с производным бета-ЦД по сравнению с контрольной в отношении структурных изомеров лейцина (табл.2)

Таблица 1 Разделение различных углеводов с применением 2,6-ди-О-гептил-бета-ЦД в условиях ГЖХ (пламенно-ионизационный детектор, газ-носитель гелий, расход 30 мл/мин, температура колонок 160° температура испарителя 210°)

Соединение	Время удерживания, С		Число сопутствующих пиков	
	с бета-ЦД	контроль	с бета-ЦД	контроль
Гексан	21	21	0	0
Гептан	23	23	0	0
Циклогексан	23	23	1	2
Декан	31	33	2	3
Ундекан	37	42	6	5
Додекан	50	54	3	2
Тридекан	64	74	5	2
Тетрадекан	94	107	5	4
Пентадекан	135	158	7	5

Следует также отметить, что не удалось в данных условиях эксперимента осуществить энантиоселективное разделение рацематов вышеуказанных аминокислот. Тем не менее, налицо факт селек-

Таблица 2. Идентификация различных аминокислот и их производных (условия см. табл. 1)

Метилэфирные эфиры аминокислот	Время удерживания, С	
	колонок с бета-ЦД	колонок без бета-ЦД
Метил-DL-Валин	30	30
Метил-DL-Лейцин	44	48
Метил-L-Изолейцин	42	48
Метил-DL-Треонин	60	60
Метил-Бензоил-DL-Метионин	56	64
Метил-N-ацетил-DL-α-Аланин	83	88
Метил-DL-Лизин	104	112
Метил-DL-Метионин	168	160
Метил-DL-β-Фенил-α-Аланин	304	288

Анализ различных эфирных масел установил присутствие достаточно большого количества сопутствующих веществ во всех исследуемых объектах. Однако в случае с лимонцем, терпинеолом и цедреном особенно ярко проявляется более высокая разрешающая способность носителя с производным бета-ЦД. С другой стороны, данная колонка была несколько менее эффективной при анализе санталола (табл.3).

Таблица 3. Определение степени чистоты различных эфирных масел (указаны см. табл. 1)

Эфирное масло	Число разрешенных пиков	
	колонок с бета-ЦД	колонок без бета-ЦД
Лимонен	11	10
Цитронеллол	10	10
Шалфейное	13	13
Лавандовое	10	10
Линалсол	13	14
Геранилацетат	13	11
Терпинеол	13	12
Сендалол	9	14
Цедрен	18	10
Цинеол	6	5
Ментон	15	16

В тех случаях, когда количество разделенных пиков оставалось неизменным, отмечалось ухудшение разделения пиков на колонке без содержания производного бета-ЦД.

Таким образом, исходя из приведенных данных, можно заключить, что феномен инклюзии различных веществ с ЦД может значительно изменять основные характеристики хроматографического разделения и в достаточной степени улучшать их. Для иллюстрации приведем значение обобщенного критерия разделения, подсчитанного [2] для орто- и мета- изомеров нитроанилина. Для колонки с содержанием производного бета-ЦД он составил 3,3, а для контрольной колонки - 1,5, то есть исследуемая колонка по качеству разделения значительно превосходит контрольную.

Данные исследования будут продолжены в условиях капиллярных колонок, а также высокоскоростной жидкостной хроматографии с целью выяснения энантиоселективных свойств полученных производных.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНО (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Абелян В.А. Авт. канд. дисс., 18. П., 1982
2. Бякирев Д.А., Шушунова А.А. Руководство по газовой хроматографии. 105, М., 1987
3. King W.A. In: Carbohydr. Res., 192, 51-60, 1989
4. King W.A. In: New trends in cyclodextrins and derivatives. Ed D. Duchene. Paris Editions de Sante, 553-594, 1991.
5. Smolkova-Kaulemansova E. In: Cyclodextrins and their industrial uses. Ed D. Duchene. Paris Editions de Sante, 259-297, 1987

Поступила 25.X.1994

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БЕТА-АМИЛАЗЫ У АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.В. ГАСПАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Изучено распространение бета-амилазы у культур разных видов аэробных спорообразующих бактерий. Выявлено, что синтез бета-амилазы преимущественно характерен для представителей видов *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides*, а также *B. thuringiensis*. Установлено, что у культур подвидов *B. thuringiensis* бета-амилазная активность проявляется с наиболее выраженной альфа - амилазной активностью.

Ուսումնասիրված է բակտերիաների տարածումը ալբոս սպորոստերանտրոֆների և սպորոնտրոֆների կուլտուրաների մոտ: Բացահայտված է, որ բակտերիաների մեծ մասը, առավելագույնը հանդիպում է *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides*, ինչպես նաև *B. thuringiensis* տեսակների ներկայացուցիչներին: Հստակացված է, որ *B. thuringiensis* սերանոտների կուլտուրաների մոտ բետա-ամիլազային ակտիվությունը հանդիպում է ավելի արտահայտված ալֆա-ամիլազային ակտիվության հետ:

The distribution of beta - amylase activity in different species of spore-forming bacteria has been studied. The biosynthesis of beta - amylase was mainly distincted to the representatives of *Bacillus polymyxa*, *B. cereus*, *B. mycoides* and *B. thuringiensis*. The beta - amylase in strains of subspecies *B. thuringiensis* was revealed with more expressed alfa - amylase activity.

Аэробные спорообразующие бактерии бета-амилаза

Бета-амилаза (α-1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2.) - фермент, катализирующий гидролиз крахмала с образованием мальтозы, распространена у многих растений и различных групп микроорганизмов [8, 12]. Особый интерес представляют культуры аэробных спорообразующих бактерий, среди которых выявлены наиболее активные продуценты [4, 6, 8].

На основе использования высокоактивных штаммов - продуцентов бета-амилазы в ряде стран организовано ее промышленное производство, а вырабатываемые препараты успешно применяются в крахмало-паточной, кондитерской и других отраслях пищевой промышленности, в получении мальтозы и других продуктов [3, 7, 12].

В настоящей работе обобщены результаты систематического исследования распространения бета-амилазы среди хорошо идентифицированных культур разных видов спорообразующих бактерий,

причем ставилась задача характеристики в целом их амилолитической активности.

Материал и методика. Объектами исследований явились культуры разных видов аэробных спорообразующих бактерий из коллекции культур Института микробиологии НАН Армении (ИНМИА).

Для выращивания исследуемых культур использовали следующие питательные среды. Для мезофильных культур - среду КП (г/л): крахмал 10; пептон - 5.0; дрожжевой экстракт - 5.0; для термофильных культур - среду Бечинкой с соев. [2], а для алкалофильных культур - среду Хорикоши [9].

Среды инокулировали в количестве 5% односуточными культурами, выращенными на соответствующих агаризованных или жидких средах.

Культивирование мезофильных и алкалофильных культур проводили в колбах Эрленмейера емкостью 250 мл, содержащих 30 мл среды, на круговых качалках (200 об/мин) при 30° в течение 60 ч, а термофильных - при 56° 18 часов.

Амилазную активность определяли в супернатанте культуральной жидкости (кж).

О бета-амилазной активности судили по осаживающей активности, определяя в реакционной смеси образовавшиеся редуцирующие сахара методом Шомо-дья-Нельсона [10,11]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует образование из 1 %-ного растворимого крахмала 1 ммоль мальтозы за 1 мин.

Декстринизирующую, или альфа-амилазную активность определяли колориметрическим методом по Рухлядовой [5]. За единицу активности принимали количество фермента, которое катализирует расщепление 1г растворимого крахмала при степени его гидролиза 30% за 10 мин.

Мальтозу идентифицировали методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:3:3), проявитель - раствор анилинфталата. Продукты гидролиза крахмала определяли методом бумажной и тонкослойной хроматографии.

Результаты и обсуждение. Данные об амилолитической активности разных групп и видов бацилл, обобщенные в табл. 1.

Таблица 1. Амилолитическая активность культур разных видов бацилл

Виды и группы бактерий	Всего испытанных штаммов	Продуцируют амилазы	
		всего	в т.ч. активных
<i>Bacillus polymyxa</i>	23	23	13
<i>B. mycoides</i>	2	2	2
<i>B. cereus</i>	11	11	6
<i>B. thuringiensis</i> (серотип 1-19)	49	49	48
<i>Bacillus</i> sp.	13	0	0
Термофилы	4	4	4
Алкалофилы	10	10	1

свидетельствуют о широком распространении у них этих свойств, за исключением штаммов нового вида бацилл (*Bacillus* sp.).

Учитывая широкое распространение амилолитических свойств у культур энтомопатогенных бацилл *B.thuringiensis*, используемых в производстве бактериальных инсектицидов [1], нами была изучена декстринирующая и осахаривающая активность штаммов его различных разновидностей (серотипы 1-19).

Результаты опытов, представленные в табл. 2, показывают, что все культуры *B.thuringiensis*, обладают декстринирующей и осахаривающей активностью, причем у них более выражены декстринирующие, или альфа-амилазные свойства. Внутри отдельных разновидностей обнаруживается определенная вариабельность ферментативной активности. Можно отметить наличие более активных амилаз у разновидностей *thuringiensis*, *sotto - dendrolimus*, *caucasicus - darmstadiensis*, *galleriae* и сравнительно слабых - у разновидности *finitimus*.

Таблица 2. Декстринирующая и осахаривающая активность культур *B.thuringiensis* (реакционная смесь: 1 мл 1%-ного раствора крахмала; 0,5 мл кж. pH 7,0, 300 ; 10 мин)

Разновидности серотипы)*	Декстринирующая активность, ед/мл	Осахаривающая активность, ед/мл
<i>thuringiensis</i> -1	4,25	1,45
<i>finitimus</i> -2	0,02	0,013
<i>alesti-kurstaki</i> -3	1,70	0,25
<i>sotto-dendrolimus</i> -4	4,00	1,50
<i>galleriae</i> -5	3,95	1,00
<i>subtoxicus, entomocidus</i> -6	2,50	0,56
<i>azawai</i> -7	2,70	0,60
<i>tolworth</i> -9	2,70	0,62
<i>caucasicus-darmstadiensis</i> -10	4,00	1,20
<i>toumanoffi</i> -11	2,10	0,35
<i>thompsoni</i> -12	1,88	0,63
<i>pakistani</i> -13	3,80	1,00
<i>israelensis</i> -14	2,30	0,54
<i>dakota</i> -15	3,10	0,90
<i>indiana</i> -16	3,60	1,00
<i>tohokuensis</i> -17	3,30	0,78
<i>kumamotoensis</i> -18	3,60	1,00
<i>tochigiensis</i> -19	2,86	0,90

)* Представляются средние данные для каждого серотипа.

Как показывают данные табл. 3, близкородственные *B.thuringiensis* штаммы *B.mycoides* и *B.cerealis* характеризуются выраженной осахаривающей и слабодекстринирующей активностью. Как известно, *B.thuringiensis* от указанных видов бацилл отличается биосинтез

энтомоцидных токсинов, хотя филогенетически и по своим морфофизиологическим свойствам они весьма близки [1]

Таблица 3 Декстринирующая и осажаривающая активность некоторых видов бацилл (реакционная смесь 1 мл 1%-ного раствора крахмала, 0,5 мл юк, 10 мин для мезофилов - pH 7,0 и 300; термофилов - pH 7,0 и 500; алкалофилов - pH 8,5 и 300,

Вид, группа бактерий *	Декстринирующая активность, эд/мл	Осахаривающая активность, эд/мл
<i>B. polymyxa</i>	0,2	3,5
<i>B. mycoides</i>	0,2	1,5
<i>B. cereus</i>	0,1	0,8
<i>Bacillus</i> sp. (термофилы)	15,5	1,25
<i>Bacillus</i> sp. (алкалофилы)	8,0	0,8

)* Представляются средние данные для каждого вида

Из таблицы 3 выявляется весьма интересная характеристическая особенность культур *B. polymyxa* - преобладание сильной осажаривающей активности над декстринирующей. Эта особенность, на наш взгляд, может явиться дифференцирующим признаком культур этого вида.

Изученные нами штаммы экстремофильных форм спорообразующих бактерий также обладают указанными свойствами (табл.3).

На материале выборочных типичных штаммов испытанных видов нами были проведены исследования по характеристике конечных продуктов ферментативного гидролиза крахмала. Подытоженные в табл. 4 результаты наших опытов выявляют наличие определенной специфики продуцирования амилаз у изученных видов бацилл.

У штаммов *B. polymyxa* среди продуктов гидролиза крахмала обнаружена только мальтоза, у штаммов *B. cereus*, *B. mycoides* - мальтоза и следы других олигосахаридов, что свидетельствует о наличии бета-амилазы. У культур *B. thuringiensis* среди продуктов гидролиза крахмала накапливаются мальтоза, глюкоза и некоторые олигосахариды. Можно предположить, что культуры указанного вида обладают комплексом амилаз, обуславливающих разнородность конечных продуктов. У штаммов 4-х термофильных и одной алкалофильной культур среди конечных продуктов гидролиза.

Таблица 4. Продукты гидролиза крахмала у разных видов бацилл (реакционная смесь: 2 мл 1%-ного раствора крахмала; 1 мл юж; определенный буфер pH 7.0; 8.5, температура 300, 500, 1 ч)

Виды бацилл	Количество штаммов	Обнаружены при ферментативном гидролизе крахмала			
		глюкоза	мальтоза	олигосахариды	циклические олигосахариды (циклодекстрины)
<i>B. pumilus</i>	7	-	+++	-	-
<i>B. cereus</i>	3	-	+++	следы	-
<i>B. thuringiensis</i>	2	-	+++	следы	-
<i>B. thuringiensis</i>	20	+	+	+	-
Термофилы	4	-	-	+	+++
Алкалофилы	1	-	-	+	+++

крахмала выявляются нередуцирующие вещества - циклические олигосахариды, или циклодекстрины.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Адричян Э.К. Энтомопатогенные бактерии и их значение. Ереван, 1973
2. Бечина Е.М., Логинская Л.Г., Гернет М.В. Прикл биохим. и микробиол. 18, 5.640-646, 1982
3. Глемжа А.А., Люджос Л.Л., Петрова Л.И. Микробные ферменты в народном хозяйстве. Вильнюс, 1985
4. Рашап Р.К., Юшкяйте Э.А., Глемжа А.А. Прикл биохим. и микробиол. 17, 2.225-232, 1981
5. Рухляева П.П., Польшалина Г.В. Методы определения гидролитических ферментов. М., 1981
6. Филиппова И.Б., Посякова Л.С., Бедогариев Ю.А., Кравченко Т.И. Ас 1613491, СССР, 1990
7. Фогарти В.М. Микробные ферменты и биотехнология. М., 1986
8. Fogarty W.M., Kelly C.T. Progress in Indust. Microbiol., 15, 87-150, 1979
9. Horikoshi K., Akiba T. Alkalophilic microorganisms: a new microbial world. Springer-Verlag, Berlin, 1982.
10. Nelson N.G.J. Biol. Chem., 53, 1, 375, 1944
11. Somogyi M.A.J. Biol. Chem., 195, 1, 19, 1952
12. Yamamoto T. (ed.) Handbook of amylases and related enzymes. Their sources, isolation methods, properties and applications. Tokyo, 1988

Поступила 7.IX.1994

ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ИММОБИЛИЗОВАННОЙ БЕТА-АМИЛАЗЫ *BACILLUS POLYMYXA*

А.З. ГАСПАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Получена иммобилизованная бета-амилаза из штамма *Bacillus polymyxa* на силиохроме С-80 методом ковалентного связывания. Определены оптимальные условия каталитической активности иммобилизованного фермента: pH 6,8; 45°; $K_m=1,25$ мг/мл (по крахмалу), $V_{max}=0,048$ мг/мин (по мальтозе). Полученный биокатализатор в течение 10 суток сохраняет 80-85% исходной активности при 40-45°. Осуществлен процесс получения мальтозы с помощью иммобилизованной бета-амилазы в проточных условиях из 10 %-ного раствора разжиженного крахмала, 0,5 ДЭ, pH 6,8, 45°, с удельной скоростью 0,25 ч⁻¹. Выход мальтозы 75 % от использованного субстрата.

Կոփակված կապակցման մեթոդով С-80 սիլոխրոմի վրա ստացված է *Bacillus polymyxa* շտամի իմոբիլիզացված բետա-ամիլազը: Որպեսզի կոնդիցիոնները ֆերմենտի կատալիտիկ ակտիվության օպտիմալ արդյունքները ապահովեն, pH 6,8, 45°, $K_m=1,25$ մգ/մլ (ստարչ): $V_{max}=0,048$ մգ/վրկ (մալտոզ): Ստացված բիոկատալիզատորը 10 օրվա ընթացքում պահպանում է սկզբնական ակտիվության 80-85 % 40-45°-ում: Բերքիատու եկտրային արդյունքներում իմոբիլիզացված բետա-ամիլազի կիրառմամբ իրականացվում է մալտոզի ստացումը 10% չրկացված օստայի լուծույթից, 0,5 % -ով, pH 6,8, 45°, ակտիվությունը արագությունը 0,25-ի համեմատ: Կապակցված օստայից մալտոզի ելքը կազմում է 75%:

The immobilized beta-amylase of *Bacillus polymyxa* was obtained on the silochrom C-80 by method of covalent binding. The optimal conditions of the catalytic activity of the immobilized enzyme were determined: pH 6,8; 45°; $K_m=1,25$ mg/ml of starch, $V_{max}=0,048$ mg/min of maltose. The obtained biocatalyst after 10 days at 40-45° conserved 80-85 % of original activity. The process of maltose production has been realized by immobilized beta-amylase in continuous-flow conditions from 10 % of liquefied starch, 0,5 DE, pH 6,8, 45°, at space velocity of 0,25 h⁻¹. The yield of maltose was 75% the substrate used.

Иммобилизация - силиохром С-80 - бета-амилаза-мальтоза

Для иммобилизации бета-амилазы применяются практически все известные методы иммобилизации ферментов [2,4,6,7,10]. Полученные препараты иммобилизованной бета-амилазы имеют неудовлетворительную стабильность [11]. В настоящей работе представлены результаты работ по иммобилизации бета-амилазы и ее применения для получения мальтозы в непрерывных условиях.

Материал и методика. В качестве препарата бета-амилазы (α -1,4-глюканмальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) использовали аффинно-очищенный и подробно изученный фермент из штамма *Bacillus polymyxa* [1]. Исходная активность препарата 1,68 ед/мг белка (единица активности соответствует количеству фермента, необходимого для образования 1 мкмоль мальтозы из растворимого крахмала (1%) за 1 мин).

Для иммобилизации бета-амилазы был применен метод ковалентного связывания на силихроме С-80. Активирование силихрома осуществляли обработкой его гамма-аминопропилтриэтоксисиланом, затем глutarовым альдегидом по методике [8]. Носитель промывали на фильтре дистиллированной водой и использовали для иммобилизации.

Иммобилизацию бета-амилазы на активированном силихроме проводили перемешиванием смеси раствора фермента и носителя в течение 5ч при температуре 18-20°. Затем иммобилизованный фермент промывали холодной дистиллированной водой до полного исчезновения белка в промывных водах.

Белок определяли по методу Лоури.

Определение активности иммобилизованной бета-амилазы проводили в реакционной смеси, содержащей: 1 г иммобилизованного препарата в 1 мл 1/15 М фосфатного буфера, pH 7,0, и 4 мл 1 %-ного раствора растворимого крахмала при 45° в условиях постоянного перемешивания в течение 1 часа. Активность иммобилизованной бета-амилазы рассчитывали по количеству образовавшейся мальтозы в мкмоль на 1 г носителя в течение 1 часа.

Получение мальтозы в непрерывных условиях проводили в биореакторе сплошного заполнения с вытеснением. Раствор частично гидролизованного крахмала подавали в биореактор снизу вверх.

Анализ редуцирующих веществ проводили методом Шомоды-Нельсона [5,9]. Мальтозу идентифицировали тонкослойной хроматографией (ТСХ) в системе н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:3:3), в качестве проявителя используя анилинфталат, а также высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на приборе НРР-4001 (Чехословакия) в колонке SEPARON SGX-NH₂ (150 x 3,3 мм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрил - вода (70:30), скорость - 2 мл/мин, в качестве детектора - дифференциальный рефрактометр [3].

Результаты и обсуждение. Иммобилизацию бета-амилазы осуществляли добавлением 200 мл раствора фермента (7,56 мг/мл белка с исходной активностью 1,68 ед/мг белка) на 200 г активированного носителя с перемешиванием при 20° 5ч. (табл. 1)

Таблица 1: Иммобилизация бета-амилазы *B. polymyxa* на силихроме С-80 (условия: 20°; постоянное перемешивание на качалке (160 об/мин); исходный белок 7,56 мг/мл; исходная активность 1,68 ед/мг белка)

Время, час	Связанный белок, мг/г носителя	Активность, ед/мг белка (мкмоль мальтозы/мин/мг белка)	Активность, ед/г носителя (мкмоль мальтозы/час/г носителя)
1,5	2,5	0,34	16,4
3,0	6,3	1,01	356,4
5,0	6,3	1,01	356,4

Данные табл.1 показывают что полученный носитель в условиях эксперимента за 3ч связывает 6,3 мг белка, а активность в иммобилизованном состоянии 1,01 ед/мг белка или 356,4 ед/г носителя, т.е. сохраняется 60 % исходной активности. Дальнейшее увеличение времени контакта (5ч) не приводило к изменениям.

Исследование зависимости активности иммобилизованной бета-амилазы от температуры и pH показало, что максимальная каталитическая активность иммобилизованного фермента проявляется в интервале температур 40-60° оптимум 45° (табл.2), и в интервале pH 6,5-7,5, оптимум 6,8, с достаточно высокой активностью в области pH 6,0-8,5 (табл.3).

Таблица 2. Влияние температуры на активность иммобилизованного фермента (условия: 1 г препарата; 5 мл 1%-ного крахмала; pH 6,8; 160 об/мин; 1 ч)

Температура, °C	Относительная активность, %
30	60
40	96
45	100
50	100
60	98
70	90
75	35
80	10

Таблица 3. Влияние pH на активность иммобилизованного фермента (Условия: 1 г препарата; 4 мл 1%-ного крахмала, 1 мл буфера (0,2M ацетатный буфер pH 4-6; 1/15M фосфатный буфер pH 6-8, 0,2M NaOH- глициновый буфер pH 8,5-10), 160 об/мин, 1 ч)

pH	Относительная активность, %
4,5	35
5,5	55
6,0	82
6,5	96
6,8	100
7,0	100
7,5	98
8,0	84
8,5	62
9,0	33
10,0	0

Полученные результаты в целом идентичны с таковыми для нативного фермента [1].

Исследования кинетики реакции гидролиза при различных концентрациях субстрата выявило, что по сравнению с нативным ферментом, при котором K_m равна 1,1 мг/мл (по крахмалу), а V_{max} - 0,061 мг/мин (по мальтозе) [1], у иммобилизованного фермента несколько увеличивается K_m - 1,25 мг/мл (по крахмалу) и соответственно уменьшается V_{max} - 0,048 мг/мин (по мальтозе). Небольшая разница в значениях K_m иммобилизованного и нативного фермента, вероятно, зависит от носителя, который своеобразно препятствует приближению субстрата к ферменту. Такое явление наблюдалось у иммобилизованной на хитозане бета-амилазы, выделенной из сои, когда K_m нативного фермента - 0,26 мг/мл, а K_m иммобилизованного фермента - 37,0 мг/мл (по крахмалу) [12].

Стабильность иммобилизованной бета-амилазы при различных температурах определяли в проточных условиях в течение 10 суток в колонке (2 x 20 см), через которую пропускали 10 %-ный раствор крахмала, частично разжиженного альфа-амилазой (0,5 ДЭ), pH 6,8, с удельной скоростью 0,2 ч⁻¹ (табл.4.).

Таблица 4. Стабильность иммобилизованной на силихроме C-80 бета-амилазы *B. polymyxa* при различных температурах (условия: колонки (2x20 см); 10 %-ный раствор крахмала; 0,5 ДЭ, pH 6,8; SV=0,2ч⁻¹)

Время, сутки	Остаточная активность, %		
	40°	45°	55°
1	100	100	100
2	100	100	91
3	100	100	83
4	100	100	72
5	100	100	65
6	100	97	50
7	97	95	34
8	95	90	17
9	90	86	8
10	85	80	0

Полученные результаты показали, что иммобилизованный фермент проявлял достаточно высокую стабильность при температурах 40-45°.

В условиях эксперимента время полужизни иммобилизованной на силохроме бета-амилазы при температурах до 45° составляло около 50 суток.

Получения мальтозы с помощью иммобилизованной бета-амилазы в проточных системах осуществляли следующим образом. Колонку заполняли иммобилизованным ферментом и через него пропускали 10 %-ный раствор крахмала с 0,5 ДЭ, разжиженный альфа-амилазой. С успехом могут быть использованы удельные скорости до 0,25 ч⁻¹, приводящие к максимальным выходам мальтозы (табл.5).

Таблица 5. Влияние удельной скорости на образование мальтозы (условия: 10 %-ный раствор крахмала, 0,5 ДЭ; рН 6,8, 45°)

Удельная скорость, SV ч ⁻¹	Выход мальтозы, %
0,10	70
0,20	75
0,25	75
0,30	65
0,35	60
0,40	53

Полученный раствор обесцвечивали активированным углем (4г на 1,0 л раствора) при 60-70° в течение 20 мин и фильтровали. С целью получения мальтозы пищевого назначения раствор выпаривали досуха, а реактивного назначения - концентрировали при 50° до насыщения ($d=1,1-1,3$) и кристаллизовали при 10-15° 48 часов. Далее фильтровали и высушивали. В проточных условиях с помощью иммобилизованной на силохроме бета-амилазы из *B.polytruxa* получается мальтоза с выходом 75% от использованного крахмала.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороса) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3572.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Гаспарян А.В., Абелян В.А., Африжян Э.К. Биохимия, 57, 6, 856-861, 1992
- 2 Коваченко Т.И., Гулюк Н.Г., Гусаков А.Б., Синицын А.П. Пищ.пром., 9, 32-34, 1988.
- 3 Høkse H.J. Chromatography, 189, 98-100, 1980
- 4 Kokufuta E., Shimizu N., Tanaka H., Nakamura I. Biotech Bioeng., 32, 6, 756-759, 1988
- 5 Nelson N.G. J. Biol. Chem., 153, 375-380, 1944.
- 6 Ohba R., Ueda S. Biotech. Bioeng., 24, 2137-2154, 1980
- 7 Patent GB 2131812A, 1984
- 8 Robinson P.J., Dunnill P., Lilly M.D. Biotech. Bioeng., 15, 606, 1973.
- 9 Somogyi M.A. J. Biol. Chem., 195, 19-23, 1952
- 10 Takasaki Y., Yamanobe T. Rept. Ferment Res. Inst., 52, 1-9, 1979.
- 11 Ulbrich R., Goibik R., Schellenberger A. Biotech. Bioeng., 37, 3, 280-287, 1991
- 12 Yoshida M., Oishi K., Kimura T., Ogata M., Nakakuki T. Agric. Biol. Chem., 53, 3139-3142, 1989.

Поступила 7.IX.1994

РАСПРОСТРАНЕНИЕ БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ У ЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ФОРМ БАЦИЛЛ

К.В. ЧИТЧЯН, А.А. ХАЧАТУРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Установлена приуроченность бета-галактозидазной активности к термо-фильным формам вида *Bacillus licheniformis* и / алкалофильным видам *Bacillus alcalophilus* "subsp. halodurans". Собранные активные штаммы термофильных бацилл для дальнейшего изучения этого фермента.

Հաստատվել է, որ ԹԵՐՄՈ-ՊՈՐՏՈՒԿԱՄԻՐՈՒԹՅԱՆ ԵՐՐԻՆԻՆԳ ԼՐԱՊԵՏՈՒՄԸ ԲԱԿԵՐԵՐԻ ՀԱՄԱՆԵՐԻ ՃՈՒՆ, ՈՐԱՆԵՐ ՆԵՐՍՏՈՒՄԸ ԵՆ ՀԵՊԵՐՏՈՒՄԸ ՍՈՍԵՐԵՐ ԽՈՐԵՐԻՐ: ՈւՍԳՈՒՄՈՒԹՅԱՆ Ե, ՈՐ ՔԻՄՈՒ-ՊՈՐՏՈՒԿԱՄԻՐՈՒԹՅԱՆ ԱՄՈՒՐՈՐԴՈՒՄԸ ԲԻՈՐՈՂ *B. licheniformis* չԻՐՈՒՄԵՐ Ե *Bacillus* "subsp. halodurans"-ի էՍԻՄՈՒՄԵՐ ՃՆԵՐԻՆ: ԸՆԽՈՐԴԸ ԵՆ ՉԻՐՈՒՄԵՐ ԶԱՄԱՆԵՐԻ ԱՄՈՒՐՈՐԴ ՀԱՄԱՆԵՐ՝ ՎՈՂ ՖԻՐՄԻՆԻՐ ԽԼՈՒՄԻՆ ՄԱՍՈՒՄՈՒՄԻՐՈՒՄԸ ԽՈՒՄԻՐ:

It was established the possession of beta-galactosidase activity of thermophilic forms of the species *Bacillus licheniformis* and the alkalophilic forms of the *Bacillus alcalophilus* "subsp. halodurans". The active strains of the thermophilic bacilli have been selected for the further investigation.

Бета- галактозидазз - бациллы - термофилы - елкалофилы.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования по изучению практически важных ферментов. К таким перспективным ферментам относится бета-галактозидаза (лактаза, бета-Д-галактозид-галактогидролаза, КФ 3.2.1.23), под действием которой относительно плохо растворимый и усвояемый дисахарид-лактоза превращается в кристаллизуемую смесь глюкозы и галактозы.

Применение бета-галактозидазы имеет большое значение при изготовлении концентратов молочной сыворотки, в производстве различных диетических продуктов, кондитерских изделий, мороженого, в хлебопечении, так как предварительный гидролиз лактозы может способствовать более полному использованию этих ценных продуктов [5].

Бета-галактозидаза широко распространена в природе, растительных [2] и животных организмах [6]. Она обнаружена также у большого числа микроорганизмов, в особенности у

дрожжей [3] и грибов [4] / экстремофильных бациллярных форм бета-галактозидазы сравнительно мало изучена [12,13,14,16]. Среди экстремо-филов особый интерес представляют термофильные формы, которые в последние годы являются объектами многочисленных исследований по экологии, систематике, метаболизму и биосинтезу различных физиологически активных соединений [1].

Настоящая работа посвящена изучению распространения бета-галактозидазы у более чем 700 штаммов разных видов экстремофильных бацилл, выделенных в основном из разных почв Армении.

Материал и методика. Объектами исследования служили штаммы бацилл и дрожжей, хранимые в коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН РА (ИНМИА) (табл.1).

Морфокультуральные и физиолого-биохимические свойства новых термофильных и алкалофильных штаммов бацилл изучались по [8,9,10,11] и идентифицировались по этим же источникам и определителю Берги [7]. Учитывая особенности этих организмов, тестирование признаков проводили с модификацией методик - термофилы выращивали при 56°, алкалофилы - с доведением pH среды до 9,0 и выше, термоацидофилы - при 56° и pH 4,0 психрофилы - при 4°, а галофилы - с добавлением в питательные среды 15 % NaCl.

Для определения бета-галактозидазной активности [6] использовали культуральную жидкость (кж) штаммов, полученную при выращивании в средах, подобранных для каждой формы микробов: для термофилов и психрофилов (г/л) - NH_4Cl - 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; CaCl_2 - 0,2; K_2HPO_4 - 0,3; NaCl - 0,2; дрожжевой экстракт - 0,5; лактоза - 5,0; MnCl_2 - следы; pH - 7,0-7,2; для термоацидофилов - та же среда с pH 4,0; для алкалофилов - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; KH_2PO_4 - 1,0; Na_2CO_3 - 1,0; NH_4Cl - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,5; лактоза - 5,0; pH 9,0 и более; для галофилов - NaCl - 150,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; KH_2PO_4 - 1,0; NH_4Cl - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,5; лактоза - 5,0; pH 7,0-7,2. При постановке реакции бесцветный субстрат о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид добавляли к КЖ, которая в случае наличия активности вследствие расщепления субстрата и выделения желтого о-нитрофенола окрашивалась в желтый цвет.

Количественно бета-галактозидазную активность устанавливали определением содержания редуцирующих сахаров в реакционной среде известным методом Шомоди-Нельсона [15,17].

Результаты и обсуждение. Для выявления активных продуцентов бета-галактозидазы проведен скрининг более 700 штаммов. Среди них 652 - новые оригинальные культуры разных экстремофильных форм бацилл из разных почв Армении, а также из экскрементов животных; 40 штаммов мезофильных бацилл и 28 штаммов дрожжей (табл.1).

Таблица 1. Наличие бета-галактозидазной активности у разных групп микроорганизмов

Микроорганизмы	Число изученных штаммов	Из них активных
Экстремофилы		
термофилы	315	48
алкалофилы	203	48
термоацидофилы	77	10
галофилы	26	6
психрофилы	21	1
Мезофилы, разные виды бацилл	40	8
Дрожжи	28	7

Как видно из таблицы, у бациллярных форм и дрожжей изучаемая активность встречается довольно часто. Из экстремофильных форм бацилл в процентном отношении на первом месте алкалофилы и галофилы, затем термофилы, реже обнаруживается это свойство у термоацидофилов и психрофилов.

Таблица 2. Видовая принадлежность штаммов, обладающих бета-галактозидазной активностью

Название видов	Число активных штаммов	Название видов	Число активных штаммов
Термофилы, всего	48	Алкалофилы, всего	45
<i>B. licheniformis</i>	15	<i>B. alcalophilus</i>	
<i>B. circulans</i>	8	subsp. <i>halodurans</i>	19
<i>B. subtilis</i>	7	<i>B. alcalophilus</i>	8
<i>B. cereus</i>	3	<i>B. licheniformis</i>	2
<i>B. macerans</i>	3	<i>B. coagulans</i>	2
<i>B. stearothermophilus</i>	2	<i>B. megaterium</i>	2
<i>B. firmus</i>	2	<i>B. cereus</i>	1
<i>B. coagulans</i>	1	<i>B. circulans</i>	1
<i>Bacillus</i> sp.	7	<i>B. firmus</i>	1
		<i>B. filicollinus</i>	1
Мезофилы, всего	8	<i>B. psychrosaccharolyticus</i>	1
<i>B. alvei</i>	2	<i>Bacillus</i> sp.	7
<i>B. longisporus</i>	2	Галофилы, всего	6
<i>B. brevis</i>	1	<i>B. circulans</i>	1
<i>B. licheniformis</i>	1	<i>B. cereus</i>	1
<i>B. macerans</i>	1	<i>B. sphaericus</i>	1
<i>B. pasteurii</i> var. <i>gelaticus</i>	1	<i>B. pantothenicus</i>	1
		<i>B. fastidiosus</i>	1
		<i>B. megaterium</i>	1

Анализ данных о видовом составе продуцентов бета-галактозидазы выявляет наибольшее число штаммов с этой активностью у алкалофильных бацилл вида *B. alcalophilus subsp. halodurans*, у термофилов вида *B. licheniformis*. На втором месте - *B. alcalophilus* и *B. circulans* соответственно. Большое число активных штаммов обнаруживается и у других видов бацилл (табл 2).

Количественное определение бета-галактозидазной активности у ряда термофильных штаммов позволило установить эту способность в пределах 300-400 ед/мин/г сырой биомассы. Наиболее активные штаммы отобраны для дальнейшего изучения.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биология термофильных микроорганизмов. М., 1986
2. Кахана Б.М., Аписимосич В.В., Кривилева Н.И. Прикл. биохим. и микробиол., 21, 6, 832-837, 1985
3. Фениксова Р.В., Гилова Н.Г., Гуплев-Зайцев С.С., Тихомирова А.С., Купцова А.К. Прикл. биохим. и микробиол., 11, 3, 382-385, 1975
4. Школьников Т.А. Достиж. микробиол.-практике 2. Тез. I съезда Всес. микробиол. о-ва, 170-171, Алма-Ата, 1985
5. Целокова И.Ф., Кудря В.А. Сперем. технол. сыроделия безотход. перераб. молока. Мат-лы Всес. нл. конф. Ереван, 14-16 ноября 1988, 367-368, Ереван, 1988
6. Энтеробактерии. под. ред. В.И. Похровского, 294-295, М., 1985
7. Bergey's. Manual of Sistematic Bacteriology. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, 2, 1104-1139, 1986
8. Goodman R.E., Peterson D.M. Can. J. Microbiol., 22, 6, 817-825, 1976
9. Gordon R.E., Haynes W.C., Pang C.H.W. The Genus Bacillus. Agricult. Handbook 427, Washington D.C., 283, 1973
10. Gynhang F., Hidaka K., Siminovitch L. Mol. and Cell Biol., 2, 12, 1628-1632, 1982
11. Horikoshi K., Akiba T. A new microbial world. Jap. Sci. Soc. Press Tokyo. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New-York, 213, 1982
12. Ikura J., Honkoshi K. Agr. Biol. Chem., 43, 1356-1360, 1979
13. La Cara F., Cozzolino K., Nazzaro F., Orlando P., Rossi M. Int. Conf. Thermophiles Sci. and Technol. Reykjavik, 23rd-26th Aug., 1982-Reykjavik, 32, 1982
14. Levin R.E., Mahoney R.R. Antonie van Leeuwenhoek, 47, 1, 53-54, 1981
15. Nelson N.A. J. Biol. Chem., 153, 1, 375-380, 1944
16. Rahim Khalid A.A., Lee Syong H. J. Dairy Sci., 74, 6, 1773-1778, 1991
17. Samogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 13-23, 1952

Поступила 22.IX.1994

БЕТА-ГАЛАКТОЗИДАЗЫ НЕКОТОРЫХ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ

К. В. ЧИТЧЯН, В. А. АБЕЛЯН

Институт микробиологии ИАН Армении, 378510, г. АБ-ВАН

Изучена бета-галактозидазная активность у двух термофильных штаммов-активных продуцентов бета-галактозидазы. Определены некоторые биохимические и физико-химические характеристики ферментов. Благодаря своим уникальным свойствам они могут быть использованы для получения различных подсластителей на лактозной основе.

Դուրսնուսիրվել է երկու ջերմասեր տեսակի արտադրիչների բետա-գալակտոզիդազային ակտիվությունը: Բացահայտվել են ֆերմենտի որոշ բնութագրական և ֆիզիկոքիմիական հատկություններ: Ենթադրվում է, որ շնորհիվ իրենց յուրահատկության նրանք կարող են կիրառվել քվեռագույնի հիմքով ապրանքային բաղադրանքների ստացման համար:

Two thermophilic strains-active producers of beta galactosidase have been found. Some physicochemical and biochemical properties of enzymes obtained have been studied. Due to the unique characteristics of the enzymes they may be used for the production of various sweeteners from lactose.

Фермент - бета-галактозидаза - термофилы

В настоящее время получение различных подсластителей-заместителей обычного сахара с низкой калорийностью и оздоровительным эффектом является достаточно важной задачей. В этой связи определение интерес представляет бета-галактозидаза (КФ 3.2.1.23), которая широко применяется в процессах получения безлактозного молока и переработки молочной сыворотки [1,7,9,12,15], с целью получения различных глюкозно-галактозных сиропов. Эффективность существенно может возрасть при применении ее термофильных форм, поскольку процессы могут быть осуществлены при температурах пастеризации молока, что исключает прорастание посторонней микрофлоры.

Материал и методика. В качестве культур-продуцентов бета-галактозидазы использовали термофильные *Bacillus* sp. K₁ и K₂ из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии ИАН Армении (ИНМИА), которые выращивали в течение 18 ч при 56° на жидкой питательной среде, содержащей (г/л): пептон -10,0; дрожжевой экстракт-5,0; лактозу-5,0; $MnCl_2$ - 0,001; pH 7,0-7,2. Биомассу отделяли центрифугированием при 5 000 г в течение 15-20 мин. Бета-галактозидазную активность определяли согласно известному методу [2]. Количество общих сахаров фенол-серной кислотой [5], а редуцирующих сахаров - по [11,14]. Лактозу, глюкозу и галактозу идентифицировали спектрофотометрически с применением ферментативных китов [3].

В работе использовали лактозу отечественного производства и О-нитрофенил-бета-Д-галактопиранозид (ONPG) фирмы "SERVA".

Результаты и обсуждение. С целью выявления наиболее перспективных термофильных продуцентов бета-галактозидазы были исследованы экстремофильные формы бацилл.

Для ферментов отобранных культур были определены некоторые физико-химические и биологические параметры.

Клетки обеих культур свою максимальную активность проявляли при pH 7,0, отклонение от которого приводит к значительному падению их эффективности. Так, уже при pH 6,5 они имеют всего 77-80 %, а pH 7,5 - 65-70% максимальной активности (табл.1).

Таблица 1. Влияние pH на бета-галактозидазную активность клеток бацилл (смесь 20 мг биомассы и 10 мг лактозы в 1 мл 0,01 М соответствующего буфера, инкубировали при 50° в течение 60 мин)

pH	Активность, ед/мин		Активность, % от максимальной	
	шт. K ₁	шт. K ₂	шт. K ₁	шт. K ₂
5,0	59,0	153,0	16,0	45,0
6,0	117,0	197,0	29,0	58,0
6,5	300,0	272,0	77,0	80,0
7,0	390,0	340,0	100,0	100,0
7,5	273,0	221,0	70,0	65,0
8,0	97,5	153,0	25,0	45,0

Аналогичные результаты были получены также при исследовании pH стабильности клеток. Достаточную стабильность они проявляют в интервале pH от 5,0 до 8,0 (табл.2).

Таблица 2. pH стабильность интактных клеток Bacillus sp. K₁ и K₂ (обработку клеток проводили при 70° в течение 30 мин)

Время экспози- ции, мин	Остаточная бета- галактозидазная активность, %									
	pH 5,0		6,0		6,5		7,0		8,0	
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
0	16	45	29	58	77	80	100	100	25	45
20	10	21	16	17	51	28	70	40	19	33
40	9 ^c	16	13	15	46	24	64	35	14	24
60	0	3	10	12	36	20	54	30	6	16

Изучаемые культуры наиболее эффективно способны работать при 70° (табл.3), однако высокая стабильность наблюдается лишь при температурах до 60° (табл.4).

Таблица 3. Влияние температуры на бета-галактозидазную активность термофильных культур (смесь 20 мг биомассы и 10 мг лактазы в 1 мл 0,01 М фосфатного буфера. рН 7,0, инкубировали в течение 60 мин)

Температура °C	Активность, % от максимальной	
	K ₁	K ₂
45	20	
50	39	55
55	55	70
60	66	80
65	85	92
70	100	100
75	80	95
80	60	90

Таблица 4. Термостабильность интактных клеток с бета-галактозидазной активностью (клетки в 0,01 М фосфатном буфере. рН 7,0, выдержка в течение 180 мин)

Время экспози- ции, мин	Остаточная бета-галактозидазная активность, %									
	40°		50°		60°		70°		80°	
	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂	K ₁	K ₂
0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
60	64	66	58	56	54	50	50	35	42	20
120	55	48	48	40	41	34	32	23	22	14
180	44	39	36	33	32	28	23	19	14	10

Для изучения влияния различных двухвалентных ионов металлов на бета-галактозидазную активность клетки в количестве 20 мг суспендировали в 2 мл дистиллированной воды, содержащей 0,5-1,0 мМ иона металла, и суспензию выдерживали при 50° в течение 30 мин. Затем клетки отделяли центрифугированием и их бета-галактозидазную активность определяли в оптимальных условиях. Среди исследованных ионов только Mn^{+2} оказывал слабое защитное влияние на специфическую активность, в то время как остальные

проявляли ингибирующий эффект в различной степени. Особенно нежелательно присутствие в реакционной смеси ионов Zn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} и Co^{+2} (табл. 5).

Значение K_m , определенное в координатах Лайнуивера-Берка составляло 82,6 и 118,2 мМ/мл (по лактозе), а V_{max} 0,04 и 0,05 мМ/мин соответственно для штаммов K1 и K2.

Таблица 5. Влияние ионов двухвалентных металлов на бета-галактозидазную активность клеток

Добавки	Концентрация, мМ	Активность, % от максимальной	
		K1	K2
Fe^{+2}	1,0	100	100
Mn^{+2}	1,0	110	116
Ca^{+2}	1,0	90	104
Mg^{+2}	1,0	82	92
Zn^{+2}	1,0	55	60
Fe^{+3}	0,5	60	52
Cu^{+2}	0,5	48	44
Co^{+2}	0,5	63	68
Ba^{+2}	0,5	72	76

Выявленные параметры в сравнении с известными термостабильными бета-галактозидазами суммированы в табл. 6.

Таблица 6. Сравнительная характеристика термостабильных бета-галактозидаз

Источник фермента	Оптимум		Термостабильность, °C	K_m , мМ	Ссылка
	pH	t, °C			
<i>Bacillus acidocaldarius</i>	6,0	65-70	50	100-120	[9]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	6,0	60	60	110	[6]
<i>Cardanella acidophila</i>	5,0	80	70	61,5	[4]
<i>Altermana alternata</i>	4,5-5,5	60-70	65		[10]
<i>Altermana palni</i>	5,5-6,0	70	65		[13]
<i>Thermus aquaticus</i>	5,0	80	90	7,5	[16]
<i>Bacillus</i> sp. K1 (клетки)	7,0	70	60	82,6	
<i>Bacillus</i> sp. K2 (клетки)	7,0	70	60	118,2	

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нахапетян П.А., Мотина Л.И. Биотехнология, 4, 1, 4-21, 1988
2. Энтеробактерии. Под ред. В.И. Похровского. М. 1985.
3. Bergmeyer H.U., Ber. I.E., Schmidt F., Stenil H. Methods of enzymatic analysis. NY AP 3 1195-1201, 1974
4. Buonocore V., Sgambati O., Rosa M., Esposito E., Cambacorta A. J. Appl. Biochem., 2, №0-394, 1980
5. Dubois M., Gills R., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F. Anal. Chem., 28, 350-354, 1959
6. Griffiths M.W., Muir D.D. J. Sci. Food Agric., 29, 753-757, 1978
7. Honda Y., Haseba H., Aihiko K., Takahashi H. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 38, 324-330, 1991
8. Kobayashi T., Hirose Y., Ohnura K., Saito S., Uchino F. J. Ferment. Technol., 55, 309-312, 1976
9. Kohkay D.E., Gheryan M. Enzyme Microb. Technol., 2, 64-68, 1981.
10. Macris E.J. Ann. Environ. Microbiol., 44, 1035-1040, 1982
11. Melton N.J. Biol. Chem. 153, 376-380, 1944
12. Oksa E.S., Harper W.J. J. Food Sci., 49, 28-102, 1974
13. Sanjay A., Sonawar H.M., Datta S.M. J. Dairy Sci., 65, 866-870, 1982
14. Somogyi M.J. Biol. Chem. 170, 19-21, 1952
15. Toba T. J. of Dairy and Food Sci., 24, 165-187, 1985.
16. Ulrich J.T., McFeters G.A., Temple K.L. J. Bacteriol., 170, 691-694, 1972

Поступила 22.IX.1994

Биолог. журн. Армения, 1, (48), 1995

УДК 576.251.5:577.15.01

АСПАРТАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ТЕРМОФИЛЬНЫХ БАЦИЛЛ И АКТИНОМИЦЕТОВ

С.Н. БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Приведены данные о распространении аспартазы среды 10 видов термофильных бацилл и 5 видов термоактиномицетов. Выявлены новые активные продуценты аспартазы, которые могут быть использованы при ферментативно-микробиологическом получении L-аспарагиновой кислоты из фумарата аммония.

Ներկայում են ապարտազային ակտիվությունը բացահայտելու 10 տեսակի տերմոֆիլիկ բացիլների և 5 տեսակի տերմոակտինոմիցետների մասին: Հայտնաբերվել են ակտիվ ապարտազային հոր արտադրիչներ, որոնք կարող են օգտագործվել L-ասպարազինաթթվի ֆերմենտատիվ-մանրէաբանական ստացման նպատակով:

The data on distribution of aspartase in 10 species thermophilic bacilli and 5 species thermoactinomycetes are given.

The new active producers of aspartase which may be used for enzymatic microbiological production of L-aspartic acid from ammonium fumarate have been revealed.

В настоящее время в ряде стран культуры микробов-продуцентов аспартазы используются для получения L-аспарагиновой кислоты из фумаровой [5-8].

В Институте микробиологии НАН Армении ранее проведены исследования по изысканию новых продуцентов аспартазы (аспа) [1-4]. Данное сообщение посвящено обобщению результатов исследований по выявлению аспартазы у экстремофильных форм аэробных спорообразующих бактерий и актиномицетов.

Материал и методика. Объектами исследований явились оригинальные культуры термофильных бацилл, выделенные нами из почв и разнообразных природных субстратов, а также 20 штаммов термофильных актиномицетов, выделенных из различных почв, экскрементов тропических животных, грунтовых вод и ила термальных источников.

Аспартазная активность (аспартат-аммиак-лиаза, КФ 4. 3. 1. 1.) определялась качественно, обнаружением положительной реакции L-аспарагиновой кислоты с нингидрином после одночасовой инкубации в реакционной смеси (1 мМ раствор фумарата аммония, pH 8,5; 1 мк моль Mg^{++}). При количественном определении 10-20 мг биомассы суспендировали в 1 мл реакционной смеси и инкубировали при 55° в течение 60 мин. Далее суспензию центрифугировали при 4 000-5 000 об/мин и методом тонкослойной хроматографии определяли количество L-аспарагиновой кислоты. Высушенные пластинки проявляли нингидрином, пятна элюировали 2 мл 60 %-ного раствора этанола и 1 мл 0.1 %-ного водного раствора $CdCl_2$. Экстинкцию определяли при 500 нм.

Результаты и обсуждение. Большинство изученных видов термофильных бацилл характеризуется наличием аспартазы (табл.1).

Таблица 1. Сравнительная характеристика аспартазной активности некоторых видов термофильных бацилл

Виды и группы термофильных бацилл	Число испытанных штаммов	Число штаммов с аспартазной активностью	
		слабой	сильной
<i>Bacillus sp.</i>	15	1	5
<i>B. circulans</i>	7	1	1
<i>B. licheniformis</i>	25	7	5
<i>B. megaterium</i>	1	0	0
<i>B. subtilis</i>	2	0	0
<i>B. cereus</i>	7	1	2
<i>B. firmus</i>	3	1	0
<i>B. coagulans</i>	1	1	0
<i>B. pasteurii</i>	1	0	0
<i>B. epiphilus</i>	2	0	0

Наибольшее распространение аспаразы отмечается у термофильных видов *B. licheniformis*, *B. cereus* и *Bacillus sp*. Единичные продуценты аспаразы обнаружены среди культур *B. circulans*, *B. firmus* и *B. coagulans*. Среди изученных термофильных бацилл, представленных видами *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. macerans* и *B. arphidius*, не было отмечено наличия аспаразной активности.

Отсутствием аспаразы характеризуются представители *Thermomonospora*, а среди *Thermoactinomyces* обнаружен один продуцент аспаразы *Thermoactinomyces dichotomicus*, штамм с активностью 1000 мкмоль/час на г сырой биомассы.

Таблица 2. Аспаразная активность термофильных бацилл

Виды бацилл	Рабочие омера штаммов	Активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
<i>Bacillus sp.</i>	283	9600
	286	9000
	331	11400
	347	12600
	218	3000
	305	7800
<i>B. circulans</i>	370	11400
	200	3000
<i>B. licheniformis</i>	083	10800
	062	10200
	291	6000
	322	11400
	325	9000
	327	5000
	204	3600
	207	2400
	220	2400
	231	8400
	181	3000
	185	3000
<i>B. cereus</i>	152	12600
	162	9000
	165	6000
<i>B. firmus</i>	158	9000
<i>B. coagulans</i>	404	2400

Факт обнаружения продуцентов целых ферментов среди экстремофильных, особенно термофильных, форм микроорганизмов как наиболее перспективных для промышленной реализации имеет

большой практический интерес. В этой связи нами проведена специальная серия исследований по количественной характеристике аспартазной активности у наиболее перспективных термофильных бацилл (табл.2). Максимальная ферментативная активность - 12 600 мкмоль/час/г сырой биомассы-отмечена у штаммов *Bacillus* sp. 347 и *B.cereus* 152. Сравнительно высокая активность аспартазы (в пределах 6 000-12 000) обнаружена у 17 термофильных бацилл, представленных видами *B.licheniformis*, *B.circulans*, *B.cereus* и *Bacillus* sp. Среди культур *B.licheniformis* и *Bacillus* sp., продуцирующих аспартазу большинство штаммов обладали высокой аспартазной активностью.

В результате проведенных исследований установлено, что термофильные бациллы, представленные многими видами микроорганизмов, заслуживают особого внимания как источник получения и применения разнообразных ферментов, в первую очередь аспартазы, а некоторые из них в качестве активных продуцентов могут быть рекомендованы для производства L - аспарагиновой кислоты из фумаровой методом биотрансформации.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) - RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС - 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абеян В.А., Антонян А.П., Багдасарян С.Н., Хачатурян А.А., Ладрикан Э.Г. Авт.свид 1441785 1 8 1988.
2. Абеян В.А., Получение и применение иммобилизованных ферментов и клеток микроорганизмов, Ереван, 1989
3. Авакян Э.Г., Багдасарян С.Н. Биолог. журн. Армении, 31, 995-997, 1978
4. Багдасарян С.Н., Абеян В.А. Авт.свид 1515694 15 6 1983
5. Chibata J. Immobilized enzymes, Tokyo, Koanasha, N.-Y., John Wiley & Sons, 1973.
6. Kakimoto T, Kato Y, Shibasaki T et al. J. Biol. Chem., 244, 353-358, 1969
7. Takamatsu S, Yamamoto K, Tosa T. et al. J. Ferment. Technol., 59, 489-493, 1981
8. Tosa T., Salo T., Mori T. et al. Appl. Microbiol., 27, 886-889, 1974

Получила 05 IX 1994

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ СОХРАНЕНИЯ
МАТЕРИАЛЬНЫХ ПРОДУЦЕНТОВ АСПАРТАЗЫ И АСПАРТАТ-
БЕТА-ДЕКАРБОКСИЛАЗЫ

С.Н. БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510 г. Абовян

На материале 4 штаммов-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы разработаны эффективные методы длительной консервации и условий репродукции, обеспечивающие высокую жизнеспособность и специфическую ферментативную активность штаммов. Установлена значительная вариабильность как жизнеспособности так и ферментативной активности клеток-продуцентов в зависимости от используемых методов хранения, консервации и реактивации.

Наиболее эффективным способом длительной консервации штаммов с поддержанием их исходной активности является хранение в жидком азоте. Продуценты из разных групп бактерий требуют специфических условий хранения и консервации.

Ասպարտազի և ասպարտատ-բեթա-դեկարբոքսիլազի օրնակալի մեթոդ 4 շտամների վրա հիմնված են երկարամյա պահպանման և վերականգնված ի սկզբնական ակտիվությամբ, արդյունավետ են շտամների բարձր կենսական արդյունք և ֆերմենտատիվ ֆերմենտացիոն ակտիվությունը:

Հարմարությամբ է ինչպես կենսոսմունքային, այնպես էլ ֆերմենտատիվ և ասպարտատ-բեթա-դեկարբոքսիլազ արտադրման բնական շտամային տարբերության փոփոխությունը պահպանել օգտագործված պահպանման, կենսական և ֆերմենտատիվ մեթոդներով:

Շտամների երկարամյա պահպանման և նախապես ակտիվության ապահովման համար արդյունավետ է կամպոզիտ կենսական ֆերմենտացիոն:

Տարբեր բակտերիալ խմբերի արտադրված պահպանում են պահպանման և վերականգնման լուրջապես պահանջներ:

The efficient methods for long-term conservation and reproduction of non-amine-producers of aspartase and aspartate-beta-decarboxylase activity have been worked out.

The variability of enzymatic activity of the cells-producers of aspartase and aspartate-beta-decarboxylase depends on the methods of keeping, conservation and reactivations.

The liquid nitrogen is the effective method of conservation for maintenance of the initial activity of the strains.

The producers from different group of bacteria need the special environments of the conservation.

Микроорганизмы - хранение и консервация штаммов

Методы микробиологического катализа и трансформации получили широкое распространение для получения разнообразных биологических соединений, в том числе оптически активных аминокислот [7-10]. В ряде стран организовано промышленное производство L-аспарагиновой кислоты и L-аланина с использованием

аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы [1-5]. Вместе с тем методы хранения и репродукции штаммов продуцентов указанных ферментов изучены недостаточно.

Нами разработана оптимальная питательная среда для выращивания и сохранения высокой ферментативной активности культур-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы [6].

Настоящая работа имела целью выполнение эффективных методов хранения, длительной консервации и репродукции, обеспечивающих высокую жизнеспособность и специфическую ферментативную активность клеток-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы.

Материал и методика. Объектами исследований явились активные продуценты аспартазы - *Erwinia amylovora* шт. ИММИА В-785 и термофильный штамм *Bacillus subtilis* эсп. шт. ИММИА В-4011, а также аспартат-бета-декарбоксилазы - *Acetivibrio faecalis* шт. ИММИА В-5232 и *Pseudomonas* эсп. шт. ИММИА В-1455.

Культуры мезофильных организмов поддерживались на мясопептонном (МП) и рыбном (РП) агарах при 26-30°, а термофильный штамм - при 56°. Для индукции аспартазы в среду добавляли 0,5% фумаровой кислоты, а аспартат-бета-декарбоксилазы - аналогичное количество L-аспарагиновой кислоты.

Аспартазную активность (аспартат-аминотрансфераза, КФ 4.3.1.1) определяли согласно известному методу [10], аспартат-бета-декарбоксилазную активность (L-аспартат-4-карбоксилаза, КФ 4.1.1.12) - по способу [9].

Сохранение жизнеспособности продуцентов и их ферментативной активности изучали в условиях хранения в виде косячков, залитых вазелиновым маслом, с последующим их хранением при +8+10°. Для хранения культур-продуцентов использовали также 30 и 60%-ный глицерин. Помещенная в стерильные полиэтилиновые флаконы сырая биомасса культур заливалась по 8-10 мл 30 и 60%-ным раствором глицерина (на 2/3 объема). Флаконы хранились в холодильнике при -10°.

В работе применяли хранение штаммов в почве, замороженной 0,1 мл бактериальной суспензии клеток с определенным титром. После инкубации в течение 1-2 суток при 30° они хранились при сухой комнатной температуре.

Для консервации клеток в жидком азоте использовали биомассу 48-часовых культур, суспендированных в *Mist dehydrans* (бычья кровь - 60 мл, МПБ-20 мл и глюкоза-15 мл 40%-ного раствора). В стерильные молибденовые шпиглы вносили по 0,15 мл суспензии с определенным титром. Быстро загнанные шпиглы после постепенного их охлаждения (с режимом 1-2° в течение 1 мин) погружали в жидкий азот, где обезживались температуре -196°. Репродукцию культур из жидкого азота проводили погружением шпигла в водную баню при 37°.

Примечалась консервация в лиофильно высушенном состоянии, и в качестве защитной среды использовали среду *Mist dehydrans*. Чистоту культур до консервации контролировали методикой рассева на агаритованной питательной среде для выращивания продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы, разработанной нами [6], а также прямым микроскопированием с использованием фазового контраста.

Репродукцию жизнеспособности и реактивацию ферментативной активности осуществляли с использованием физиологического раствора и соответствующих реакционных сред. Срок наблюдений - 3 года.

Результаты и обсуждения. Проведенные ранее исследования показали, что изученные штаммы бактерий-продуцентов аспартазы и аспартат-бета-декарбоксилазы в процессе хранения и пересевов в значительной степени теряют исходную активность. Данные, обобщенные в табл., показывают, что хранение клеток-продуцентов в виде коагюлята, залитых вазелиновым маслом, допустимо для *E. aroides* до 2 лет без значительной потери исходной активности. Сравнительно высокая активность отмечается у клеток *B. subtilis* ssp. и *A. faecalis* - от 78 до 71% от исходной при незначительной потере жизнеспособности до 3 лет. Штамм *Pseudomonas* sp. под вазелиновым маслом сохраняет неплохую жизнеспособность и активность в течение 3 лет.

Максимальный срок хранения клеток *E. aroides* и *Pseudomonas* sp. в растворе глицерина - 2 года. Через 2 года хранения как в 30% - ном, так и в 60%-ном глицерине не удалось обнаружить жизнеспособные клетки. Высокая активность (72%) обнаружена у клеток *E. aroides* при хранении в 60%-ном глицерине в течение 1 года.

Для клеток *Pseudomonas* отмечается потеря активности до 26% при хранении в 30%-ном и до 14% в 60%-ном глицерине. Установлены сохранение высокой жизнеспособности клеток *B. subtilis* в глицерине до 3 лет и значительное повышение активности (30-35%) спустя 1 год хранения в 30 - и 60%-ном глицерине.

Максимальный срок сохранения жизнеспособности для клеток *E. aroides* и *Pseudomonas* в почве составляет полтора года с потерей исходной активности соответственно на 1/4 и 2/3. При указанном методе консервации отмечается сохранение высокой жизнеспособности - 80% и ферментативной активности - 85% клеток *B. subtilis* до 3 лет хранения. У клеток *A. faecalis* установлена быстрая потеря жизнеспособности до 14-18% к трем годам хранения при сравнительно высокой и стабильной активности - 78% от исходной. Хранение клеток *A. faecalis* в лиофильно высушенном состоянии в течение года обеспечивает удовлетворительные показатели жизнеспособности и ферментативной активности. Максимальная жизнеспособность сохраняется у клеток *B. subtilis* в течение 3 лет хранения при активности 90% от исходной. Клетки *A. faecalis* и *Pseudomonas* сохраняли удовлетворительную жизнеспособность, но со значительной потерей исходной активности.

Таблица. Сохранение жизнеспособности и ферментативной активности при консервации продуцентов аспартазы (аспа) и аспарта-бета-декарбоксилазы (аспда)

Штаммы бактерий	Условия хранения и консервации	Жизнеспособность спустя годы		Ферментативная активность % от исход. спустя годы	
		1	3	1	3
<i>E. aroides</i> шт. ИНМИА 785	Периодические пересевы МПА +5+80	++++	++++	аспа 100	80
	РПС*, под вазелиновым маслом	+++	-	47	-
	Mist dessicans				
	жидкий азот, -1960	+++	+++	40	39
	Mist dessicans, лиофильная сушка +18+200	+++	-	45	-
	Почва +18+200	++	-	75	-
<i>A. faecalis</i> шт. ИНМИА	Глицерин 30-60%-ный, -10-150	++/++	-/-	58/72	-/-
	Периодические пересевы, +5+80	++++	++++	аспда 100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	+++	+	75	71
	Mist dessicans, жидкий азот -1960	+++	+++	164	139
	Mist dessicans, лиофильная сушка, +18+200	++	++	33	29
	Почва +18+200	- +	-	131	78
<i>Pseudomonas sp</i> шт. ИНМИА 1455	Глицерин 30-60%-ный, -10-150	+++ / +++	+++ / +++	32/35	31/29
	Периодические пересевы, +5+80	++++	++++	аспа 100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	+++	++	53	55
	Mist dessicans, жидкий азот, -1960	+++	+++	52	55
	Mist dessicans, лиофильная сушка +18+200	++	++	38	32
	Почва +18+200	+	-	42	-
<i>B. subtilis ssp</i> шт. ИНМИА 4011	Глицерин 30-60%-ный, -10-150	+++ / ++	- / -	26/14	+
	Периодические пересевы, +5+80	++++	++++	аспа 100	80
	РПС, под вазелиновым маслом	++++	+++	80	78
	Mist dessicans, жидкий азот, -1960	++++	+++	183	163
	Mist dessicans, лиофильная сушка +18+200	++++	++++	93	75
	Почва +18+200	++++	+++	114	85
	Глицерин 30-60%-ный, -10-150	+++ / ++	+++ / ++	30/35	68/68

*РПС-специальная среда для хранения и реактивации продуцентов [6].

По нашим наблюдениям, хранение клеток-продуцентов в виде косячков, залитых вазелиновым маслом, допустимо для *E. aroides* до 2 лет без значительной потери активности. Относительно высокую активность отмечали у клеток *B. subtilis* и *A. faecalis*-78 и 71% от

исходной - при незначительной потере жизнеспособности до 3 лет хранения под вазелиновым маслом.

Универсальным методом длительной консервации является хранение в жидком азоте. Клетки испытанных культур-продуцентов, представленных видами *E. arordea*, *A. faecalis* и *Pseudomonas*, сохраняли 70%, а *B. subtilis* - 90% жизнеспособности в течение 3 лет хранения. Однако сохранение высокой жизнеспособности клеток *E. arordea* и *Pseudomonas* не коррелировало с поддержанием высокой ферментативной активности: у клеток *E. arordea* она составляла 38%, у *Pseudomonas* - 55% от исходной активности.

При хранении культур *B. subtilis* и *A. faecalis* в жидком азоте в течение 3 лет наблюдали повышение активности на 83 и 39% соответственно.

Результаты проведенных исследований дают основание рекомендовать для практической реализации метод хранения культур *B. subtilis* ssp. и *A. faecalis* в жидком азоте, который обеспечивает высокую жизнеспособность и значительное повышение исходной ферментативной активности до 3 лет хранения. Хранение указанных культур под вазелиновым маслом до 2 лет может быть рекомендовано как сравнительно легкий метод консервации, обеспечивающий хорошие показатели жизнеспособности и активности.

Для поддержания высокой ферментативной активности *E. arordea* может быть рекомендовано хранение в почве и 60%-ном глицерине до 2 лет.

Для бактерий *Pseudomonas* отмечали понижение исходной ферментативной активности при всех использованных методах хранения. Наиболее приемлемым методом длительного сохранения ферментативной активности является консервация клеток в жидком азоте.

Данная работа частично финансировалась грантами МНФ (Сороса) RY1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Абеян В.А., Антонян А.П., Багдасарян С.Н., Хачатурян А.А., Африкян Э.Г. Авт. свид. N1441785 1.8.1988.
2. Абеян В.А., Багдасарян С.Н. Авт. свид. N1529727 15.8.1989.
3. Абеян В.А., Багдасарян С.Н., Африкян Э.Г. Биохимия, 56, 1288-1295, 1991.
4. Абеян В.А., Меликсетян В.С., Африкян Э.Г. Авт. свид. N1324294 8.9.1987.
5. Авакян З.И., Багдасарян С.Н. Биол. журн. Армении, 31, 995-997, 1978.
6. Багдасарян С.Н., Абеян В.А. Авт. свид. N1515594 15.6.1989.

- 7 Chibata J Immobilized enzyme Tokyo, Koanasha, N.-Y. John Wiley . . . 1973.
8. Kakimoto T., Kato Y., Shibetani T. et al. J. Biol. Chem., 244, 353-358, 1969
- 9 Takamatsu S., Yamamoto K., Tosa T. et al. J. Ferment Technol. 59, 489-403, 1981
10. Tosa T., Sato T., Mori T. et al. Appl Microbiol., 27, 886-889, 1974

Поступила 05. IX 1994

Биолог. журн. Армении, 1 (48), 1995 г.

УДК 579.22:577.154

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ИНУЛИНАЗ У МИКРОСКОПИЧЕСКИХ ГРИБОВ

Л.А.ПИВАЗЯН, С.А.ДАВТЯН, Н.С.ХАЧАТУРЯН, Р.Н.ХАЧАТУРЯН, А.М.БАЛАЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Из инфицированных клубней топинамбура выделена и идентифицирована 21 культура грибов, 13 из которых обладали инулиназной активностью. Изучено усвоение различных источников углеродного питания. Установлено, что большинство из них хорошо усваивают инулин. Отобраны 3 активных продуцента инулиназ и определены оптимальные значения их ферментативной активности. У этих штаммов максимальная инулиназная активность проявляется при 50°. Оптимум pH у штаммов T-6 и T-1 равен 5, у T-18 - 7,0.

Գետնախնձորի վարակված պարսյաններից մեկուսացված և իդենտիֆիկացված են սնկերի 21 կուլտուրաներ, որոնցից 13-ը օժտված են ինուլինազային ակտիվությամբ: Որոշված է, որ նրանց մեծ մասը լավ յուրացնում են ինուլինը և ֆրուկտոզը: Ոճարված են ինուլինազների 3 ակտիվ արտադրիչներ և որոշված են նրանց ֆերմենտատիվ ակտիվության օպտիմալ նշանակությունները:

3 շտամների մոտ մասշտաբ ինուլինազային ակտիվությունը դրսևորվում է 50°-ում: pH-ի օպտիմումը T-6 և T-1 շտամների մոտ հավասար է 5-ի, իսկ T-18-ի - 7:

The 21 cultures of fungi were isolated and identified from the infected tubers of topinambur, among which 13 cultures have possessed the inulinase activity. The assimilation of inulin and fructose by the most cultures studied was revealed. Three active inulinase-producers were selected and the optimal values of enzymatic activity were determined.

The maximal inulinase of these strains was appeared at 50°. The optimal pH for strain T-6 and T-1 is 5, for T-18 is 7.

Грибы микроскопические - инулиназа - инулин - топинамбур.

Инулиназы, или инулингидролазы - ферменты, специфически гидролизующие бета -1,2-связи инулина [3]. Культуры-продуценты выделяются в основном из почв или скринингом среди коллекционных культур [5,7].

Целью настоящего исследования было выделение и изучение микроскопических грибов-продуцентов инулиназ из инфицированных клубней топинамбура.

Материал и методика. Объектами исследований явились культуры грибов, выделенных из инфицированных клубней топинамбура сорта "Интерес-2" урожая весны 1993г. из Аштаракского района. Выделение грибов проводили методом накопительных культур. Части клубней помещали в колбы Эрленмейера с 50 мл воды и инкубировали на качалке 2 ч при 28°. После 24-часовой выдержки в комнатных условиях делали высев на чашки Петри по средой Чапека следующего состава (г/л): NaNO_3 -2,0; KH_2PO_4 -1,0; KCl - 0,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5; FeSO_4 -следы; сахара - 30,0; агар-агар - 20,0; pH до стерилизации 6,0-6,5; стерилизация 15 мин при 1,0 атм. Выделенные и очищенные культуры хранили на агаризованной среде того же состава.

Инулиназную активность определяли в реакционной смеси, содержащей 1 мл культуральной жидкости (кж) и 1 мл 2,5 % -ного раствора инулина в 0,1 М ацетатном буфере с pH 4,7 при 50°. За единицу активности принимали количество фермента, образующее 1 мкмоль фруктозы за 1 мин в условиях опыта.

Количество редуцирующих сахаров определяли методом Сомоджи-Нельсона [4]. Идентификацию грибов проводили на основании комплекса культуральных и морфологических признаков по известным определителям [1,2,3].

Результаты и обсуждение. Из клубней топинамбура выделен 21 штамм грибов. Грибы отнесены к видам *Aspergillus niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. flavus*, *Penicillium palitans*, *P. cyclopium*, *Fusarium heterosporum*, *F. gibbosum*, *Chaetomium waltkei*, *F. javanicum*, *Mucor racemosus*, *Rhizopus glizae*, *Mucorales* sp. Большинство изученных видов и родов описано ранее как продуценты инулиназ [9]. Однако в описаниях продуцентов не встречались такие, как *P. palitans*, *P. cyclopium*, *A. terreus*, *F. heterosporum*, *Mucorales* sp.

Полученные результаты показали, что культуры грибов в качестве источников углерода в той или иной степени используют все классы углеводов. По интенсивности использования сахаров на первом месте стоят глюкоза и фруктоза. Большинство культур хорошо растут на раффинозе и малезитозе. На усваиваются многими культурами сорбоза, рамноза, лактоза, дульцит, маннит. Салицин используется только культурой *Aspergillus niger* шт. Т-6. Этот штамм использует также винную, молочную, фумаровую кислоты. Инулин усваивается большинством выделенных культур.

Внеклеточную инулиназную активность культур изучали в динамике в течение 12 суток роста на жидкой среде Чапека. В качестве источника сахара были использованы по 0,5% сахарозы и инулина. Результаты исследований, представленные в табл. 1, показывают, что на среде с сахарозой у большинства штаммов

инулиназная активность или очень слабая или не проявляется. Многими исследователями показано неоднозначное влияние источников углерода на проявление инулиназной активности. Так, для *Kluyveromyces fragilis (marxianus)* наиболее низкий уровень продуцирования инулиназы получен на сахарозе, по сравнению с инулином, сорбитом, раффинозой, фруктозой [6]. Ровенхорст с соавт. [7] для *K. marxianus* CBS 6556 показали, что на среде с фруктозой, которая является первейшим индуктором инулиназы [6], культуры образуют вдвое меньше инулиназы, чем на среде с сахарозой.

Таблица 1. Динамика проявления инулиназной активности культур (инкубация на среде Чапека, 28°C, культивирования на кашежке).

Виды и штаммы	Инулиназная активность, ед/мл ж. спустя (сутки)							
	с 0,5% инулина				с 0,5% сахарозой			
	3	5	7	10	3	5	7	10
<i>Penicillium politanus</i> T-1	1,0	1,8	1,2	1,0	0	0	0,03	0
<i>P. cyclopium</i> T-18	0,8	1,2	0,9	0,9	0	0	0	0
<i>Penicillium</i> sp. T-12-1	0	0,3	0,5	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> T-4(1)	0	0,04	0,08	0	0	0	0	0
<i>A. flavus</i> T-7	0,01	0,04	0,3	0	0,04	0,04	0,04	0,01
<i>A. terreus</i> T-20	0,12	0,6	0,6	0,08	0	0	0	0
<i>A. niger</i> T-6	0,2	0,9	1,15	1,12	0	0	0,02	0,3
<i>Fusarium heterosporum</i> T-10	0,04	0,04	0,04	0,23	0,09	0,01	0,01	0
<i>Fusarium</i> sp. T-16	0,2	0,33	0,26	0,15	0	0	0	0
<i>Mucorales</i> sp. T-11	0	0,23	0,18	0	0	0	0	0

Следует отметить, что характер роста, спорообразование, накопление биомассы на обеих средах у большинства изученных нами культур идентичны. Различия в проявлении инулиназной активности на средах с инулином и сахарозой носит скорее штаммовый характер, чем видовой. Так, у *F. heterosporum* T-10 сравнимые показатели инулиназной активности на обеих средах, а *Fusarium* sp. T-16 при сравнимой с предыдущим штаммом активности на среде с инулином на среде с сахарозой таковую не проявляет. Таковы же результаты в вариантах с *A. flavus* T-4(1) и *A. flavus* T-7.

Из 21 выделенной из топинамбура культуры грибов 13 обладали инулиназной активностью, что говорит о целесообразности отбора продуцентов из инфицированных клубней топинамбура.

Инулиназная активность на среде с инулином у многих штаммов независимо от вида и рода грибов, проявляется в различные сроки роста. Так у ряда штаммов (*P. raikans* T-1, *P. cyclopium* T-18, *A. niger* T-6) уже на 3-и сутки роста отмечается инулиназная активность. Начальная активность сохраняется на достаточно высоком уровне и на 12 сутки, когда завершена стационарная фаза роста.

Неактивны или незначительно активны как штаммы *Rhizopus*, *F. gibbosum*, *Chaetomium waltkei*.

Более подробно изучены 3 активных продуцента инулиназы - *Aspergillus niger* T-6, *Penicillium raikans* T-1, *P. cyclopium* T-18 на первоначальном уровне сохранившие инулиназную активность после года хранения.

Исследовано влияние температуры и реакции среды на инулиназную активность отобранных штаммов (табл.2,3).

Таблица 2. Влияние температуры на инулиназную активность культур грибов (субстрат - 1% инулина в 0,1 М ацетатном буфере - pH 4,7)

Температура, °C	Относительная активность, %		
	<i>P. raikans</i> шт T-1	<i>P. cyclopium</i> шт T-18	<i>A. niger</i> шт. T-6
30	50,3	36,4	28,2
40	70	90	62
50	100	100	100
60	86	77	97
70	25,6	23	3,4
80	20	0	1,25

Оптимум температуры для 3 видов - 50°. Но достаточно высокий уровень активности сохраняется и при 60°, уменьшаясь при этом на 3,0; 14,0 и 23,0%, соответственно для штаммов T-6, T-18 и T-1.

Если изменение температуры оказывает почти эканомное действие на инулиназную активность испытанных культур, то влияние pH не носит такого характера. Оптимум pH одинаков и равен 5,0 у штаммов T-6 и T-1 *Aspergillus* и *Penicillium*, а у штаммов T-1 и T-18 рода *Penicillium* разница в оптимуме pH составляет 2 единицы. *P. raikans* T-1 проявляет активность в пределах pH от нейтрального к кислому, а *P. cyclopium* от нейтрального к щелочному. *A. niger* T-6 проявляет активность в более широких пределах pH.

Таблица 3. Влияние pH реакционной смеси на инулиназу активность (субстрат-1% инулин, 500; pH 3-5, 0,1М ацетатный буфер, pH 6-8-1/15М, фосфатный буфер, pH 9 - 0,2 М NaOH - лициновый буфер)

pH	Относительная активность, %		
	<i>P. palitans</i> шт.Т-1	<i>P. cyclopium</i> шт.Т-18	<i>A. niger</i> шт.Т-6
3	42,4	8,7	26
4	42,4	8,7	90
5	100	43,6	100
6	68	70	70
7	54,5	100	56
8	40	60	0,8
9	-	28	-

Работа частично финансировалась грантами МНФ (Сорос) RY1000 и Ассоциации ИИТАС ЕС 93-3512 .

ЛИТЕРАТУРА

1. Билэй В.И., Коваль Э.З. Аспергиллы (определитель). К., 1988
2. Коваль Э.З. Определитель энтомопатогенных грибов СССР. Киев, 1974.
3. Наумов Н.А. Фитопатология. М.-П., 1935.
4. Рухлядева А.П., Полягакина Г.В. Методы определения гидролитических ферментов. М., 1981.
5. Fuhla K., Kovchaga, Hashimoto H., Khahata S. Agric. Biol. Chem. (Japan), 54, 4, 913-919, 1980
6. Groot Wassink I.W.D. Hawill G.H. J. gen. Microbiol., 29, 31-41, 1983.
7. Rouwenhorst R.J., Visser L.E., Van der Vann A.A., Shellois W.A., J.P. Van Ducken, Appl. Environ. Microbiol., 5, 1131-1147, 1983.
8. Snyder H.E., Phaff H.J. J. Biol. Chem., 237, 2438-2441, 1962.
9. Vandamme E.J., Derycke D.G. Adv. appl. Microbiol., 29, 139-176, 1983.

Поступила 2.X.1994

АСПОРОГЕННЫЙ ШТАММ БАЦИЛЛА - ПРОДУЦЕНТ ИНУЛИНАЗЫ

З.Г.АВАКЯН, Н.А.АЙВАЗЯН, Э.К.АФРИКЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Получен аспорогенный мутант культуры *Bacillus licheniformis* с высокой инулиназной активностью 4500 ед/г клеток, что в 10 раз превышает активность исходного штамма. Изучены физиолого-биохимические особенности мутанта и условия биосинтеза фермента инулиназы.

Ստացված է *Bacillus licheniformis*-ի բարձր ինուլինազային ակտիվությամբ (4500 մ/գ բջիջ) ապոսպորացն մուտանտ, որը սկզբնական շառնի ակտիվությունը գերազանցում է 10 անգամ: Ուսումնասիրված են մուտանտի ֆիզիոլոգիա-բիոքիմիական հատկանիշները և ֆերմենտի կենսասինթեզի օպտիմալ պայմանները:

The asporogenous mutant of *Bacillus licheniformis* with high inulinase activity (4500 u/g cells) has been obtained exceeding about 10-fold over the activity of the original strain. Physio-biochemical properties and the optimal conditions for biosynthesis of enzyme have been studied.

Инулин - инулиназа - бациллы

Продуценты инулиназы широко распространены среди раз-ных групп микроорганизмов: бактерий, грибов и дрожжей [1-3]

У бацилл - продуцентов инулиназы в процессе спорообразо-вания снижается ферментативная активность. И чем интенсивнее этот процесс, тем слабее инулиназная активность.

Целью настоящей работы являлось получение аспорогенного мутанта с высокой инулиназной активностью.

Материал и методика Объектом исследования служила культура *Bacillus licheniformis* шл. ИНМИА-1911 из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении.

В качестве мутагена применяли N - нитрозогуанидин (НГ). Для получения аспорогенного мутанта отцентрифугированную биомассу 4-часовой культуры дважды промывали в фосфатном буфере с pH 7,0. После промывки биомассу из расчета 10^8 кл/мл вносили в раствор, содержащий 1 мг/мл НГ. Экспозиция - 30 и 60 мин при температуре 40° , после чего проводился рассев на чашки Петри со средой следующего состава (%):

пептон - 1,0; дрожжевой экстракт - 0,5; инулин - 0,1. После 48-72 ч инкубации микроскопированием выросших колоний отбирали аспорогенные варианты.

Инулиназную активность определяли по методу Гомоджи-Нельсона [4]. В качестве реакционной смеси использовали раствор 1 %-ного инулина. За единицу активности принимали количество фруктозы (мк моль), образовавшейся при конверсии 1 г инулина одним граммом биомассы в течение одного часа при 40° в условиях качалки.

Результаты и обсуждение. В результате воздействия НГ на культуру *B. licheniformis* получен аспорогенный мутант с высокой инулиназной активностью.

Сравнительная характеристика инулиназной активности различных групп микроорганизмов показала, что активность полученного нами аспорогенного мутанта значительно выше активности исходного штамма и других культур микроорганизмов (табл.1).

Таблица 1. Инулиназная активность различных групп микроорганизмов

Группы и штаммы микроорганизмов	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Мутант <i>B. licheniformis</i>	4500
<i>Kluyveromyces fragilis</i> шт.3884	1300
<i>B. licheniformis</i> шт.1911	200
<i>Aspergillus candidus</i> шт.43(7)	780
<i>B. subtilis</i> шт.1722	160

Изучено влияние различных источников углерода, азота и микроэлементов на инулиназную активность аспорогенного мутанта. Ксилоза и целлобиоза являются индукторами при биосинтезе инулиназы (табл.2). Биосинтез фермента стимулируют органические виды азота (табл.3). Из микроэлементов инулиназную активность повышают ионы Ca^{++} и Mg^{++} (табл.4)

Таблица 2. Влияние источников углерода на инулиназную активность (сахара добавлялись из расчета 1 %)

Источники углерода	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Ксилоза	1260
Глюкоза	926,4
Целлобиоза	1223
Сахароза	630
Галактоза	1000
Маннит	445
Мальтоза	593
Инулин	1260

Оптимальная температура расщепления инулина - 50°, pH 6,5-6,0. Изучение культуральных, морфофизиологических и биохимических особенностей спорогенного мутанта показало, что они в основном не отличаются от исходного штамма.

Таблица 3. Влияние источников азота на инулиназную активность (концентрация по азоту 0,3 %)

Источники азота	Ферментативная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
KNO ₃	22
(NH ₄) ₂ SO ₄	29
NH ₄ NO ₃	185
Мочевина	166
Гидролизат казеина	1593
Пептон	1704

Таблица 4. Влияние различных микроэлементов на инулиназную активность (концентрация ионов 0,001М, иона кальция 0,01%)

Микроэлементы	Инулиназная активность, мкмоль/час/г сырой биомассы
Контрольная среда без ионов	500,3
Zn ⁺⁺	685,5
Mg ⁺⁺	1222,8
Ca ⁺⁺	2593,8
Fe ⁺⁺	449,2
Co ⁺⁺	
Cu ⁺⁺	

Работа частично финансировалась грантами МНФ (Сороша) RY1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян З.Г., Айвазян Н.А., Африкян Э.К. Биолог. журн. Армении, 41, 5, 1988.
2. Bajon A.M., Guiraud Z.P., Biotechnol. Bioeng., 25, 1983.
3. Beluche G., Guiraud Z.P. Folia Microbiol., 25, 32, 1980.
4. Sonogy M.Z. Biol. chem., 195, 1951.

Поступила 8.XI.1994

ՍՈՅԱՅԻ ՊԱՆԱՐԱՐԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՆՈՐ ՇՏԱՄՆԵՐՈՎ
«ԿԵՆՍԱՔԱՆԱԿԱՆ ԱԶՈՏԻ» ՖԻԶՍԱ ԻԱՅԻ ԱՐԴՅՈՒՆԱՎԵՏՈՒ
ԻԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Ա.ՁԱՆԱՔԱՆԱԿՅԱՆ, Ֆ.Ս ՄԵԹԵՎՈՍՅԱՆ, Ի.Բ.ԲԱԳՂԱՆՈՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք. Արմավիր

Пахотные земли Армении не содержат клубеньковых бактерий сои и поэтому культуру сои необходимо обрабатывать нитрагином сои

Изучена эффективность двух штаммов ИНИИА-5783 и 5789 клубеньковых бактерий сои. Штаммы 5783 повышает урожай зерна сои на 9,0 ц/га, а штамм 5789 - на 3,2 центнера. Штаммы также увеличивают количество сырого протеина в стручках на 2-3 %

Հայաստանի Հանրապետության վարչաօկոգիքը սոյայի պալարաբակտերիաներ չեն պարունակում. Այդ պատճառով սոյայի մշակաբույսը անհրաժեշտ է մշակել սոյայի նիտրաժինով:

Ուսումնասիրվել է սոյայի պալարաբակտերիաների երկու շտամների (5783 և 5789) արդյունավետությունը. 5783 և 5789 շտամները ավելացրել են սոյայի հատիկի բերքը համապատասխանաբար 9,0 և 3,2 ցենտներով յուրաքանչյուր հեկտարում: Այս շտամները 2-3 %-ով ավելացրել են նաև հում պրոտեինի քանակը պատիճներում:

The arable lands of Armenia do not contain the nodule-forming bacteria of soybean, so the culture of soybean needs the treatment of soybean nitragin

The efficiency of the two strains of nodule-forming bacteria of soybean was studied. The strain 5783 has increased the yield of grain soybean 9,0 centner, but the strain 5789 - 3,2 centner from each hectare. The strains have increased the quantity of the raw protein in the pods on 2-3 %.

Սոյա - պալարաբակտերիաներ - ազատֆիքսոսպիրա

Սոյայի հատիկը պարունակում է մեծ քանակով ապիտակուց, ճարպեր, ածխաջրեր, անփոխարինելի ամինաթթուներ, ֆերմենտներ, վիտամիններ և հանքային նյութեր: Հայտնի է նաև սոյայի հատիկից կարի, կարնամերկուրների, մսի և այլ մթերքների փոխարինիչների ստացումը [1]:

Հայաստանում սոյա չմշակվելու պատճառներից մեկն այն է, որ հանրապետության հողերը գտրվ են սոյայի պալարաբակտերիաներից, որոնք, սոյայի արմատների վրա պալարիկներ գոյացնելով, յուրացնում են մթնոլորտային ազոտը մատակարարելով այն բույսին և հարստացնելով հողը ազոտով [1,2,4]: Սոյան էկոլոգիսպես մարտուր կոլտուրա է և հանքային ազոտական պարարտանյութեր չի պահանջում:

Սոյն աշխատանքի նպատակն է եղել ստանալ սոյայի պալարաբակտերիաների նոր շտամներ և ուսումնասիրել դրանց

ազդեցությունը սոցիալի հաստիկի բերրատվության, հատիկում սպիտակուցների և ճարպի կուտակման վրա:

Նյութը և մեթոդը: Սոյայի պարսպաքանկաները անցառվել են Արխագիայի կոդեֆայ: Անցառված են չորը 10 շուամներ, ռատմնախրվել դրանով մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիկենսալիմիակալան հասկությունները և տրոյունավառ-բյունը սեղեկայի եղանակով: Այսատանքում սգտագործվել են *հետազոտություններ* 5783 և 5789:

Դաշտային փորձերը դրվել են 1994թ., Հայաստանի երկրագործության ինստիտուտի փորձարարչություն: Ազատագործվել է սոյայի «Լոմառեցկայ» տեսակը: Մոսկի կոմսազ զանգվածում և հասկիներում համ պրոտեկի բանակը որոշվել է կեղտի մեթոդով [3], ճարպերը Սոբելիայի սպրոգ, երկրի միջոցով:

Արդյունքներ և քննարկումը: Ինչպես ցույց են տալիս աղյուսակ 1-ի տվյալները, պարսպաքանկաների 5783 և 5789 շուամները բարձրացրել են սոյայի կանաչ զանգվածի բեքքառվությունը մեկ հեկտարում համապատասխանաբար 15,6 և 14,4 ցենտներով, իսկ հասկիկի բերքը 9,0 և 3,2 ցենտներով:

Սոյայի արձատների վրա բույսի զարգացման սկզբնական շրջանում պարսպաքանկաները բույս և, պարսպիկների բանակը՝ բիչ: Բույսերի կոկոնակազման և ծաղկման շրջանում արձատների վրա պարսպաքանկաները առնվել է, պարսպիկների բիվի ու բանի առգամ շուտ և, քան նախնական առնի (2-3 տերի գոյացում) ժամանակ: Բույսերը կոկո-նակազման, ծաղկման փուլում ազոտի ֆիրսպլիսն առննաբարձրն է:

Աղյուսակ 1. Սոյայի պարսպաքանկաների ազդեցությունը կանաչ զանգվածի և հասկիկի բերրատվության վրա

ույանիշները	կանաչ զանգված			Հասկիկ		
	ստուգիչ*	5783 շամ	5789 շամ	ստուգիչ	5783 շամ	5789 շամ
Սոյայի բերրատվությունը, ց/հա	59,4	79,6	73,8	12,1	21,1	15,3
Սոյայի բերրի հավելումը, ց/հա	-	19,6	14,4	-	9,0	3,2

*) - Ստուգիչ արքերիսկը բույս տեղերում ճշանակում է՝ առանց սրսրսրս-րականերիսկի:

Սոյայի բույսերի արձատների վրա պարսպիկները տեղակայված են առավելապես կենտրոնական արձատների վրա:

Ազոտի կենսաբանական ֆիկսացիայի ազտիվ փուլում առան-նախրված է պրոտեկի բանակը կանաչ զանգվածում (ազ. 2) և պրո-տեկի ու ճարպի բանակը սոյայի հասկիկներում (ազ. 3):

Ինչպես ցույց են տալիս աղյուսակ 2-ի տվյալները, պրոտեկի բանակը սոյայի կանաչ զանգվածի պարսպաքանկաներով վարակ-ված արքերակում ստուգիչի համեմատ ազելի 1, 1,4 և 2,3 %-ով, համապատասխանաբար 5783 և 5789 շուամների համար, իսկ սոյայի պարսպիկներում զերագանցում է ստուգիչ արքերակը 2,0 և 3,2 %-ով:

Աղյուսակ 2 Պրոտեինի քանակը սոյայի կանաչ զանգվածում և պատիճներում, %

Պարարտանյութային շտամները	Կանաչ զանգվածում	Պատիճներում
Ստուգիչ	11,1	28,0
5783	12,5	30,0
5789	13,4	31,2

Ինչպես ցույց են տալիս աղյուսակ 3-ի տվյալները, պրոտեինի քանակը սոյայի հատիկների պալարաբակտերիաներով վարակված տուրքերակներում գերազանցում է ստուգիչ տարրերակը 2,7 և 4,3 %-ով, իսկ ճարպերի քանակը՝ 1,1%-ով համապատասխանաբար 5783 և 5789 շտամների համար:

Աղյուսակ 3. Պրոտեինի և ճարպերի քանակը սոյայի հատիկներում, %

Պարարտանյութային շտամներ	Պրոտեին	Ճարպեր
Ստուգիչ	40,0	20,0
5783	42,7	21,1
5789	44,3	21,14

Այսպիսով, սոյայի պալարաբակտերիաները նպաստում են նրա կանաչ զանգվածի և հատիկների բերքատվության բարձրացմանը, ինչպես նաև նպաստում են պրոտեինի և ճարպերի կուտակմանը սոյայի հատիկներում և կանաչ զանգվածում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Лисичкина Г.А., Кожевин П.А., Заягинцев Д.Г. Микробиология, 55, 1, 1986.
2. Налбандян А.Д., Авотисян В.А., Бабелян Г.С. Вопросы микробиологии (биол. фиксация атм. азота). 8, Ереван, 1981.
3. Петербургский А.В. Практикум по агрономической химии. М., 1960.
4. Рийхинштейн М.Е., Мелик Тер-Саркисян С.С., Кретсвич В.А. Микробиология, 45, 2, 1976.
5. Толстогузов В.Б. Искусственные продукты питания, М., 1978.

Ստացված է 15.IX.1994

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ШТАММЫ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БОРЬБЫ С КОМАРАМИ

Ж.Х.ОРМАНЯН, П.Е.ТАТЕВОСЯН, М.А.КИНОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 375510, г.Абовян

ТТИз насекомых-вредителей, собранных в различных районах Армении, были выделены новые бактериальные культуры и проверена их москитоцидная активность. Установлено, что из испытанных культур высоковирулентными к личинкам комара *Aedes aegypti* L. оказались 10 штаммов, принадлежащих к видам *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus sphaericus*.

Հայաստանի տարբեր շրջաններից հավաքված վնասատու միջատներից մեկուկեսից են նոր բուխեցված կուլտուրաներ և ուսումնասիրվել են նրանց մոսկիտոցիդական ակտիվությունը: Պարզվել է, որ փորձարկված կուլտուրաներից *Aedes aegypti* L. մոծակի րիչարների նկատմամբ բարձր փորձենաբարձր են ցուցաբերել *Bacillus thuringiensis* և *Bacillus sphaericus* տեսակներին պատկանող 10 շտամներ:

The new bacterial strains were isolated and tested for mosquitoicidal activity from insects of different regions of Armenia. The great virulence among the tested cultures against the larvae of *Aedes aegypti* L. have shown 10 strains of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*.

Энтомопатогенные бактерии - комары - москитоциды

Среди изученных групп микроорганизмов важнейшими по инсектицидным свойствам являются определенные виды аэробных спорообразующих бактерий *Bacillus thuringiensis* и *Bacillus sphaericus*, используемые в настоящее время в производстве инсектицидных препаратов [1-3]. Исследованиями разных стран подтверждена патогенность культур этих видов к личинкам комаров, мошек и некоторых других вредоносных двукрылых [5, 7-9]. Анализ опубликованных работ показывает, что несмотря на значительную систематическую и биологическую отдаленность *B.sphaericus* и *B.thuringiensis*, механизмы их энтомопатогенного действия довольно схожи, но москитоцидное действие культур *B.sphaericus* проявляется не ранее суток, а *B.thuringiensis* - через минуты. Особый научно-практический интерес вызывают культуры *B.sphaericus*, которые своей москитоцидной активностью, способностью к длительному сохранению и репродукции в водоемах и других местообитаниях комаров могут обеспечить стабильную санацию от личинок комаров в природе.

Целью настоящей работы являлось изыскание новых перспективных культур *B.thuringiensis* и *B.sphaericus*, обладающих высокой москитоцидной активностью.

Материал и методика. Объектами исследований служили в основном погибшие насекомые, собранные в различных районах Армении, а также Арцаха, Грузии, России, Украины и Ирана. Всего было обследовано свыше 150 образцов различных видов насекомых, принадлежащих к отрядам таракановых (*Blattoptera*), богомолевых (*Mantodea*), прямокрылых (*Orthoptera*), равнокрылых (*Homoptera*), полужесткокрылых (*Hemiptera*), жесткокрылых (*Coleoptera*), чешуекрылых (*Lepidoptera*) и двукрылых (*Diptera*).

Для выделения бактерий образцы насекомых после растирания с водой, с их последующей пастеризацией при 70° в течение 10 мин высевали на поверхность среды в чашках Петри. Рост бактерий учитывали на 2-3 сутки инкубации при 30°. Культуры бактерий разных видов выделяли и очищали. Инсектицидные свойства выделенных новых культур изучали в отношении двукрылых (личинки комара *Aedes aegypti* L.) и чешуекрылых (гусениц тутового шелкопряда *Bombyx mori* L.) по методу Карпова [4] и Швецово [6]. Для оценки mosquitoцидной активности тест-объектом служили личинки второго возраста кровососущего комара *Aedes aegypti* L., непрерывно культивируемые в инсектарных условиях. Mosquitoцидную активность новых бактериальных культур устанавливали путем инфицирования воды, предназначенной для подопытных личинок. Для опытов использовали химические стаканы емкостью 100 мл. Изучаемую культуру микроорганизма, снятую с поверхности твердой питательной среды (в объеме одной микробиологической петли), сначала суспендировали в пробирке в 1 мл воды, затем вливали в стакан с 19 мл дехлорированной воды, куда вносили 10 личинок комара второго возраста из инсектарной культуры. В контроле использовали стерильную воду. Температурный режим 26-27°. Учет личинок проводили в первые часы после постановки опыта и затем через 24, 48 и 72 часа.

Инсектицидную активность выделенных культур по отношению к тутовому шелкопряду устанавливали путем разового скармливания насекомым инфицированного корма. Для каждого штамма бактериальной культуры количество подопытных гусениц составляло 30 особей. Контролем служила стерильная вода. Наблюдения за состоянием насекомых велись в течение 3 дней.

Результаты и обсуждение. В результате исследований патогенной микрофлоры погибших насекомых - вредителей сельскохозяйственных культур, проведенных в 1992-94 годах, из 155 образцов насекомых выделена 331 культура спорообразующих бактерий, отнесенных к видам *B.thuringiensis*, *B.sphaericus*, *B.subtilis* и *Bacillus* sp.

В табл. 1 представлены данные о микрофлоре 8 отрядов насекомых. В микрофлоре представителей отрядов таракановых, богомолевых и прямокрылых культуры вида *B.thuringiensis* и *B.sphaericus* не выявлены. 75 культур *B.thuringiensis* и 67 - *B.sphaericus* выделены из микрофлоры представителей отрядов равнокрылых, полужесткокрылых, жесткокрылых, чешуекрылых и двукрылых. Из представителей отряда полужесткокрылых выделено 11 культур вида *B.subtilis*.

Для изучения mosquitoцидной активности выделенных культур по отношению к личинкам комара *Aedes aegypti* L. отобрано 140 штаммов бактерий видов *B.sphaericus* (48 штаммов),

B. thuringiensis (26 штаммов) и *Bacillus* sp. (66 штаммов). Данные представлены в табл.2.

Таблица 1. Распространение культур спорособразующих бактерий в микрофлоре несъедобных

Насекомое (отряд)	Коли- чество образцов	Всего	Выделено культур			
			<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. paphae- giansis</i>	<i>B. entomophaga</i>	<i>B. thuringiensis</i>
Таракановые <i>Blattoptera</i>	1	2	-	-	-	2
Богомолевые <i>Mantodea</i>	2	6	-	-	-	6
Прямокрылые <i>Orthoptera</i>	2	11	-	-	-	11
Разнокрылые <i>Hemiptera</i>	4	5	2	2	-	1
Полужесткокры- лые, или клопы <i>Hemiptera</i>	23	60	10	12	11	27
Жесткокрылые, или жуки <i>Coleoptera</i>	83	172	37	59	-	96
Чешуекрылые или бабочки <i>Lipidoptera</i>	28	55	15	11	-	26
Двукрылые, или мухи <i>Diptera</i>	7	20	10	3	-	7
Всего	155	331	75	67	11	179

Таблица 2 Динамика проявления москитоцидной активности.

Аedes aegypti L.(культуры выращены на РТ, титр бактериальных суспензий 150-350 тысяч спор)

[illegible]

Установлено, что из 48 штаммов *B.sphaericus* в отношении личинок второго возраста комара *Aedes aegypti* L. высоковирулентными оказались 2 штамма. При этом полная гибель личинок наступала в течение 24-48 ч после инфицирования. Из 26 изученных штаммов *B.thuringiensis* высоковирулентными были 5 штаммов. Максимальная гибель от действия указанных штаммов наступала в течение 0,5-2,5 ч после инфицирования. Приведенные данные показывают, что mosquitoцидное действие высоковирулентных штаммов *B.thuringiensis* по сравнению с таковым штаммов *B.sphaericus* проявляется в весьма короткий промежуток времени.

Для выяснения влияния перспективных mosquitoцидных штаммов на полезную энтомофауну было изучено их энтомоцидное действие на гусениц тутового шелкопряда. Результаты опытов показали, что из испытанных 10 mosquitoцидных штаммов в отношении представителя полезной энтомофауны тутового шелкопряда вирулентными оказались лишь 2 штамма *B.thuringiensis* - 27-2-1 и 263 (табл.3)

Таблица 3. Вирулентность новых перспективных mosquitoцидных штаммов бацилл к гусеницам тутового шелкопряда (культуры выращены на РП, титр бактериальных суспензий 120-200 млрд спор)

Вид бацилл	Рабочие номера штаммов	Гибель гусениц (%) через сутки		
		1	2	3
<i>B.sphaericus</i>	1-1; 12	0	0	0
<i>B.thuringiensis</i>	8; 61; 63;	-	-	-
	71-1	0	0	0
	27-2-1	100	-	-
	263	100	-	-
<i>Bacillus</i> sp.	69-5; 73-5	0	0	0
Контроль	вода	0	0	0

Этот факт придает перспективным mosquitoцидным штаммам еще большую ценность, так как при их применении полезная энтомофауна сохраняется

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНХ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-3512

ЛИТЕРАТУРА

1. Алексеев А.И. Мед. паразитология и паразитар. болезни, 1,3-5, 1984
2. Африкян Э.К. Экопатогенные бактерии и их значения, 418, Ереван, 19
3. Кандыбин Н.В., Ермолова В.П., Барбшюва Н.М. Бюлл. ВНИИ микробиологии, 36, 45-47, 1982.
4. Карпов Э.Г., Игнатьев В.И., Попов А.И. Методические рекомендации по изучению микроорганизмов-регуляторов численности опасных насекомых клещей, М., 1984
5. Мелиссетян В.Ш., Чилингариан К.О., Кулакова Т.А., Карпов Э.Г. Тез. VII съезда ВМО, Алма-ата, 7, 47, 1985.
6. Швецова О.И. Методические указания по испытанию бактериального препарата энтобактерина. Л., 1960.
7. Bérès H. de C.R.Acad.Sci-Paris, ser. D., 286, 10,797-800 1978
8. Koller W.R., Clark T.B., Lindgren J.E., Ho B.C. & Rogoff M.H & Singer S.J. Invert. Patiol., 7, 442-446, 1965
9. Singer S. Develop. Ind. Microbiol., 20, 1979.

Поступила 9 IX.1994

Биолог. журн. Армении, 1(48), 1995.

УДК 556.14

О ПРОЦЕССЕ РАССОЛЕНИЯ ПОЧВЫ И ОПТИМИЗАЦИИ ЕЕ ВОДНО-СОЛЕВОГО РЕЖИМА

С.Г.КАРАПЕТАН

НИИ водных проблем и гидротехники, 375047, Ереван

Разработана методика определения длины рассоленного слоя почвы образующегося в процессе впитывания воды и оптимизации почвенно-водно-солевого режима, которая позволяет создавать благоприятные условия для получения максимального урожая сельскохозяйственных культур.

Մշակված է հողան քիչ ներծծման պրոցեսում գոյացող աղակերժված ձևով երկրաբանական որոշման և հողա-ջրա-աղային ռեժիմի օպտիմիզացման հարցով, որը հնարավորություն է տալիս ստեղծել փայտանոցի աղանմանը հարմարեցված կառուցվածքային բերրի մասնաշրջան համար:

Method for determination of length of the desalinated layer of soil, which is formed during the absorption process of water, have been presented. The regularities between one length (size) of soil layer desalted and the layer of filtrated water have been revealed. The methodical approaches optimization of water-saline relationships is proposed for obtaining of maximum yield of agricultural crops.

Мелиорация - рассоление почвы - водно-солевой режим почвы

Исследование процесса солепереноса в мелиоративной науке развивалось в двух направлениях - эмпирическом и теоретическом. К первому направлению относятся работы Л.П.Розова, В.А.Ковды,

Е.М.Легостаева, В.Р.Болобуева, П.С.Панин и других авторов. Ими предложены эмпирические формулы, с помощью которых определяют норму промывной воды при обессоливании земель.

В основу теоретических разработок [1-5, 7, 8] положен метод физико-химической гидродинамики. Согласно этому методу, физическая сущность солепереноса рассматривается как вынужденная конвекция фильтрационным потоком с развитием молекулярной диффузии, растворения и выноса солей.

Цель нашей работы - разработать новый метод для решения данной задачи, существенно отличающийся от применяемых методов.

Процесс рассоления почвогрунта нами рассматривается в виде изменения длины рассоленного слоя в зависимости от количества профильтровавшейся воды. Принимается, что в рассоленном слое изменение концентрации почвенного раствора во времени и воздействия конвективного и диффузионного процессов на ход солепереноса завершены, поэтому необходимость в определении трудно-решаемых коэффициентов диффузии и растворения отпадает. Это позволит намного упростить решение поставленной задачи.

Применяются следующие исходные условия:

- процесс рассоления рассматривается в колонне однородного засоленного почвогрунта, длина которого принимается равной высоте капиллярной каймы;

- соли в почве рассматриваются в виде почвенного раствора;

- содержание солей в почве выражено в виде отдельных солей, а не ионов

Результаты и обсуждение. Исходной позицией теоретического обоснования процесса солепереноса является объективно существующий факт, наблюдаемый в ходе насыщения сухого почвогрунта. Это - разделение количества впитавшейся в сухую почву воды на две равные части. Первая насыщает определенную глубину почвы Z_1 , а вторая транзитом проходит через этот слой, удовлетворяя условию перемещения отмеченной поверхности воды на длину Z_1 [6]. На этой основе получено уравнение скорости впитывания первой порции воды в слое высоты капиллярной каймы. С помощью этого уравнения получена зависимость для определения скорости фильтрации. Указанные уравнения также являются исходной позицией для теоретического обоснования процесса солепереноса.

Рассмотрим процесс перемещения солей в колонне однородного насыщенного почвогрунта при нисходящем движении воды. Коэффициент полной влагоемкости равен w_1 , в долях единицы. Длина колонны равна высоте капиллярной каймы (H_K), которая в сухом состоянии насыщается слоем воды $h_{пр}$. Параметр H_K является

пределной глубиной засоления почвогрунта. Среднее содержание данной соли в колонне равно c_n . После рассоления заданного слоя почвогрунта содержание солей в рассоленном слое достигает определенной величины c_b , равной количеству этой же соли в подаваемой воде (рис).

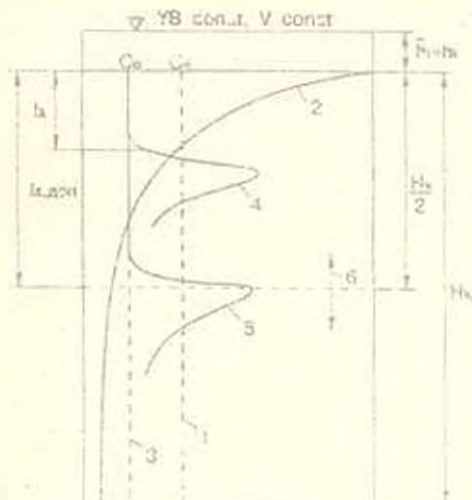


Рис. Схема перемещения солей в почвогрунте

1. Среднее содержание солей в слое H_k (c_n). 2. Распределение концентрации почвенного раствора в слое H_k до промывки. 3. Остаточное содержание солей, равное концентрации подаваемой воды (c_b). 4. Перемещение максимальной концентрации солей ниже рассоленного слоя при фильтре $h_{дон}$. 5. Перемещение максимальной концентрации солей ниже допустимой глубины рассоления ($H_k/2$). 6. Направления движения воды и солей на допустимой глубине почвогрунта

Допустим, что максимальная концентрация почвенного раствора находится у поверхности земли и c_b меньше c_n . Тогда при прохождении максимальной концентрации почвенного раствора или отмеченной поверхности воды через насыщенный слой H_k в нем будем иметь однократный водообмен между поступающей пресной и стекающей минерализованной водами. В результате из слоя H_k будет вынесено определенное количество соли. При определенном числе водообменов среднее содержание данной соли в слое H_k уменьшится до предельной величины, равной количеству этой же соли в подаваемой воде, и из слоя H_k будет вынесено количество данной соли, равное

$$\Delta c = c_n - c_b$$

(1)

Аналогичный процесс имеет место в верхних частях слоя H_k . Допускается, что в каждом цикле водообмена из рассоленного слоя

выносятся среднее количество данной соли, равное одной части Dc_0 от общего количества выносимой соли D с.

Из вышеизложенного вытекает, что при однократном водообмене в слое H_k на определенной глубине l_1 кратность водообмена достигает предельной величины k_p , и на этой глубине почвогрунт рассоляется. Это значит, что максимальная концентрация почвенного раствора перемещается ниже слоя l_1 и содержание соли в нем падает до минимальной постоянной величины. Этот процесс выражается равенством

$$l_1 = H_k / k_p \quad (2)$$

Уравнение скорости фильтрации показывает почти линейное изменение скорости в зависимости от слоя воды над поверхностью земли. Допустим, что при данном слое воды над поверхностью колонны истинная скорость фильтрации в грунте равна v_1' . Тогда длина перемещения максимальной концентрации почвенного раствора в насыщенном почвогрунте l_1 за единицу времени t_0 составит

$$l_1 = v_1' t_0 \quad (3)$$

Аналогично равенству (2) для слоя l_1 можем написать

$$l_x = v_1' t_0 / k_p \quad (4)$$

где l_x - длина рассоленного слоя почвогрунта за единицу времени

Если максимальная концентрация почвенного раствора за единицу времени перемещается на длину l_1 , то при прохождении этой концентрации на длину H_k с постоянной скоростью фильтрации потребуется t_1 времени. Это значит, что перемещение отмеченной поверхности воды в слое l_1 повторится t_1 или k_p раз, что позволяет написать следующее равенство:

$$k_p = H_k / l_1 = t_1 / t_0 = H_k / v_1' t_0 \quad (5)$$

Как видно из уравнений (2) и (5), при определенном слое воды над поверхностью колонны можно достичь такой скорости фильтрации, которая обеспечила бы условие $k_p = k_p'$. Тогда из уравнений (2) и (5) можем вывести

$$t_1 = k_p t_0, \quad H_k = l_1 t_1 \quad \text{и} \quad l_1 = l_1' = v_1' t_0 \quad (6)$$

Если при однократном водообмене в слое H_k из него выносятся одна часть общего количества выносимой соли (Dc_0), то при кратности водообмена k_p в слое l_1 из него будет вынесено D с

количество данной соли, и он рассолится. На этой основе и с учетом равенства (2) устанавливается соотношение между параметрами H_k , D_{c0} и $k_p l_i$. D_c и выводится равенство

$$k_p = H_k D_c / l_i D_{c0} \quad (7)$$

Подставляя значение k_p из уравнения (7) в уравнение (4), получим зависимость для определения длины рассоленного слоя от величин: l_i :

$$l_{xj} = v' l_i D_{c0} l_j / H_k D_c \quad (8)$$

С учетом равенств $v' = v/w_1$, $l_i = h_j/w_1$ и $H_k = h_{np}/w_1$ зависимость (8) примет вид.

$$l_{xj} = v' l_i D_{c0} h_j / w_1^2 H_k D_c \quad \text{или} \quad l_{xj} = v' l_i D_{c0} h_j / w_1 h_{np} D_c \quad (9)$$

где v - скорость фильтрации, см/мин, h_j - заданный слой фильтруемой воды, см; h_{np} - слой воды, насыщающий сухой почвогрунт на глубине H_k , см. Параметры h_{np} и H_k определяются по следующим формулам [6].

$$h_{np} = 2h_0/m \quad H_k = 2h_0/mw_1$$

Коэффициент водоотдачи определяется по формулам $m = 1 - 2w_1/4w_1$ или $m = w_1$ - m , где m - предельная полевая влагемкость в долях единицы. Параметр v определяется по следующей зависимости [6]:

$$v_j = 2h_0^2 m / l_0 [4h_0 w_1^2 - h_j (2w_1^2 m + w_1^2 m^2 - 2m^2 + m^3)] \quad (10)$$

где h_j - заданный слой воды над поверхностью земли (см)

Для проверки достоверности зависимости (9) проведены полевые опыты

В таблице приведены данные опытов и расчетов, откуда видны положительные результаты.

При современной методике определения нормы поливной воды исходным показателем является увлажнение определенного слоя почвы без учета особенности перемещения солей в данном слое. Это не позволяет полноценно регулировать водно-солевой режим почвы и обеспечить высокий урожай сельскохозяйственных культур. Указанный недостаток устранен в описываемой ниже методике оптимизации почвенно-зодно-солевых условий.

После стекания избытка воды из слоя H_k его длина увеличивается на величину H_{km} , составляя $H'_{km} = H_k(1+m)$. Влажность в указанном слое характеризуется коэффициентом предельной полевой влагемкости (m).

Из практики поливного земледелия известно, что при дефиците воды в активной зоне 20-30 % от предельной полевой влагемкости необходимо поливать почву. Примем, что указанный дефицит воды составляет 25 %. Тогда исходная влажность (w_1) в слое H_k будет равна 0,75 m .

Таблица. Расчетные и фактические величины рассоленного слоя при промывке земель Араратской равнины

Делянка	Площадь, м ²	W ₁	m	h _{к,расч} h _{к,ф} м	NaCl Δс %	h' см	h м	v _{рас} V _ф м/сут	l _{к,расч} м	l _ф м
1 1976	1	0,488	0,0123	3,3 3,4	0,623	10	1,55	0,395 0,31 1,79	0,97 1,49	0,9 1,5
2 1976	1	0,488	0,0123	3,33 >3	0,459	15	0,59	0,4 0,4 0,24	0,71 0,86	0,8 0,85
								0,343		
								0,468		
								0,076	0,463	0,069
								0,468		
								0,16	0,56	0,165
1 1977	1	0,488	0,0123	3,33 3,25	0,686	35	0,249	0,468 0,498 0,946	0,228 0,59	0,23 0,7
								0,339		
								1,685	0,468	0,98
								0,317	0,95	
2 1977	1	0,488	0,0123	3,33 3,2	0,324	10	1,054	0,395 0,383 0,395	1,57	1,6
								1,557	0,431	2,61
									2,5	
								0,2	0,527	0,3
								0,3	0,527	0,44
1 1977	1	0,488	0,0123	3,33 3,2	0,452	50		0,527	0,59	0,55
								0,139	0,38	0,16
								0,266		
								0,28	0,38	0,32
1 1978	1,44	0,488	0,0123	3,33 3	0,292	5	0,56	0,266 0,38 0,286	0,69	0,8
								0,903	0,38	1,11
								0,286		1,1

Спыты показывают, что интенсивность впитывания и испарения воды, а также восходящее перемещение солей на глубине $H_k/2$ резко сокращаются, поэтому указанная глубина является активной зоной интенсивного движения воды и солей вниз и вверх. Дефицит воды для насыщения слоя $H_k/2$ при исходной влажности 0,75 m составляет

$$h_1 = H'_k(w_1 - 0,75m)/2 \quad (11)$$

Насыщение слоя $H_k/2$ происходит с определенной средней скоростью впитывания (v_{bn}), величина которой устанавливается из уравнения впитывания, имеющего следующий вид [6]:

$$v_{bnj} = v_2 w_1 t_j^2 / \{v w_1 t_j^2 - t_0 [v_1 v t_j - v t_j (0,75m + (4h_0 + v t_j) / H_k)]\} \quad (12)$$

Как видно из (12), условие насыщения слоя $H_k/2$ характеризуется равенством

$$w_1 = 0,75m + (v t_j + 4h_0) / H_k$$

откуда значение t_j составляет

$$t_j = H'_k [(w_1 - 0,75m) - 4h_0] / v \quad (13),$$

где параметр v определяется по формуле (10). Имея величину t_j по (14) подсчитывается средняя скорость впитывания воды в слое $H_k/2$:

$$v_{bn} = H'_k m / 2 t_j \quad (14)$$

С учетом равенства (11) формула (9) для условия полива земель примет вид:

$$l_x = v_{bn} t_0 D c_0 H'_k (w_1 - 0,75m) / 2 m h_{np} D c \quad (15)$$

Для заданного слоя впитавшейся воды величина l_x определяется по формуле

$$l_{xj} = v_{bn} t_0 D c_0 h_j / m h_{np} D c \quad (16)$$

Анализ зависимости (16) показывает, что входящие в нее параметры характеризуют почвенно-водно-солевые условия, которые можно оптимизировать и получить максимальный урожай сельскохозяйственных культур. Так, при данном слое профильтровавшейся воды и количестве питательных веществ в различных грунтах длина рассоленного слоя может быть больше или меньше величины $H_k/2$. При условии когда $l_x > H'_k/2$, соли или питательные вещества безвозвратно опускаются ниже этой глубины, и плодородие почвы уменьшается. Подобная картина наблюдается в песчаных грунтах, где скорость фильтрации большая, и параметр h_{np} или H_k имеет меньшее значение. Это условие может быть и при поливе легких почв большими поливными нормами. Если глубина рассоленного слоя значительно меньше величины $H'_k/2$ ($l_x < H'_k/2$), то максимальная концентрация почвенного раствора или питательных веществ будет находиться в верхних слоях почвы и ниже лежащие корни растений будут лишены возможности пользоваться ими, что также снизит урожайность. Это характерно для глинистых почв и при применении малых поливных норм. Оптимальные значения водно-физических свойств почвы, в частности w_{10m} и h_{np} и H_{kp} , будут соответствовать наилучшему варианту перемещения максимальной концентрации питательных веществ в слое $H'_k/2$.

Принцип оптимизации водно-физических свойств почвы следующий. Известно, что значение параметра w_1 больше в глинистых почвах и меньше в песчаных. Для коэффициента водоотдачи (m) имеем обратную картину. Отсюда следует, что при песковании глинистых почв значение параметра w_1 будет уменьшаться, а параметра m - увеличиваться. При глинизации песчаных почв и их уплотнении значения указанных параметров будут меняться в

обратном направлении. В соответствии с изменением вида и структуры почвогрунта меняется и его плотность (ρ). Графики функций $w(d)$ и $m(d)$ имеют противоположные направления, поэтому их построение позволяет фиксировать точку пересечения этих графиков. Она соответствует оптимальному виду или структуре почвы с оптимальными значениями w_{1on} и m_{on} . На основании параметров w_{1on} и m_{on} устанавливается вид или способ обработки почвы и определяются величины $H_{k,on}$ и $v_{bn,on}$.

Для определения параметра D_{con} задаемся величиной I_x , исходя из вида растения и глубины залегания основной массы корневой системы, и по формуле (16) устанавливаем оптимальную величину D_{con} . Затем по значению c_b определяем расчетное количество вносимых в почву питательных веществ ($c_{n,on}$) по формуле.

$$c_{n,on} = D_{con} + c_b \quad (17)$$

В указанных выше формулах и зависимостях отсутствуют эмпирические коэффициенты. Основным параметром является константа w_1 , величину которой следует определять правильно с неоднократным повторением опытов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянов С.Ф., Рех Л.М. Сб. Мат-лы симп. по мелиорации почв содового засоления, 667-691, Ереван, 1969
2. Анахян А.К. Дренаж при освоении содовых солончаков. М., 1971
3. Веригин Н.Н. Докл. АН СССР, 89, 2, 220-232, 1953
4. Веригин Н.Н. Изв. АН СССР, ОНТ, 10, 13469-1332, 1953
5. Веригин Н.Н., Шершукое Б.С., Шапинская Г.Н. Тр. координационных совещаний по гидротехнике, 35, 27-36, М., 1967
6. Карапетян С.Г., Торосян М.А. Вопросы водного хозяйства, мелиорации и гидротехники Армении, 12, 117-126, Ереван, 1991
7. Шестаков В.М. Сб. Теория и практика борьбы с засолением орошаемых земель, 46-47, 1971
8. Шестаков В.М., Рошаль А.А., Пашковский И.С. Вопросы гидрогеологии, 83-97, М., 1973

Поступила 03.II.1993.

НОВЫЙ ШТАММ ДЛЯ БОРЬБЫ С КОЛОРАДСКИМ ЖУКОМ

М.А. КИНОСЯН, Ж.Х. ОРМАНЯН, Л.А. ЧИЛ-АКОПЯН, П.Е. ТАТЕВОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Микробиометод - колорадский жук - энтомопатогенные бактерии

Колорадский жук (*Leptinotarsa decemlineata* Say) - один из опаснейших вредителей картофеля, баклажанов, томатов, перца, табака и других культур семейства пасленовых. В Армении колорадский жук зарегистрирован в 1976 году в Шамшадинском районе [3] и ареал его распространения все более расширяется.

Для борьбы с колорадским жуком в основном используется экологически небезопасный химический метод. Это вызывает необходимость настойчивых поисков альтернативных средств защиты растений, в том числе микробиологического метода борьбы с вредителями с использованием спорообразующих бактерий. Показано, что микроорганизмы, зависящие от витаминов, попадая в кишечник насекомого, снижают содержания дефицитного ростового фактора, что приводит к специфическим метаболическим нарушениям и гибели насекомого [1,2].

Целью наших исследований являлось изучение вирулентности к колорадскому жуку культуры спорообразующей бактерии.

Материал и методика. Объектом исследований служил штамм M-147 *Bacillus* sp., выделенный из личинки колорадского жука в 1987г (Грузия). Образец после растирания и смешения с водой пастеризовали при 70° в течение 10 мин. Затем высевали на РПА. Культуру выделяли на ту же среду в косяки после 3 суток инкубации при 30°, а затем очищали.

Исследования инсектицидной активности проводили в лабораторных условиях. Тест-объектом для оценки инсектицидной активности служили личинки колорадского жука. Инсектицидную активность устанавливали путем скармливания насекомому инфицированного корма (лист картофеля). Корм смачивали в культуральной жидкости (титр 1-2 млрд спор/мл) способом его окунания. Смоченный корм слегка подсушивали на воздухе и раскладывали в химические стаканы. На зараженный корм подсаживали здоровые личинки колорадского жука. Через 48 часов после питания насекомого инфицированным кормом его заменяли свежим, неинфицированным. Испытания проводили при групповом содержании насекомого (10-30 особей). Контролем служила стерильная вода. Наблюдения за состоянием личинок вели в течение 7 дней.

Для изучения культуральных, физиолого-биохимических свойств были использованы дифференциальные тесты [2,4,6].

Качественный анализ потребности штамма в витаминах определяли ауксонографическим методом [1].

Сыворотку штамма М-147 получали по методике De Vargas и Bonnefoi [6] иммунизацией кроликов способом, предложенным Таллалаевой и Покровской [5].

Результаты и обсуждение. Изучение физиолого-биохимических особенностей показало, что при культивировании на яично-желточной среде культура пигмента не образует. Амилюлитической активностью не обладает. Ацетилметилкарбинол, дигидроксиацетон образует. Уреазу не продуцирует. Молоко слабо пептонизирует. Сбраживает эскулин, очень слабо усваивает сахарозу, маннозу, целлобиозу и не усваивает ксилозу, мальтозу, лактозу. Для своего роста нуждается в биотине.

Получена сыворотка штамма М-147, определен его титр и поставлена реакция агглютинации выделенного штамма с музейным штаммом ИНМИА-273. Последний не серстипировался сывороткой штамма М-147.

Результаты испытаний инсектицидной активности показали, что штамм М-147 вызывает гибель личинок колорадского жука. Основная часть личинок погибала на 2-3 сутки, 100 %-ная гибель наблюдалась на 4-5 сутки.

Динамика инсектицидной активности штамма М-147 *Bacillus* sp. прослеживалась в течение 5 лет после выделения. Данные, представленные в таблице, свидетельствуют, что на протяжении 5 лет хранения сохранялась высокая стабильная вирулентность к личинкам колорадского жука.

Таблица. Вирулентность к личинкам колорадского жука штамма М-147 по годам (% гибели личинок)

Учет на	Г о д ы				
	1989	1990	1991	1992	1993
2-3 сутки	70	40	80	70	70
4-5 сутки	100	100	100	100	100

Приводимые результаты исследований позволяют рекомендовать новый штамм для борьбы с колорадским жуком.

Выполнение данной работы частично финансировалось грантами МНФ (Сороша) RY 1000 и Ассоциации ИНТАС ЕС 93-2512.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авакян З.Г. Автореф. канд. дисс., Ереван 1972.
2. Африкян Э.Г. Эктохлорофитные бактерии и их значение. Ереван, 418, 1973.
3. Говаркян М.Р., Налбандян А.В., Микаелян Р.И. В кн. Материалы Закавказского координационного совещания по защите растений (15-16 мая 1980), Тбилиси, 1980.
4. Лабинская А.С. Микробиология с техникой исследования. М., 202, 1978.
5. Талалаева Г.Б., Покровская Л.А. В кн. Микросоганализы в защите растений от вредных насекомых. Иркутск, 51-60, 1978.
6. Varjos H. et. Vonnola A. Entomophaga, 18, 1, 5-17, 1973.

Поступила 9 IX 1994

Биол. журн. Армении, 1 (48), 1995

УДК 596.2

ДЕЙСТВИЕ ЙОДА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ХЛОРЕЛЛЫ

К.А. МИКАЕЛЯН, Д.А. ОГАНЕСЯН, С.А. АЗАТЯН

Центр эколого-агрофармических исследований НАН Армении

Микроводоросли - хлорелла - йод

Многочисленные данные литературы свидетельствуют о влиянии микроэлементов (В, Мп, Си, Мо, Zn и др.) на рост и биохимические показатели водорослей, в том числе хлореллы [3,5,6], на интенсивность фотосинтеза, образование биомассы и биосинтез ценных органических соединений. При этом имеет значение не только их количество, но и соотношение микроэлементов в питательном растворе. Очень мало данных о влиянии йода на хлореллу, хотя известно, что японцы издревле используют морские водоросли как источник получения этого элемента [4].

В свете сказанного представляло интерес выяснить, может ли содержание йода в растворе стать фактором направленного биосинтеза с целью получения биомассы с заданным химическим составом, возможно ли использование обогащенной йодом биомассы хлореллы в медицинских целях, могут ли клетки хлореллы стать био-фильтром аккумулирующим йод при аварийных ситуациях на АЭС.

Работа выполнена в Институте гидропоники НАН Армении.

Материал и методика. Проведены две серии опытов. В первой изучалось влияние различных концентраций йода в питательном растворе на продуктивность хлореллы *Chlorella pyrenoidosa* шт. 82 К питательному раствору Тамия (контроль.г/л), содержащему KNO_3 -5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -2.5; KH_2PO_4 -1.25 и (раствор микроэлементов по Анону) - 1 мл/л, добавляли йод в виде йодистого калия из расчета 5, 10, 20, 30, и 50 мг/л чистого йода

Первоначальная густота суспензии клеток составляла 1 млн/мл. Хлореллу интенсивно выращивали на аппарате УИВ в условиях непрерывного освещения и продувания воздухом, содержащим 2-3% углекислого газа [1,2], при температуре 27-28°, рН среды 5,5-6, продолжительность опыта - 7-8 дней.

Целью второй серии опытов было выяснение жизнеспособности клеток хлореллы, находящихся в условиях покоя, после длительного пребывания в растворах с высоким содержанием йода. Для этого суспензию 7-суточной культуры хлореллы центрифугировали, промывали дистиллированной водой и переносили в раствор Тамия, в который добавляли йодистый калий из расчета 1-5 и 10 г/л чистого йода. Плотность культуры составляла 0,4 г/л сухого вещества хлореллы. Культуру выдерживали на естественном свете при комнатной температуре в течение 6 месяцев. Образцы отбирали через 7 дней и в конце эксперимента, после промывания дистиллированной водой снова помещали в раствор Тамия в условиях интенсивной культуры на 7-8 дней, при той же плотности и тех же параметрах среды, что и в первой серии опытов.

Результаты и обсуждение. Результаты первой серии опытов, приведенные в таблице, показывают, что хлорелла растет и накапливает биомассу на растворах с различным содержанием йода. Только при количестве йода 50 мг/л наблюдалось подавление роста на 26% по сравнению с контролем.

Во второй серии опытов после семидневного выдерживания хлореллы в средах с высоким содержанием йода клетки мало изменились. Через 6 месяцев пребывания в этих средах под воздействием 10 г/л йода они теряли свою ярко-зеленую окраску и приобретали синий цвет. После перенесения в раствор Тамия клетки "приходили в себя" лишь на 8-9 день культивирования, когда начинался их рост. В двух других вариантах после интенсивного культивирования на аппарате УИВ продуктивность клеток полностью восстанавливалась за 7 дней.

Таблица. Влияние различных концентраций йода на продуктивность хлореллы

Варианты, концентрация йода, мг/л	Количество клеток	Продуктивность, выход биомассы		
	млн/мл	%	г/л	%
Раствор Тамия (контроль)	270	100	2,20	100
Раствор Тамия + 5	250	104	2,11	96
Раствор Тамия + 10	280	104	2,20	100
Раствор Тамия + 20	280	104	2,11	96
Раствор Тамия + 30	270	100	2,15	97
Раствор Тамия + 50	200	74	1,85	84

Полученные результаты свидетельствуют о высокой адаптационной способности хлореллы к повышенному содержанию йода в среде и приводят к мысли о необходимости продолжения исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Владимиров М.Г., Семенов В.Г. Интенсивная культура одноклеточных водорослей. М., 1962.
2. Микаелян К.А. Автореф. канд. дисс., Ереван, 1970.
3. Пятая Всесоюзная конф. по водной токсикологии, Одесса, 18-22 апр. 1982. Тез. докл. М., 1983.
4. Сдут Р., Уиттик А. Основы альгологии, М., 1990.
5. Damall B., Green B., et al. Trace Metal Removal in Aqueous Soln.: Proc. Symp. Ann. chem. Congr., Warwick, 9th-10th Apr., 1986, London.
6. Favalori Hedayat M.A., Mazzo Z., Ferrari G., Gerola F.G., J. Electron. Microsc., 35, 3259-3260, 1986.

Поступила 6.II.1995

Хреник

Биспог. журн. Армении, 1(48), 1995

РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ДЕПОНИРОВАНИЯ МИКРОБОВ АРМЕНИИ

Постановлением Правительства Республики Армения от 3 декабря 1993г. создан Республиканский центр депонирования микробов (РЦДМ). Центр организован на базе Коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении и размещается на его территории и рабочих площадях. Центр подчинен НАН и Министерству образования и науки Армении.

Основными задачами Центра являются:

- сбор, хранение и изучение культур непатогенных микроорганизмов, имеющих научно-практическое значение;
- обеспечение культурами микробов научных, производственных и учебных учреждений;
- разработка новых эффективных методов сохранения и консервации жизнеспособности и специфической биохимической активности культур микробов;
- создание и функционирование компьютеризированного банка данных микроорганизмов;
- депонирование и хранение патентного фонда непатогенных микробных штаммов;
- создание Национального каталога непатогенных культур микроорганизмов.

Согласно указанному постановлению Правительства, на Центр возлагаются функции государственного депозитария патентных и других непатогенных штаммов научно-производственного значения.

Центр должен осуществлять работы по установлению международных связей с коллекциями культур разных стран по обмену штаммами и информацией, обеспечению деятельности других коллекций микроорганизмов Армении, подготовке кадров и изданию научно-методических материалов.

Создание РЦДМ знаменует крупную веху в развитии микробиологии, биотехнологии и смежных отраслей науки и промышленности в Армении. На данном этапе его организация означает создание Национальной коллекции и Банка данных культур микроорганизмов Армении.

На базе РЦДМ планируется развитие работ по организации коллекции культур клеток и тканей растений и животных. Таким образом, Центр станет государственным хранилищем генетического фонда организмов, накопленного в Армении.

В настоящее время в Коллекции поддерживается более 6 000 хорошо изученных и идентифицированных штаммов бактерий, дрожжей, грибов, актино-мицетов. Культуры хранятся систематическими пересевами на питательных средах, в лиофилизированном состоянии и под минеральным маслом. Институт располагает установкой для получения жидкого азота в целях консервации культур в условиях глубокого холода.

Коллекция содержит:

- более 3 000 культур спорообразующих бактерий, в том числе около 2000 штаммов энтеропатогенных бацилл,
- более 1 500 культур неспоровых бактерий, в том числе около 1000 штаммов фитопатогенных, азотфиксирующих и литохемосинтотрофных бактерий,
- около 1000 культур грибов, включая штаммы-биоразрушители синтетических и природных полимеров,
- 500 культур дрожжей и молочнокислых бактерий,
- 200 культур актиномицетов.

На основе характеристики морфофизиологических и биохимических свойств создан компьютеризованный Банк данных.

Банк данных включает следующие базы: "Каталог", "Код" и "Паспорт". База "Каталог" послужила основой Каталога культур аэробных спорообразующих бактерий, ныне подготовленного для публикации. Остальные базы предназначены для поиска штаммов с заданными свойствами и характеристики новых.

Подготовлены исходные данные и программы для нумерической таксономии с выбором дескрипторов отдельных групп микробов.

Для ввода информации о номенклатуре, происхождении, особых свойствах и т.п. используются специально разработанные стандартные листы SCC-4.

Для ввода свойств штаммов в базу "Паспорт" применяются стандартные кодировочные листы, отражающие необходимые дескрипторы (цифровой шифр плюс признак по РКС-коду 1986 года).

Банк данных по штаммам микроорганизмов функционирует на технических средствах IBM-PC PS/2 под управлением операционной системы MS DOS. База данных поддерживается системой R:base, на основе которой разработана программа "Микроб", с учетом требований Международной сети микробных данных (MSDN - Microbial Strain Data Network).

Коллекция содержит значительное число оригинальных и уникальных штаммов экстремофильных форм бацилл и других групп микроорганизмов, выделенных из различных эколого-географических регионов мира. В Коллекции поддерживаются новые виды и разновидности разных групп микробов, выделенные и изученные в Армении.

При изучении культур микробов важное значение придавалось характеристике их ферментативных свойств и возможностям использования для биохатализа с целью получения различных физиологически активных

веществ. Для указанных работ создан специализированный банк данных с поисково-аналитической системой.

РЦДМ проводит в настоящее время большую работу по дуплицированию

накопленного в течение многих лет в Республике обширного фонда хорошо изученных культур микроорганизмов. Находятся тесные связи с Коллекциями культур СНГ и других стран.

С удовлетворением надо отметить, что тематика работ Центра включает и гранты от МНФ (Сороса) и ассоциации ИНТАС Европейского сообщества.

В соответствии с Соглашением о сотрудничестве РЦДМ выполняет программу научно-производственных работ в интересах ТОО А-М Холдинг, Москва, Россия, которое оказывает Центру значительную финансовую поддержку.

Акроним Коллекции: РЦДМ, корреспондент - Э.К. Африкян

Адрес: 378510 г. Абовян, Аренинское шоссе, Республика Армения

Телефон 8(88561)23240

Телетайп (Академия наук): 243344 Орион

Э-почта - microbio@pnas.sci.am

Э.К.Африкян, А.А.Хачатурян, А.Е.Арутюнян