

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՍԱՐԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
АРМЕНИИ

BIOLOGICAL JOURNAL
of ARMENIA

Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԿԵՆՍԱՐԱՆԱԿԱՆ
ՀԱՆԴԵՍ

Հատոր 53, 1-2, 2001

БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ЖУРНАЛ АРМЕНИИ

BIOLOGICAL JOURNAL
of ARMENIA

Том 53, 1-2, 2001

Volume 53, 1-2, 2001

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես, 2001

© Биологический Журнал Армении, 2001

Biological Journal of Armenia, 2001

Выходит с 1948 года на армянском, русском и английском языках

«Հայաստանի կենսաբանական հանդեսը» հրատարակվում է Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիայի կողմից և տպագրում է հոդվածներ բուսաբանության, կենդանաբանության, ֆիզիոլոգիայի, կենսաքիմիայի, կենսաֆիզիկայի, կենսատեխնոլոգիայի, միկրոբիոլոգիայի, գենետիկայի և ընդհանուր ու կիրառական կենսաբանության այլ ընդհանուր Վերաբերյալ:

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

“Biological Journal of Armenia” is functioning under the auspice of the National Academy of Sciences of Armenia and publishes original papers in botany, zoology, physiology, biochemistry, biophysics, microbiology, biotechnology, genetics and other fields of general and applied biology.

Editor - in chief - E.G. Afrikan Executive Secretary - R.H.Papanyan

Խմբագրական կոլեգիա Է.Գ.Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ծ.Մ.Ավագյան, Հ.Գ.Բակլավաջյան, Մ.Ա.Դավթյան, Ժ.Բ.Հակոբյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ), Ռ.Մ.Հարությունյան, Վ.Հ.Դավարյան, Պ.Ա.Դանդիլյան, Կ.Գ.Դարազյուզյան, Ս.Խ.Մայրապետյան, Ս.Հ.Մովսիսյան, Ռ.Հ.Պապանյան (պատասխանատու քարտուղար)

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է.Գ. Աֆրիկյան (նախագահ), Ա.Ս.Աղաբալյան, Յու.Թ.Ալեքսանյան, Է.Ց.Գաբրիելյան, Ա.Ա.Գալոյան, Ա.Լ.Թախտաջյան, Պ.Ա.Խորշոդյան, Բ.Տ.Նարիքչանյան, Կ.Ս.Պողոսյան, 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.Папаян (ответственный секретарь)

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

Պոլանավոր՝ Զ. Պարսեկյան (ԱՄՆ)

Спонсор: А. Парсекян (США)

Sponsor: H. Parsekian (USA)

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

UDK 579.846

ОКИСЛЕНИЕ СЕРЫ И ЖЕЛЕЗА ШТАММАМИ ТЕРМОАЦИДОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ В МИКСОТРОФНЫХ УСЛОВИЯХ

Н.С. ВАРДАНЯН*, А.В. ГАСПАРЯН**, В.П. АКОПЯН*

**Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян*

***Республиканский центр депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки Республики Армении. 378510, г. Абовян*

Штаммы термоацидофильных бактерий 69 и 86 способны расти хемолитоавтотрофно. Однако рост бактерий и окисление Fe^{2+} и S^0 стимулируются в миксотрофных условиях в присутствии органических веществ. Показано, что глюкоза в зависимости от ее концентрации может ускорить или ингибировать окисление Fe^{2+} и S^0 . Глутаминовая кислота в концентрации 0,02-0,1% стимулирует окисление Fe^{2+} . Установлено частичное потребление глутаминовой кислоты указанными штаммами. Аланин, пировиноградная кислота, а также раствор витаминов не оказывают заметного влияния на окисление Fe^{2+} при росте штаммов в миксотрофных условиях. Изученные штаммы в отличие от типовых штаммов сульфобацилл не способны расти хемоорганотрофно на дрожжевом экстракте, глюкозе, аланине и пировиноградной кислоте. Гетеротрофный рост бактерий способна поддерживать только глутаминовая кислота.

Թերմոափոխիչի բակտերիաների շտամները 69 և 86 ընդունակ են աճելու քսիլոթուրոֆ պայմաններում, սակայն նրանց աճը Fe^{2+} ու S^0 -ի օքսիդացումը խթանվում են միջտուրոֆ պայմաններում օրգանական նյութերի առկայությամբ: Պարզվել է, որ գլյուկոզը կոնցենտրացիայից կախված կարող է արագացնել կամ արգելակել Fe^{2+} ու S^0 -ի օքսիդացումը: Գլյուտամինաթթուն 0,02-0,1% կոնցենտրացիաների միջակայքում խթանում է Fe^{2+} -ի օքսիդացումը, ընդ որում նկատվել է գլյուտամինաթթվի մասնակի օգտագործում նշված շտամների կողմից: Այսինքն, պիրոֆաղոդաթթուն, ինչպես նաև վիտամինների լուծույթը եական ազդեցություն Fe^{2+} -ի օքսիդացման վրա չեն թողնում: Ուսումնասիրված շտամները, հ տարբերություն սուլֆոբացիլների տիպային շտամների, ընդունակ չեն աճելու քսնոթուրոֆ պայմաններում խմորասնկային էքստրակտի, գլյուկոզի, ալանինի և պիրոֆաղոդաթթվի առկայությամբ: Բակտերիաների հետտուրոֆ աճը կարող է ապահովվել միայն գլյուտամինաթթուն:

Isolated strains 69 and 86 of thermoacidophilic bacteria are capable to grow under chemolithotrophic conditions, but growth, as well as Fe^{2+} and S^0 oxidation is stimulated in presence of organic substances. Glucose, depending on its concentrations can accelerate or inhibit Fe^{2+} and S^0 oxidation. Glutamic acid in range of concentrations from 0,02 to 0,1% stimulates Fe^{2+} oxidation. The partial utilization of glutamic acid is observed. Alanine, pyruvic acid, as well as solution of vitamin's mixture are not affected on Fe^{2+} oxidation during growth of

strains under mixotrophic conditions. The strains studied, in difference with type strains of *Sulfobacillus*, cannot grow under chemorganotrophic conditions on yeast extract, glucose, alanine and pyruvic acid. Glutamic acid can only support heterotrophic growth of these strains.

Бактерии термоацидофильные - окисление серы и железа

Термоацидофильные бактерии рода *Sulfobacillus* способны расти литоавтотрофно за счет окисления элементарной серы, двухвалентного железа и сульфидов металлов [1, 5]. Однако для оптимального роста и максимальной окислительной активности эти бактерии нуждаются в присутствии в среде органических веществ [7, 8]. О преимуществе миксотрофных условий как для роста этих бактерий, так и с точки зрения эффективности выщелачивания ими металлов, указывается в ряде работ [2, 10]. Тем не менее роль органических веществ, а также вопрос об их использовании сульфобациллами в миксотрофных условиях до настоящего времени остается не в полной мере изученным.

Целью нашего исследования являлось изучение влияния некоторых органических веществ на окисление S^0 и Fe^{2+} и возможности их использования штаммами сульфобацилл, выделенными нами из сульфидных месторождений Армении, в качестве источников энергии.

Материал и методика. Объектом исследования служили выделенные и описанные нами ранее шт. 86, 69 термоацидофильных бактерий, а также типовой штамм *Sulfobacillus thermosulfidooxidans subsp. asporogenes* 41. Бактерии выращивали на среде Браерли при 50° [3]. В качестве источника энергии использовали порошковую серу или закисное железо. Опыты проводили в 250 мл колбах, заполненных 50 мл среды, на качалке при 180 об/мин.

Для исследования миксотрофного роста к среде добавляли также дрожжевой экстракт, глюкозу, глутаминовую кислоту, аланин и пировиноградную кислоту в разных концентрациях в зависимости от поставленной цели.

Хемоорганотрофный рост бактерий изучали на среде, содержащей 0,1% вышеупомянутых органических веществ в качестве единственного источника энергии.

В опытах использовали отмытые клетки указанных штаммов. Штаммы бактерий выращивали на вышеуказанной среде, содержащей закисное железо в качестве источника энергии. В логарифмической фазе роста клетки собирали центрифугированием при 7000 g в течение 15 мин. Затем их дважды отмывали средой, подкисленной до pH 2,0. Далее навеску сырой биомассы ресуспендировали в той же среде и вносили в колбы в равных количествах.

Количество клеток в среде определяли методом десятикратных предельных разведений. Наиболее вероятное число клеток рассчитывали по таблице Мак-Креди [8].

Рост бактерий в хемоорганотрофных условиях оценивали турбидометрическим методом по мутности на ФЭК 56М.

Об интенсивности окисления серы судили по количеству образовавшегося сульфата, последний определяли спектрофотометрическим методом [11].

Количество ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли отдельно комплексонометрическим методом трилоном Б [9]. Удельную железоокисляющую активность штаммов рассчитывали как количество Fe^{3+} , окисленное 1 мг биомассы.

Глюкозу определяли методом Шомоди-Нельсона [13], а также методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:3:3), проявитель - раствор анилинфталата.

Аминокислоты определяли методом тонкослойной хроматографии в системе н-бутанол - уксусная кислота - вода (60:20:20), проявитель - 0,1%-ный раствор нингидрина.

Опыты проводили в трехкратной повторности. Данные обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение. Окисление S^0 . Автотрофный рост выделенных штаммов на среде с элементарной серой выражен слабо (рис. 1). Однако добавление к среде 0,02% дрожжевого экстракта приводит к

ускорению окисления серы, проявляющегося в активном образовании SO_4^{2-} и резком снижении pH среды. Установлено, что в отношении окисления серы в миксотрофных условиях наиболее активен шт.86: за 11 дней культивирования шт. 41, 69 и 86 в стационарных условиях на среде с серой в присутствии дрожжевого экстракта образовалось 3,5; 4,2; 12.9 г/л SO_4^{2-} соответственно. При этом реакция среды снижалась от pH 3,1 до 2,2; 2,1 и 1,75 соответственно (рис. 1).

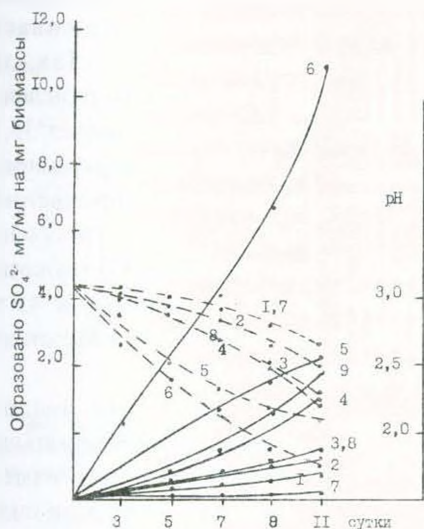


Рис. 1. Окисление S шт.41, 69 и 86: 1, 2, 3 - в автотрофных условиях; 4, 5, 6 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта; 7, 8, 9 - в присутствии 0,1% глюкозы. — образование SO_4^{2-} , --- изменение pH

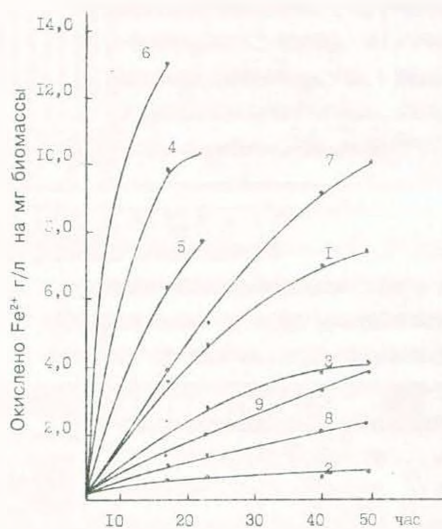


Рис. 2. Окисление Fe^{2+} шт.41, 69 и 86: 1, 2, 3 - в автотрофных условиях; 4, 5, 6 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта; 7, 8, 9 - в присутствии 0,2% глюкозы.

Влияние глюкозы на окисление S^0 в миксотрофных условиях изучалось при ее концентрации 0,1%. Из рис. 1 видно, что окисление серы в присутствии глюкозы подавляется у шт. 41, почти не меняется у шт.69 и стимулируется в 2,6 раза у шт. 86.

Окисление Fe^{2+} . Исследование показало, что все три штамма выделенных термоацидофильных бактерий способны расти литоавтотрофно, используя двухвалентное железо как источник энергии и CO_2 в качестве источника клеточного углерода. Однако добавление дрожжевого экстракта стимулирует окисление Fe^{2+} (рис.2). Так, в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта количество окисленного Fe^{2+} /мг биомассы за 17 ч увеличивается в 2,7; 5,6; 10,6 раз у шт. 41, 69 и 86 соответственно. При этом, как видно из рисунка, высокой активностью в отношении окисления Fe^{2+} в миксотрофных условиях вновь выделяется шт. 86.

Интересные данные получены при росте бактерий на среде с Fe^{2+} в миксотрофных условиях в присутствии 0,2% глюкозы. Показано, что в этих условиях удельная железоокисляющая активность подавляется у шт. 86 на 14,2%, а у шт. 69 и 41 она стимулируется на 18,2 и 30,5%

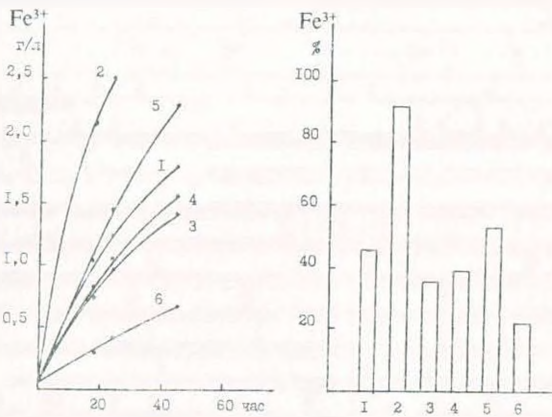


Рис. 3. Динамика окисления Fe^{2+} шт. 69: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта и глюкозы в концентрации 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %

против 45,9% в условиях автотрофного роста. В присутствии 0,2% глюкозы наблюдается стимулирование окисления Fe^{2+} до 53,1%, которое к 45 ч культивирования бактерий достигает 83,7%, в то время как в отсутствие органических добавок этот показатель не превышает 62%.

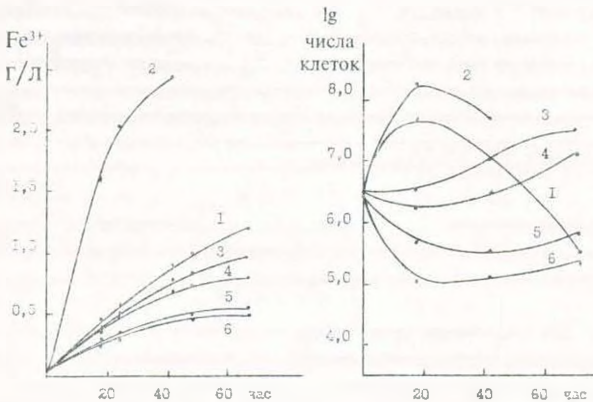


Рис. 4. Окислению Fe^{2+} старой (5-дневной) культурой шт. 69: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта при содержании глюкозы в концентрации 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %.

инокулята. При использовании более старой (5-дневной) культуры шт.69 в качестве посевного материала глюкоза в концентрациях от 0,05 до 0,5% ингибировала окисление Fe^{2+} и рост бактерий (рис. 4). По-видимому, с возрастом бактериальные клетки теряют способность к использованию экзогенного источника углерода - глюкозу. Это может быть связано и с тем, что кислородные соединения Fe^{3+} (ярозиты), сорбируясь на поверхности бактериальных клеток, затрудняют процесс диффузии питательных веществ в клетку. Отрицательное влияние ярозитов на жизнедеятельность бактерий было отмечено при бактериальном выщелачивании медьсодержащих сульфидных руд бактериями *Thiobacillus ferrooxidans* [12].

соответственно (рис. 2).

На рис. 3 представлена динамика окисления Fe^{2+} шт. 69 в миксотрофных условиях в присутствии разных концентраций глюкозы. Видно, что при низких концентрациях глюкоза задерживает окисление Fe^{2+} . Так, за 24 ч количество окисленного Fe^{2+} составляет 35,7 и 38,8% при содержании в среде соответственно 0,05 и 0,1% глюкозы

При этом анализ питательной среды в конце опыта заметных изменений в концентрации глюкозы в вариантах с 0,05 и 0,1% ее содержания не выявил. Однако в присутствии 0,02 мг/мл (0,2%) глюкозы через 48 ч культивирования бактерий ее содержание в среде составляет всего 0,016 мг/мл.

Следует отметить, что влияние глюкозы на окисление Fe^{2+} зависит также от возраста

Глюкоза вызывает также некоторое ускорение окисления Fe^{2+} у шт. 86 при росте в миксотрофных условиях. За 42 ч культивирования этих бактерий окислялось 28% внесенного в среду Fe^{2+} при автотрофном росте и 34,5 и по 33,6% в присутствии 0,05; 0,1 и 0,2% глюкозы соответственно. При содержании в среде 0,5% глюкозы рост бактерий и окисление Fe^{2+} подавляются (рис. 5)

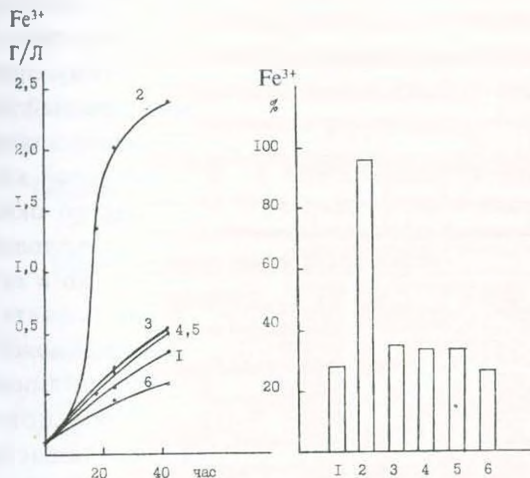


Рис. 5. Окисление Fe^{2+} шт. 86: 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта в присутствии глюкозы в концентрации: 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,2 %, 6 - 0,5 %.

вызывает некоторое ускорение его в случае со шт. 69.

Влияние аминокислот. Аланин в концентрации 0,1% почти не действовал на окисление Fe^{2+} шт. 86 при миксотрофном росте, а при культивировании шт. 69 в присутствии этой кислоты наблюдалось некоторое увеличение количества окисленного Fe^{2+} по сравнению с таковым в

условиях автотрофного роста (рис. 6). Однако при этом, по данным тонкослойной хроматографии, заметного уменьшения количества аланина в среде не зафиксировано. Следовательно, экзогенный аланин или вовсе не усваивается выделенными штаммами или усваивается очень слабо.

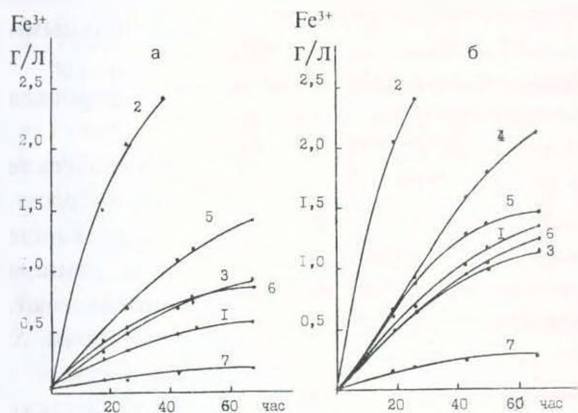


Рис. 6. Влияние витаминов и аминокислот на окисление Fe^{2+} шт. 69 (а) и шт. 86 (б): 1 - в автотрофных условиях; 2 - в присутствии 0,02% дрожжевого экстракта при содержании в среде: 3 - смеси витаминов, 4 - 0,1 % глутаминовой кислоты, 5 - 0,2 % глутаминовой кислоты, 6 - 0,1 % аланина, 7 - 0,1 % пировиноградной кислоты.

Г л у т а м и н о в а я кислота вызывает стимуляцию окисления Fe^{2+} обоими штаммами (рис.6). За 43 ч

культивирования в присутствии в среде 0,1% глутаминовой кислоты шт.69 окислено 1,09 г/л Fe^{2+} против 0,47 г/л при автотрофном росте и 1,57 г/л Fe^{2+} шт.86 против 1,04 г/л в автотрофных условиях. Однако при содержании в среде 0,2% глутаминовой кислоты количество окисленного шт. 86 Fe^{2+} значительно ниже и составляет лишь 1,3 г/л. Поэтому с целью выявления оптимальной концентрации глутаминовой кислоты окисление Fe^{2+} изучалось при ее содержании в среде от 0,02 до 0,1 %. Как видно из рис. 7, глутаминовая кислота во всех изученных концентрациях стимулирует окисление Fe^{2+} и рост шт. 86. Однако оптимальной концентрацией для роста бактерий и окисления Fe^{2+} является 0,05%. При внесении в среду

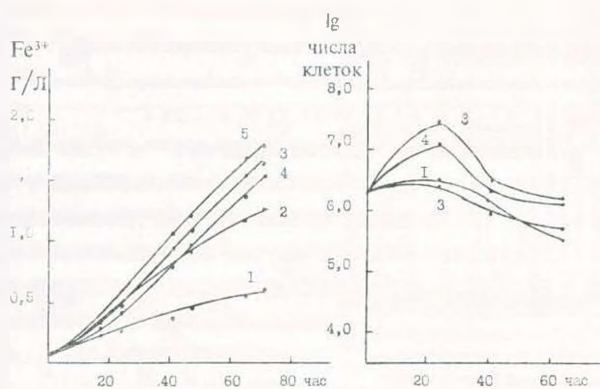


Рис. 7. Окисление Fe^{2+} шт. 86: 1 - в автотрофных условиях в присутствии глутаминовой кислоты в концентрации 2 - 0,02 %, 3 - 0,05 %, 4 - 0,1 %, 5 - 0,1 % + смесь витаминов.

0,1% глутаминовой кислоты количество окисленного железа не только не возрастает, но и несколько уменьшается. При совместном присутствии в среде витаминов и 0,1% глутаминовой кислоты наблюдается заметное улучшение обоих показателей.

По данным тонкослойной хроматографии, количество глутаминовой кислоты в среде уменьшается в той или иной степени в зависимости от ее первоначальной концентрации, внесенной в среду при миксотрофном росте. Очевидно, что она используется бактериями при миксотрофном росте на среде с Fe^{2+} . В ряде работ показано, что внесенный в среду углерод в виде органического субстрата может частично потребляться умеренно термофильными бактериями в процессе миксотрофного роста [13, 14].

Пировиноградная кислота в концентрации 0,1% ингибировала окисление Fe^{2+} шт. 69 и 86 (рис. 6).

Далее изучалась способность штаммов использовать органические вещества в качестве источника энергии, т.е. к хемоорганотрофному росту. С этой целью выделенные штаммы были высеяны на среды, содержащие по 0,1% дрожжевого экстракта, глюкозы, глутаминовой кислоты, аланина и пировиноградной кислоты. Приведенные в табл. 1 данные показывают, что ни один из этих штаммов, включая также типовой штамм *S. thermosulfidooxidans* шт. 41, не способны расти гетеротрофно на среде с глюкозой. В средах с L-α-аланином, L-глутаминовой кислотой, а также с дрожжевым экстрактом штаммы проявляют слабый рост, который полностью прекращается при 2 и 3 пассажах. В отличие от выделенных штаммов типовой штамм *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 дает хороший рост на среде, содержащей в качестве единственного источника энергии

глутаминовую кислоту и дрожжевой экстракт.

Таким образом, изученные шт. 69 и 86, а также аспорогенный подвид *S. thermosulfidooxidans* шт. 41 не способны к хемоорганотрофному росту за счет окисления органических веществ, таких, как глюкоза, дрожжевой экстракт, глутаминовая кислота, аланин, пировиноградная кислота. Причиной этого может быть отсутствие эффективных путей катаболизма (полного окисления) органических соединений. Так, при изучении метаболизма углерода у *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В-1269 установлены отсутствие глиоксилатного шунта и ограниченная возможность действия цикла трикарбоновых кислот [6].

Таблица 1. Хемоорганотрофный рост *S. thermosulfidooxidans* ВКМ В - 1269, *S. thermosulfidooxidans* шт.41 и изучаемых штаммов 69 и 86 (рН 3,0)

Штаммы	Оптическая плотность				
	Л-α-ала	Л-глу	ПВК	Дрожжевой экстракт	Глюкоза
<i>S. thermosulfidooxidans</i> ВКМ В-1269	0,01	0,13	0,005	0,13	0,03
<i>S. thermosulfidooxidans</i> шт.41	0,025	0,03	0,005	0,032	0,025
шт.69	0,020	0,022	0,005	0,04	0,025
шт.86	0,025	0,022	0,002	0,02	0,02

Что касается стимулирования роста бактерий и окисления Fe^{2+} в присутствии вышеуказанных органических веществ, то это можно объяснить их возможным использованием в конструктивном обмене в качестве дополнительного к углекислоте источника углерода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вартамян Н.С. Биолог. журн. Армении, 49, 1-2, 43-46, 1996.
2. Вартамян Н.С., Каравайко Г.И., Пивоварова Т.А. Микробиология, 59, 3, 411-417, 1990.
3. Вартамян Н.С., Пивоварова Т.А., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 57, 2, 268-274, 1988.
4. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии, М., Мир, 1983.
5. Головачева Р.С., Каравайко Г.И. Микробиология, 47, 5, 815-822, 1978.
6. Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Микробиология, 63, 4, 573-580, 1994.
7. Красильникова Е.Н., Богданова Т.И., Захарчук Л.М., Цаплина И.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 67, 2, 156-164, 1998.
8. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А. Микробиология, 34, 3, 309-315, 1998
9. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., Недра, 1970.
10. Цаплина И.А., Богданова Т.И., Саякин Д.Д., Каравайко Г.И. Микробиология, 60, 6, 34-40, 1991.
11. Dodgson R.S. Biochem. J., 78, 312-319, 1961.
12. Porro S., Boiardi J.L., Tedesco P.H. Rev. Metal, 24, 5, 297-302, 1988.
13. Somogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.
14. Wood A.P., Kelly D.P. FEMS Microbiol. Lett., 20, 107-,1983.

Поступила 27.V.1999

РОЛЬ ζ -ПОТЕНЦИАЛА, ЖИРНЫХ КИСЛОТ И СУБМИКРОННЫХ КАПЕЛЬ Н-АЛКАНОВ В МЕХАНИЗМЕ ТРАНСПОРТА СУБСТРАТА В КЛЕТКИ АЛКАНУТИЛИЗИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ

П. Г. ГАНИН*, Е. В. КОМАРОВ**

*Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, 197376, Санкт-Петербург, Россия

**Научно-исследовательский технологический институт антибиотиков и ферментов медицинского назначения, 198020, Санкт-Петербург, Россия

Исследование посвящено уточнению причин доминирующей роли субмикронных капель субстрата в процессе роста дрожжей на н-алканах. На модельных системах культуральной жидкости алканутилизирующих дрожжей исследован ζ -потенциал капель н-алканов, сформированный жирными кислотами. Установлено, что ζ -потенциал субмикронных капель способен препятствовать коагуляции с клетками, обладающими высоким ζ -потенциалом. Связь ζ -потенциала клеток с их физиологическим состоянием позволяет предполагать возможность регулирования транспорта субстрата из субмикронных капель.

Հետազոտությունը նվիրված է ն-ալկանների վրա շաքարասնկերի աճի պրոցեսում սուբստրատի սուբմիկրոնային կաթիլների գերիշխող դերի պատճառների ճշտմանը: Հետազոտվել է ճարմաբանների կողմից առաջացող ն-ալկանների կաթիլների ζ -պոտենցիալը: Իսկանյութացնող շաքարասնկերի կուլտուրալ հեղուկի մոդելային համակարգերի վրա: Պարզվել է, որ սուբմիկրոնյան կաթիլների ζ -պոտենցիալը ընդունակ է խոչընդոտել կոագուլյացիան բարձր ζ -պոտենցիալ ունեցող բջիջների հետ: Բջիջների ζ -պոտենցիալի կապը նրանց ֆիզիոլոգիական վիճակի հետ թույլ է տալիս ենթադրել սուբմիկրոնային կաթիլներից սուբստրատի տրանսպորտի կարգավորման հնարավորությունը:

The study is dedicated to clarifying of predominate role of substrate submicron droplets in the yeast grown on n-alkanes. ζ -Potential of fatty acids formed n-alkane droplets is investigated for model systems of the alkane-utilizing yeast cultural medium. ζ -Potential of submicron droplets able to prevent coagulation with high ζ -potential cells is shown. Correlation between cell ζ -potential and physiological state allows to propose the possibility of substrate transport controlling from submicron droplets.

ζ -потенциал - жирные кислоты - коагуляция - н-алканы нефти - дрожжи - механизм транспорта

Концентрационная зависимость субстратзависимых процессов при глубинных условиях развития микроорганизмов на жидких гидрофобных органических соединениях, ввиду их нерастворимости в воде, имеет выраженную специфику. Ключевым элементом в понимании процессов развития микроорганизмов на таких соединениях является установление механизма транспорта субстрата в клетку. Таким типичным гидрофобным субстратом являются н-алканы нефти. Многие виды дрожжей рода *Candida*, *Torulopsis* и *Rhodotorula* способны утилизировать н-алканы и использовать их в качестве единственного источника углерода и энергии [3].

Для жидких н-алканов предполагаются различные механизмы транспорта в клетки дрожжей [18]. Специфика процессов затрудняет его

прямую экспериментальную проверку, и среди исследователей нет на этот счёт единого мнения [4]. В большинстве работ о механизме транспорта н-алканов судят по косвенным данным, в первую очередь - по скорости роста микроорганизмов, предполагая лимитирующей стадией - скорость его поступления в клетку. Представление эффективной концентрации н-алканов через величину поверхности раздела фаз субстрат-среда достаточно близко, хотя не в полной мере соответствует экспериментальным данным. Выявлена доминирующая роль субмикронных капель н-алканов в обеспечении роста дрожжей, что содержит определенное противоречие между представлениями о механизме транспорта субстрата и субстратной зависимостью роста. Этот феномен неоднозначно трактуется исследователями [8, 16, 17, 19].

В процессе развития дрожжей на жидких н-алканах в культуральной среде накапливаются продукты неполного окисления субстрата (жирные кислоты и спирты), обладающие свойствами поверхностно активных веществ (ПАВ). Интенсивному росту дрожжей предшествуют максимальное накопление биогенных ПАВ (жирных кислот - 50-200 мг/л), формирование мелкодисперсной устойчивой эмульсии, солюбелизация субстрата [13]. Добавление в культуральную среду каталитических концентраций жирных кислот (50-200 мг/л) оказывает выраженное ростстимулирующее действие [2]. В рамках существующих представлений положительное влияние жирных кислот, субмикронных капель субстрата, интенсивности механического перемешивания среды рассматриваются как факторы, повышающие доступность н-алканов клеткам микроорганизмов. Однако добавление жирных спиртов практически не улучшает ростовых показателей [2].

Широко известно ингибирование роста дрожжей повышенными концентрациями "традиционных" для микроорганизмов субстратов. Это связано с тем, что, как правило, у микроорганизмов нет выраженного "ростового контроля" в потреблении энергосодержащего субстрата [7]. Угнетение роста дрожжей имеет место и повышенными концентрациями н-алканов [1], что в рамках принятого формализма можно связать с увеличением среднего размера капель субстрата.

При развитии микроорганизмов на н-алканах различают три группы клеток: адсорбированные на крупных каплях субстрата, сорбирующие на своей поверхности мелкие капли и неконтактирующие с каплями клетки. Выраженная гетерогенность культуральной среды свидетельствует о различной обеспеченности клеток субстратом. Высокое сорбционное сродство дрожжевых клеток к н-алканам (неэмульгированных ПАВ), поступление которого происходит пассивнодиффузионным путем [5], а насыщение достигается достаточно быстро [15], допускает возможность ингибирования роста части клеток популяции. В этой связи, ростстимулирующее влияние различных факторов необходимо проанализировать и с точки зрения ограничения поступления н-алканов.

Динамика адсорбционных свойств дрожжевых клеток и влияние жирных кислот на адсорбционные свойства капель н-алканов могут быть

определяющими в регулировании контактных взаимоотношений клеток с каплями *n*-алканов и в процессе транспорта субстрата. Известно, что ζ -потенциал дрожжевых клеток изменяется в широких пределах в зависимости от скорости роста культуры [12]. Это предполагает связь ζ -потенциала с физиологическим состоянием клеток, фазой клеточного цикла и потребностью в субстрате. Клетки с высоким (по абсолютной величине) ζ -потенциалом (от -35 до -55 мВ) не образуют агрегатов между собой, с воздушными пузырями и каплями *n*-алканов [10]. ζ -Потенциал капель и воздушных пузырей и роль жирных кислот в работе не изучены. В исследованиях, посвящённых изучению механизма транспорта *n*-алканов в клетки микроорганизмов, влиянию ПАВ на транспорт субстрата и ростовые показатели, не рассматривается влияние ПАВ на адсорбционные свойства капель субстрата. Мы предположили, что особая роль субмикронных капель *n*-алканов может состоять в их достаточно высоком $|\zeta|$ -потенциале, сформированном жирными кислотами, позволяющем ограничивать адсорбцию капля-клетка и поступление субстрата в клетки.

Целью настоящей работы являлись определение ζ -потенциала капель *n*-алканов в системе, моделирующей условия развития алканутилизующих дрожжей, а также теоретическая оценка роли ζ -потенциала и жирных кислот в ограничении адсорбции субмикронных капель субстрата клетками.

Материал и методика. Объектом исследования служила система, моделирующая состав культуральной среды и условия выращивания дрожжей на *n*-алканах. Минеральный состав среды (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 3.5; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ - 0.8; KCl - 0.5; MgSO_4 - 0.25; микроэлементы (мг/л): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12.5; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 12.5; $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 12.5. В различных модельных системах в среду добавляли: *n*-алканы (гексадекан) - 5 и 20 г/л; жирные кислоты: пальмитиловую - 0.1 и каприновую - 0.2 г/л. В экспериментах использовали водопроводную воду, pH среды раствором 1М HCl доводили до 4.0. Моделирование условий культивирования дрожжей осуществляли в лабораторном ферментаторе "BIOSTATE" ("B. Braun", Германия) объёмом 5 л, коэффициент заполнения 0.5. Интенсивность вращения ω =500 об/мин (два яруса, 6 лопастей каждый). Принудительной аэрации не производили. Температура среды $T=32^\circ\text{C}$.

Размер капель эмульсии определяли визуально в поле зрения оптического микроскопа с помощью микролинейки. ζ -Потенциал капель рассчитывали по данным их электрофоретической подвижности в миниатюрной электрофоретической ячейке, помещённой в поле зрения оптического микроскопа [12]. Агар-агар для электрофоретической ячейки приготавливали на основе электролита модельной системы (без *n*-алканов и жирных кислот).

Экспериментальные данные подвергали общепринятой статистической обработке [9]. Математическую обработку, подбор эмпирических коэффициентов (по наименьшему среднеквадратичному отклонению от экспериментальных значений) и графические построения производили с помощью персонального компьютера и программы Microsoft Excel (5.0).

Результаты и обсуждение. Модельные системы 1 (рис. 1.1, табл. 1 №1) и 2 (рис. 1.2, табл. 1 №2) по содержанию гексадекана и жирных кислот соответствуют составу культуральной жидкости в экспоненциальной фазе роста и в начале периодического культивирования при добавлении жирных кислот в ростстимулирующей концентрации соответственно. Как следует из представленных экспериментальных данных, ζ -потенциал капель проявлял выраженную зависимость от их размера (рис. 1). Такой характер зависимости обусловлен следующим. Механическое перемешивание определяет диспергирование жидких *n*-алканов в среде. Из термоди-

намических соображений ясно, что химический потенциал n -алканов в каплях различного размера возрастает с уменьшением их диаметра. Эта зависимость описывается уравнением Томсона-Кельвина:

$$\mu_i^r - \mu_i^o = 2\sigma v / r, \quad (1)$$

где μ_i^r и μ_i^o - значения химического потенциала i -того вещества у плоской поверхности и у поверхности с радиусом кривизны r соответственно; σ - поверхностное натяжение на границе раздела фаз; v - парциальный мольный объем вещества; r - радиус капли (радиус кривизны поверхности раздела фаз).

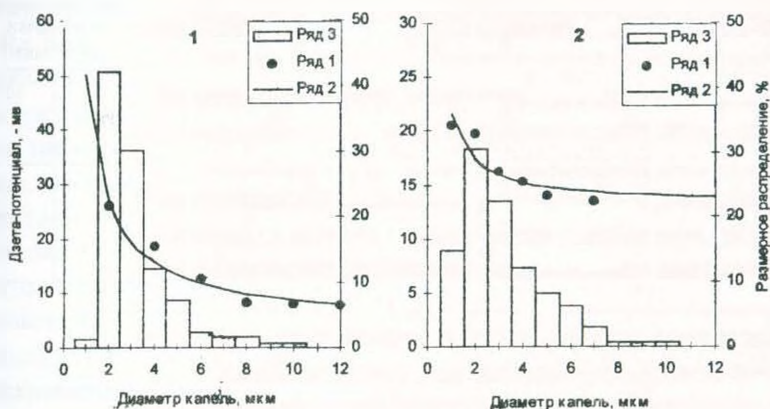


Рис. 1. Зависимость ζ -потенциала капель эмульсии от диаметра и размерное распределение капель для различных модельных систем. Параметры модельных систем приведены в таблице. 1 - экспериментальное значение ζ -потенциала для соответствующего интервала размеров, мВ; 2 - кривая $\zeta=f(d)$ аппроксимирующая экспериментальные значения по уравнению 2, мВ; 3 - размерное распределение капель, %.

Стремление системы к равенству интенсивных параметров ее элементов будет обуславливать соответствующее распределение ПАВ на границе раздела фаз. Наличие в системе ПАВ ионогенной природы приведет к стремлению скомпенсировать различия химического потенциала за счет электрохимической составляющей, следовательно, - различию ζ -потенциалов капель разного размера.

Экспериментальные данные зависимости ζ -потенциала капель от их диаметра (d) удовлетворительно описывались эмпирическим уравнением:

$$\zeta(d) = a + b/d, \quad (2)$$

где $\zeta(d)$ - ζ -потенциала капли диаметром d , мВ; a , мВ и b , мВ · мкм - эмпирические коэффициенты; d - диаметр капли, мкм.

Физический смысл коэффициента a - ζ -потенциал плоской поверхности ($d \rightarrow \infty$) раздела фаз n -алканы - водная среда. Второй член правой части уравнения 2 (с коэффициентом b) отражает влияние кривизны поверхности раздела фаз на величину ζ -потенциала. Эмпирические коэффициенты a и b (табл. 1) проявляли зависимость от параметров модельных систем (компонентного состава среды).

Удовлетворительное аналитическое описание экспериментальных данных и термодинамические соображения позволяют полагать сохранение

тенденции повышения ζ -потенциала с уменьшением размера частиц в интересующей области $d < 1$ мкм, роль которых в обеспечении роста дрожжей доминирует. Это также позволяет аналитически оценить величину ζ -потенциала капле в области ($d < 0.5$ –1 мкм), технически нам недоступной для прямой экспериментальной проверки. Отметим известное ограничение: ζ -потенциал не может превышать предельного значения, оцениваемого ± 120 мВ [11].

Таблица 1. Основные параметры модельных систем

№	Содержание органических соединений		Значения эмпирических коэффициентов		Расчетное значение ζ -потенциала (для d , мкм)	
	алканы, г/л	жирные кислоты, г/л	а, мВ	в, мВ · мкм	($d=0.5$) мВ	($d=0.1$) мВ
1	5.0	0.1	4.21	45.9	96	463
2	20	пальмитиловая 0.2 каприновая	13.1	8.47	30	(125)* 98

Примечание: ожидаемые значения с учетом указанного ограничения.

Известно, что кинетическая устойчивость коллоидов в основном обуславливается ζ -потенциалом частиц и адсорбционно-сольватным барьером. Благодаря взаимосвязи адсорбционно-сольватного барьера с ζ -потенциалом оценка коагуляционной устойчивости может ограничиваться рассмотрением пороговой величины ζ -потенциала [6, 11]. Для эмульсий типа вода-масло пороговая величина ζ -потенциала (минимальное значение, достаточное для превышения сил электростатического отталкивания над силами молекулярного притяжения) идентичных частиц близка к 30 мВ [11].

В рассматриваемом нами случае частицы разнородны: капли алканов и клетки дрожжей различаются по размерам и величине ζ -потенциала. Оценка их устойчивости должна базироваться на теории гетерокоагуляции. Энергия ионно-электростатического отталкивания взаимодействующих частиц может быть рассчитана на основании приближенного уравнения, предложенного Фюрстенау [6, 14]:

$$V_i^s = \frac{\epsilon a_1 a_2 (\psi_{\delta 1}^2 + \psi_{\delta 2}^2)}{4(a_1 + a_2)} \left[\frac{2\psi_{\delta 1} \psi_{\delta 2}}{\psi_{\delta 1}^2 + \psi_{\delta 2}^2} \ln \frac{1 + \exp(-\chi h)}{1 - \exp(-\chi h)} + \ln[1 - \exp(-2\chi h)] \right], \quad (3)$$

где ϵ - диэлектрическая постоянная среды; a_1 , a_2 - диаметры частиц; $\psi_{\delta 1}$, $\psi_{\delta 2}$ - потенциал диффузной части двойного слоя частиц; χ - величина, обратная толщине дебаевской ионной атмосферы; h - расстояние между поверхностями частиц.

Использованное приближение состоит из первых двух членов разложения в ряд функции $V_i^s(h)$. Как отмечают авторы, при рассмотрении частиц, радиус которых значительно превосходит толщину диффузного

слоя, и при относительно низких значениях потенциала ψ_s отклонение значений от расчетных по точной формуле не превышает 10%, если ψ_{s1} , $\psi_{s2} < 75$ мВ.

Толщина дебаевской ионной атмосферы оценивается $3-5 \cdot 10^{-2}$ мкм [11], размер дрожжевых клеток составляет 3-8 мкм. В практических расчетах допускается использование значения ζ -потенциала, поддающееся прямому экспериментальному определению, вместо величины ψ_s [11]. Таким образом, приближенное уравнение в пределах отмеченных отклонений может быть использовано для оценки коагуляции капель размером $d > 0.1$ с клетками дрожжей.

На рис. 2 представлена граница и зона кинетической устойчивости микрообъектов к гетерскоагуляции, построенная на основе уравнения (3) с учетом порога кинетической устойчивости ($|30|$ мВ) идентичных частиц для системы типа вода-масло и равенства $h_k = 1/\chi_k$ - соответствующего граничному условию быстрой коагуляции [11]. Представленные экспериментальные данные зависимости $\zeta(d)$ капель эмульсии н-алканов модельных систем культуральной жидкости, интервал изменения ζ -потенциала дрожжевых клеток (от -10 до -55 мВ [10]) и аналитическая оценка порога гетерокоагуляции свидетельствуют о кинетической устойчивости к коагуляции дрожжевых клеток, обладающих высоким (по абсолютной величине) $|\zeta|$ -потенциалом с субмикронными каплями н-алканов.



Рис. 2. Кинетическая устойчивость к гетерокоагуляции дрожжевых клеток и эмульгированных жирными кислотами капель н-алканов в зависимости от их ζ -потенциала. Прерывистой линией обозначен интервал изменения ζ -потенциала клеток. Сплошная кривая - теоретический порог гетерокоагуляции, построенный по уравнению 3.

н-алканов за счет увеличения поверхности раздела фаз субстрат-среда (вследствие понижения поверхностного натяжения среды жирными кислотами), оценена возможность ограничения поступления субстрата в клетку.

Таким образом, доминирующая роль субмикронных капель н-алканов в обеспечении роста дрожжей может заключаться в их достаточно высоком $|\zeta|$ -потенциале, позволяющем микроорганизмам проявлять физиологический контроль над поступлением субстрата, изменением ζ -потенциала индивидуальных клеток.

Разделяя точку зрения большинства исследователей о контактном механизме транспорта жидких н-алканов в клетки микроорганизмов, предполагающем образование аддукта капля-клетка, мы предположили проявление двоякой регуляторной роли жирных кислот в этом процессе. Помимо повышения эффективной концентрации

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарбалинский В. А., Винаров А. Ю., Волох В. Я. Прикл. биохим. микробиол., 12, 6, 850-854, 1976.
2. Гололобов А. Д., Давидов Е. Р., Разумов О. Б., Рачинский В. В. Прикл. биохим. микробиол., 5, 3, 245-251, 1969.
3. Градова Н. Б., Диканская Э. М., Михалева В.В. Использование углеводов дрожжами. М.: ОНТИТЭИмикробиопром, 120, 1971.
4. Давидова Е. Г., Рачинский В. В. Успехи современной биологии, 88, 2(5), 198-209, 1979.
5. Давидова Е. Г., Рачинский В. В., Сиушева А. Г. Известия ТСХА, 2, 17-23, 1977.
6. Зонтаг Г., Штрэнге К. Коагуляция и устойчивость дисперсных систем. 152, Л., 1973.
7. Иванов В. Н. Энергетика роста микроорганизмов. 140, Киев, 1981.
8. Кафаров В. В., Винаров Ф. Ю., Гордеев Л. С. Моделирование биохимических реакторов. 344, М., 1979.
9. Румшинский Л. С. Математическая обработка результатов эксперимента. 15, М., 1971.
10. Фомченко И. В., Шкоп Я. Я., Цвид Е. Е. Прикл. биохим. микробиол., 23, 4, 486-490, 1987.
11. Фридрихсберг Д. А. Курс коллоидной химии. Л., 1984.
12. Цвид Е. Е., Шкоп Я. Я., Позмогова. И. Н., Шульговская Е. М. Микробиология, 50, 4, 659-664, 1981.
13. Goma G., Parailleux A., Durang G. J. Ferment. Technol., 51, 8, 616-618, 1973.
14. Hogg R., Healy T. W., Fuerstenau D. W. Faraday Soc., 62, 1638, 1966.
15. Kappeli Q., Fiecher A., Finneriy W. R. Adv. Biotechnol. Proc.: 6-th Int. Ferment. Symp., London (Canada), 20-25 July 1980, 1, Toronto, 177-182, 1981.
16. Moo-Young M. Canad. J. Chem. Eng., 53, 113-118, 1975.
17. Moo-Young M., Shimizu T. Biotechnol. Bioeng., 13, 761-778. 1971.
18. Nakahara T., Erickson L. E., Gutierrez J. R. Biotechnol. Bioeng., 19, 9-25, 1977.
19. Yoshida Y., Yamane T. Biotechnol. Bioeng., 16, 635-657, 1974.

Поступила 5.XII.2000

ЭКОЛОГО-МЕДИЦИНСКИЕ И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АДГЕЗИИ МИКРООРГАНИЗМОВ ПРИ БИОПОВРЕЖДЕНИИ ПОЛИМЕРНЫХ МАТЕРИАЛОВ

Р.А.ПЕТРОСЯН*, А.Р.ПЕТРОСЯН**, И.Л.КАЗАНЧЯН***, Э.К.АФРИКЯН***

*Министерство охраны природы Республики Армении, 375002, Ереван

**Центр гигиенического и противоэпидемиологического надзора Минздрава Армении,
378310, г.Эчмиадзин

***Республиканский Центр депонирования микробов НАН и Министерства
образования и науки Республики Армении, 378510, г. Абовян

Изучены молекулярно-кинетические закономерности процессов биообрастания и биоповреждения полимерных материалов с использованием концепции "микрoэкологических ниш" и анализа адгезии микроорганизмов. Установлено, что пусковым механизмом биообрастания служит пассивная адгезия, предшествующая активной адгезии, ответственной за биоразрушение полимерных материалов.

Ուսումնասիրվել են պոլիմերային նյութերի կենսապատվածության և կենսաքայքայման պրոցեսների մոլեկուլալիներտիկ օրինաչափությունները, օգտագործելով «միկրոէկոլոգիական խորշերը» հայեցակարգը և վերլուծելով մանրէների ադիեզիան: Պարզվել է, որ կենսապատվածության սկզբնական մեխանիզմը պասիվ ադիեզիան է, որը նախորդում է պոլիմերային նյութերի կենսաքայքայման պատճառ հանդիսացող ակտիվ ադիեզիային:

Molecular and kinetic regularities of microbial growth and biodeterioration processes of polymeric materials by using of "microecological niches" conception and analysis of adhesion of microorganisms have been studied. It has been found that the passive adhesion is a starting mechanism of microbial growth and precedes active adhesion responsible for biodeterioration of polymeric materials.

Полимерные материалы - адгезия микроорганизмов - биоповреждение - экология

Качество среды обитания, разнообразие и совокупность факторов внешнего воздействия во многом определяют этиологию экологических заболеваний. Они представляют собой самостоятельную область научных исследований, интерес к которым особенно возрос в последние годы [1].

Действием экологических факторов объясняются и сложные механизмы физических, химических и биологических превращений компонентов природной среды, которые приводят к развитию процессов старения [3]. Эти процессы охватывают как живые организмы, так и неживые искусственно созданные компоненты окружающей среды. Так, известно, что постоянно действующее ионизирующее облучение вызывает повреждение генетического аппарата, подавление клеточного деления и иммунитета, развитие заболеваний крови, рака и наследственных болезней. В результате создается опасность преждевременного старения макроорганизма [9].

Для синтетических полимерных материалов действие ионизирующего излучения приводит к молекулярно-химическим превращениям - окислительной деструкции и старению полимерного субстрата. Неблагоприятным последствием этого процесса часто является загрязнение

природной среды инородными продуктами-токсикантами, вовлекаемыми в биохимические циклы и опасными для жизнедеятельности человека.

Процессы старения синтетических материалов изучены достаточно подробно [2, 8]. Однако дискуссионными являются вопросы, связанные с выяснением пусковых механизмов биоразрушения органических и неорганических систем. В частности, недостаточно полно установлена роль адгезии микроорганизмов в развитии биообрастания и деструкции полимерных материалов. Явление адгезии микробов имеет важное общепроизводственное и медицинское значение для многих природных процессов [11]. В последние годы на основе всесторонних исследований этого явления с использованием достижений современной генетической инженерии разрабатываются принципы и методы так называемой антиадгезивной терапии инфекционных заболеваний.

В настоящей работе представлены результаты комплексных исследований, связанных с установлением роли адгезии микроорганизмов в биообрастании и биоповреждении различных классов синтетических полимерных материалов. Предпринята попытка концептуального описания некоторых общих молекулярно-кинетических закономерностей адгезии в процессах биоразрушения полимерных систем и развитии инфекционных заболеваний с использованием понятия "микрорологических ниш".

Материал и методика. Объектами исследования служили образцы синтетических полимерных материалов, в т.ч. композиционных, классов фторопластов, полидиенов, полиамидов, отличающихся технологией получения и переработки, а также микрорельефом поверхности.

Использован комплекс физико-химических, химико-аналитических и микробиологических методов, описанных в работах [4, 5].

Адгезию/десорбцию микроорганизмов с поверхности полимерного субстрата изучали ультразвуковым методом с помощью прибора УЗА-01 с пьезокерамическим излучателем ЦТС-19 (частота $f=2,16$ МГц, мощность излучения $P_i=2$ Вт). Процесс десорбции осуществляли в следующем режиме акустической обработки: частота ультразвука - 2,16 МГц, мощность ультразвука - 0,4-0,8 Вт, продолжительность воздействия ультразвука - 4-6 мин. Определяли количество десорбированных микроорганизмов и показатель адгезии (ПА, %) [4].

Результаты и обсуждение. Адгезия и десорбция микроорганизмов. Исследования показали, что адгезия микроорганизмов на поверхности полимерного материала начинается через 3-5 мин с момента контакта и достигает максимального значения через 15 ч инкубации биоагента на субстрате.

Установлено, что действие ультразвукового поля происходит в относительно мягких условиях, не вызывая температурных флуктуаций и кавитационных эффектов. Характерно, что десорбированные микроорганизмы сохраняют жизнеспособность ($99,8 \pm 0,5\%$) в течение всего периода воздействия ультразвука на систему "микроорганизм+субстрат". Морфологические изменения ультраструктуры клеток микроорганизмов и деструктивные превращения полимерных материалов не обнаружены.

На рис. 1 и 2 приведены кинетические кривые изменения количества десорбированных спор гриба *Aspergillus niger* ВКМ F-33 и *Aspergillus flavus* ВКМ F-747 от времени ультразвуковой обработки фторопластовой пленки

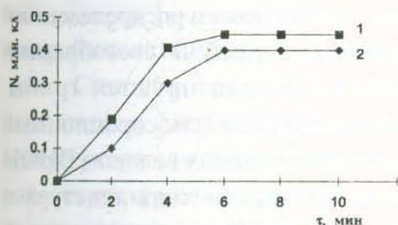


Рис. 1. Изменение количества десорбированных спор (N, млн.сп.) гриба *Asp. niger* BKM F-33 от времени ультразвуковой обработки (τ, мин.) пленки Ф-26: (f=2,16 МГц, мощность 0,8(1) и 0,4 (2) Вт).

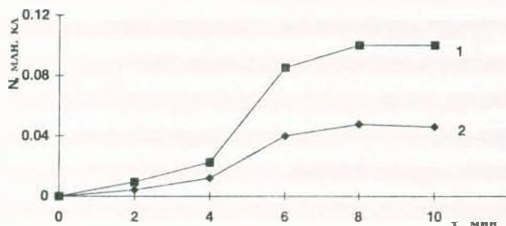


Рис. 2. Изменение количества десорбированных спор (N, млн.сп.) *Asp. niger* BKM F-33 (1) и *Asp. flavus* BKM F-747 (2) от времени ультразвуковой обработки (f=2,16 МГц, мощность 2 Вт) хемосорбционного материала.

Ф-26 (поверхность гладкая) и хемосорбционного материала объемно выраженной текстуры. Из хода кривых следует, что микроорганизмы хорошо адгезируются на указанных материалах независимо от физической текстуры поверхности и их объема. Адгезия спор грибов происходит не мгновенно, а в форме приспособительной эволюции с наличием лаг-фазы. Спектроскопические исследования при этом показали, что молекулярная структура материала не повреждается, а биообрастание и адгезия микроорганизмов инициируются загрязнителями органической природы, используемыми грибами в качестве источников углеродного питания. Перманганатная окисляемость (ПО) материалов- как показатель технологической загрязненности- изменялась в пределах от 12,6 до 41,6 мг/л.

Таблица 1. Результаты комплексных исследований полимерных материалов

Наименование материала	Топографическая характеристика	ПО, мг/л	ВП, %	ГУ, балл	ПА, %
Фторопластовая пленка Ф-26	Поверхность гладкая	12,6	11,2	2	80
Искусственная кожа с фторполимерным покрытием	Поверхность тисненая	38,4	8,7	3	76
Высокообъемная ткань фторопластовой основы	Поверхность микронсоднородная	32,9	42,5	4	85
Смесевой хемосорбционный материал (на основе целлюлозного волокна и волокон ВИОН КН-1 + ВИОН АН-3 в соотношении 70:30%)	Объемно-выраженная текстура	41,6	50,3	4	90

Примечание: ПО-перманганатная окисляемость; ВП-водопоглощение; ГУ-грибоустойчивость; ПА-показатель адгезии.

Текстурные особенности поверхности и объема указанных материалов, по данным микроскопических наблюдений, свидетельствовали о том, что они, как и тиснения искусственных кож, являются местами скопления технологических загрязнителей-остатков пластификаторов, замасливателей, наполнителей и других ингредиентов. Текстурные

неоднородности, включающие загрязнители и статистически распределенные на поверхности и в объеме материалов, представляют собой своеобразные “микрoэкологические ниши”, к которым легко адаптируются грибы. Хорошей моделью подобного субстрата служит смесевой хемосорбционный материал на основе целлюлозного волокна и ионообменных волокон ВИОН КН-1 и ВИОН АН-3. Выраженная объемно-поверхностная текстура в сочетании с высокой степенью водопоглощения-50,3% и перманганатной окисляемости - 41,6мг/л приводит к максимальной адгезии грибов (ПА=90%) и биоповреждению хемосорбционного материала (табл. 1).

Активная и пассивная адгезия грибов на полимерном субстрате.

Концепция “микрoэкологических ниш” явилась основополагающей в раскрытии пускового механизма процессов биообрастания и биодеструкции. Исследования показали, что для материалов с высоким уровнем собственной стабильности взаимодействие с биоагентом завершается биообрастанием, не нарушающим макромолекулярную структуру полимерного субстрата. Подобный процесс наиболее типичен для фторопластов разных марок. Насыщенность макромолекул атомами фтора делает фторопласты неприемлемыми в качестве питательного субстрата для грибов, так как токсический эффект фтор-атомов превышает эффект сенсibilизации деструкции. Надо полагать, что биообрастание фторопластов инициируется остатками замасливателей на основе вазелинового масла (от 1 до 3%), используемыми для их переработки. Следовательно, для материалов с повышенной собственной стабильностью и содержащих до 3% органических загрязнителей (источники питания) имеет место **пассивная**, т.е. опосредованная адгезия грибов, приводящая в основном к биообрастанию полимерного субстрата. Этот вид адгезии происходит не на “чистом полимере”, а в слое технологических загрязнителей, используемых грибами для развития и жизнедеятельности.

Установлено также, что в том случае, когда в процессе взаимодействия биоагента с субстратом в результате развития обменных процессов (выделение ферментов и оргкислот) происходит химическое связывание, то имеет место **активная** адгезия. Она приводит к биодеструкции с нарушением не только молекулярной, но и надмолекулярной структур. Таким образом, не любой вид адгезии способен вызвать биодеструкцию и не всегда биообрастание на уровне 3 баллов может быть фактором, лимитирующим эксплуатационную пригодность полимерного материала. Следовательно, адгезия грибов является наиболее чувствительным индикатором подверженности полимерного материала биообрастанию и биоповреждению и должна отражаться в комплексе ключевых признаков, ответственных за их эксплуатационную пригодность.

Адгезия микробов и развитие инфекционных процессов.

Медико-биологические и иммунологические исследования свидетельствуют о том, что пусковым механизмом большинства инфекционных

заболеваний (за исключением трансмиссивных инфекций) является адгезия микробных агентов (сапрофитов) на специфических мембранах слизистых [3].

Способность микробных агентов адгезироваться определяется комплексом факторов. Основополагающими являются функционирующая микрофлора контакта и наличие ферментов, сосредоточенных в фимбриальных структурах. В частности, для холерных вибрионов и микоплазм такими ферментами являются нейраминидаза, гиалуронидаза и лецитиназа, взаимодействующие с поверхностной структурой клетки с образованием цитоплазматического эффекта [7].

Наличие ферментов еще не является достаточным условием развития адгезии. Важно транспортирование ферментов в зоны соответствующих экологических ниш, где происходит их взаимодействие с компонентами биоценоза, распознавание комплементарных структур и формирование факторов патогенности. Перечисленные процессы во многом определяются составом и взаимодействием сочленов биоценоза в нормальной микрофлоре макроорганизма, а механизм адгезии регулируется геномом патогенных микробных агентов.

Общие молекулярно-кинетические закономерности адгезии.

Сравнительный анализ полученных экспериментальных данных и теоретические обобщения позволяют сделать предположение о том, что роль нормальной микрофлоры биоценоза у макроорганизма в первом приближении аналогична функционированию “микроэкологических ниш” при биообрастании и биоповреждении полимерного материала. В обоих случаях микробному агенту необходимо преодолевать экологический барьер (перистальтика кишечника, движение ресничек эпителия для макроорганизма и микротрещины, топографические препятствия поверхности и объема у полимерного субстрата). Развитие же активной адгезии (деструкция полимерного субстрата) и генерирование инфекции происходят по принципу распознавания комплементарных структур микробной клетки и реципиента. Присутствие сопутствующей флоры, фауны и нормальной микрофлоры макроорганизма способно по аналогии с загрязнителями “микроэкологических ниш” полимерных материалов инициировать развитие инфекционных заболеваний.

Надо отметить, что в иммунологических исследованиях при интерпретации механизмов адгезии недостаточно полно учитывается субстратная специфика реципиента, что недопустимо для полимерных материалов медицинского назначения, особенно тех, которые активно используются в практике сердечно-сосудистого протезирования. Это в основном эластомеры и сложные полиэфир, контактирующие с кровью и позволяющие исключить адгезию тромбоцитов [12]. Достигается это посредством регулирования химической природы полимерного субстрата и его поверхностных свойств.

Активная адгезия и биоразрушение.

Полученные результаты позволяют в определенной степени расширить наши представления о возможных механизмах адгезии микроорганизмов на полимерных субстратах. Так, становится очевидным, что при всех случаях взаимодействия микробного агента с субстратом подверженность материала биодеструкции определяется уязвимостью его макромолекулярной структуры, надмолекулярной организации и компонентов полимерной матрицы. Механизм адгезии регулируется физиолого-биохимической активностью микроорганизмов-биодеструкторов и наличием статистически распределенных “микрoэкологических ниш”. Ценоз указанных ниш формируется из остатков тех компонентов, промежуточных материалов и других загрязнителей, которые сохраняются на полимерном субстрате со стадии синтеза и технологической переработки в конкретное изделие. В тех случаях, когда загрязнители усваиваются микробами и развивается активная адгезия, происходит активация обменных процессов (синтез ферментов и оргкислот), разрушающих материал.

В наших исследованиях активная адгезия наблюдается для хемосорбционных материалов, содержащих до 70% целлюлозного волокна [4], резинотехнических материалов [6] и хлоропреновых каучуков, где в биодеструкции участвуют ферменты целлюлаза, каталаза и пероксидаза [4-6]. Предварительное УФ-облучение хлоропреновых каучуков, согласно спектроскопическим исследованиям, приводит к образованию высоких концентраций карбонильных групп СНО (1780 см^{-1}), увеличивающих отрицательный заряд поверхности. Эффект УФ-облучения в данном случае аналогичен эффекту кислотного травления для поли-2окси-этилметакрилата, изменяющих его свойства в пользу адгезии [10]. Следовательно, величина поверхностного заряда существенно влияет на развитие адгезии. Сам процесс предварительного УФ-облучения и последующего инфицирования полимерного субстрата микроорганизмами-биодеструкторами может служить перспективным методом биологической утилизации синтетических материалов, исключаям нежелательное загрязнение окружающей среды и приемлемым по санитарно-гигиеническим требованиям. К числу показателей, инициирующих адгезию, относятся также гидрофильность (как влагоудерживающий фактор), способность поверхности полимерного материала накапливать статическое электричество (как грязеудерживающий фактор) и низкая величина поверхностной свободной энергии, понижающая потенциальный барьер развития адгезионных взаимодействий.

Таким образом, развитие деструктивных превращений полимерных материалов под воздействием микробных агентов, как и этиология инфекционных заболеваний, имеет много общих закономерностей в плане интерпретации молекулярных механизмов адгезии микроорганизмов на субстратах различной природы. При этом принципиально важно, особенно

для биообрастания и биоповреждения полимерных материалов, разграничение роли и вклада пассивной и активной адгезии. Установлено, что пусковым механизмом биообрастания служит пассивная адгезия, предшествующая активной адгезии, ответственной за биоразрушение полимерных материалов. Общей стадией для развития обоих видов адгезий является формирование "микроэкологических ниш", инициирующих биообрастание, способное перейти в биоразрушение. Концепция пассивной адгезии может быть применима для описания биообрастания труднодеструктурируемых полимерных материалов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В.Б. Клинич. мед., 3,15-19,1993.
2. Микробное повреждение материалов. Сб. Изд-во Академии наук Арм. ССР, Ереван, 180 с., 1985.
3. Петровская В.Г. Журн. микробиол., эпидемиолог. и иммунолог. 8, 24-30, 1982.
4. Петросян Р.А., Газарян Е.А., Неделин Н.П. Гигиена и санитария, 4, 73-74, 1989.
5. Петросян Р.А., Тоноян В.Д., Газарян Е.А., Хачатурян Р.Н., Акопян Э.А. Журн. прикл. химии, 63, 5, 1109-1113, 1990.
6. Сафарян З.С., Петросян Р.А. Биолог. журн. Армении, 38, 6, 546-548, 1985.
7. Уралева В.С., Кубырева И.В., Черпахина И.Я., Трубникова В.А. Журн. микробиол., эпидемиолог. и иммунолог., 7, 51-53, 1983.
8. Фойгт И. Стабилизация полимеров против действия света и тепла. 574, Л., 1979.
9. Фролькис В.В. Старение и увеличение продолжительности жизни, 17-19, Л., 1988.
10. Auslan Mc., Johnson G. J. Biomedical Materials Research, 21, 921-935, 1987.
11. R. Berkley et al. Eds. Microbial Adhesion to Surfaces. , E. Horwood Ltd, Chichester, 560pp., 1980.
12. Wang S.-G. Polym. J., 21, 2, 173-189, 1989.

Поступила 01.X.1999

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ПРОИЗВОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ НА ЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ БАКТЕРИОФАГОВ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Б.П. КАРАБЕКОВ, А.С. ОВСЕПЯН, А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕСЯН,
А.С. ЗУРАБЯН

НИИ "Биотехнология", АОЗТ, 375056, Ереван

Исследована возможность предотвращения лизиса зараженной бактериофагом растущей культуры *Bacillus thuringiensis var.galleriae* внесением в питательную среду химических факторов, способных вмешаться в процессы взаимодействия фага с бактериальной клеткой: L-дипиколоиновой кислоты, ряда поверхностно-активных производных аминокислот, а также производных адамантана, обладающих антивирусным действием. Рассматриваются перспективы их применения для предотвращения фаголизиса культуры-продуцента в промышленных условиях.

Ուսումնասիրվել է *Bacillus thuringiensis var.galleriae*-ի բակտերիոֆագով վարակված աճող կուլտուրայի լիզիսի արգելակման հնարավորությունը որոշ քիմիական գործոնների ազդեցությամբ: Ի հաշտ են բերված հակափիրուսային հատկությամբ օժտված L-դիպիկոլինաթթվի, ածխաթթուների մակերեսային ակտիվ և ադամանտանի ածանցյալները, որոնք ընդունակ են արգելակել կամ զգալիորեն ուշացնել բակտերիալ կուլտուրայի լիզիսը:

Prevention of the lysis in the growing culture of *Bacillus thuringiensis var.galleriae* contaminated with bacteriophage was researched. Some of the used substances for example L-dipicolinic acid, surface active derivatives of a number of aminoacids and also adamantan derivatives with antiviral action was researched. Prospects of their industrial application for preventing the phage lysis of the producing strains are considered.

Бактериофаги Bacillus thuringiensis - энтобактерин - ингибиторы фаголизиса

Исследования, посвященные решению проблемы борьбы с промышленным фаголизисом *Bacillus thuringiensis* в производстве энтобактерина в основном проводились в направлении повышения устойчивости штаммов-продуцентов к атаке бактериофагов путем получения фагорезистентных мутантов [2, 4, 5-7]. Однако эти работы до настоящего времени не дали сколько-нибудь ощутимых результатов, что, по-видимому, объясняется, в частности, высокой чувствительностью указанного микроорганизма практически ко всем бактериофагам, когда-либо выделенным на *B.thuringiensis* и *B.cereus* [8, 11]. В этом отношении штаммы *var.galleriae* можно рассматривать в качестве универсального хозяина для бактериофагов указанных групп микроорганизмов [11].

В свете сказанного представляется актуальным поиск иных путей решения проблемы. Одним из таких путей может быть отбор неспецифических средств, ингибирующих фаголизис бактериальных клеток.

По литературным сведениям, неспецифическое прерывание механизмов взаимодействия бактериальных клеток и их вирусов-бактериофагов может быть осуществлено путем добавления в питательную среду различных компонентов или удаления из нее кофакторов адсорбции

фага на бактериальной клетке [1, 3, 11]. Так, внесение в питательную среду L-дипикотиновой кислоты в конечной концентрации 0,4 мг/мл предотвращает фаголизис клеток *B.cereus* [11]. Такой же результат был получен в опытах с фагом SP-10 на *B.subtilis* [12]. Нами было показано, что при отсутствии ионов магния в среде бактериофаги *Corynebacterium glutamicum* не размножаются [3].

Согласно данным японских исследователей, добавление в культуральную среду некоторых производных аминокислот приводит к задержке лизиса зараженных фагом бактериальных клеток [10]. В результате этих работ компаний "Ajinomoto" запатентован способ, позволяющий избежать фаголизиса или уменьшить вред, наносимый бактериофагом при производстве аминокислот [9].

В настоящей работе представлены результаты поиска эффективных средств, способных ингибировать фаголизис у *B.thuringiensis var.galleriae*.

Материал и методика. Использовали продуцент энтобактерина - производственный штамм *B.thuringiensis var.galleriae* 69-6 (серотип H5a-5b), полученный из Центрального музея промышленных микроорганизмов, (Москва). Штамм чувствителен к широкому спектру бактериофагов, выделенных как в условиях производства, так и в лаборатории.

Использовали также вирулентные бактериофаги PG-10, PG-56, PG-42, PG-8, PD-1, PD-2, выделенные в производственных условиях. Все исследованные фаги, кроме фага штамма 69-6, активно лизировали многие штаммы *B.thuringiensis* из нашей коллекции, насчитывающей свыше 100 штаммов, представляющих все серотипы и варианты этого микроорганизма.

В качестве питательных сред в работе применяли общепринятые лабораторные жидкие и агаризованные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), 2,0%-ный мясо-пептонный агар для работы с бактериями и 1,2%- и 0,7%-ный мясо-пептонный агар при работе с фагами двуслойным методом Грация [1].

Использовали также производственные среды: кукурузно-глюкозную среду (КГС) и дрожже-полисахаридную среду (ДПС).

В качестве ингибиторов фаголизиса были испытаны обладающие поверхностно-активными свойствами производные аминокислот, синтезированные на кафедре органического синтеза Ереванского государственного университета, два производных адамантана, синтезированных в Институте тонкой органической химии НАН Армении Ц.Е.Агаджаняном и альфа-дипикотиновая кислота, синтезированная на Ереванском заводе химреактивов. Список использованных веществ приводится в табл.1.

Активность препарата определяли в жидкой среде МПБ. Бактериальный штамм засекали в пробирку с 10 мл МПБ и инкубировали в течение ночи при 30° на качалке со скоростью вращения 240±5 об/мин.

На следующий день культуру освежали путем переноса 10% ночной культуры в 10 мл стерильной питательной среды, содержащей исследуемый препарат. Концентрацию препарата определяли экспериментально после определения бактерицидного или бактериостатического действия препарата. Освеженную культуру инкубировали при 30° с аэрацией в течение 2-3 ч, затем ее заражали вирулентным фагом с различной множественностью инфекции (moi). Динамику роста культуры до и после заражения бактериофагом определяли измерением оптической плотности культуральной жидкости на ФЭК М.

Антибактериальное действие различных концентраций исследуемых препаратов определяли по вышеописанной методике, исключая заражение бактериофагом.

Антифаговое действие исследованных препаратов проверяли по методике, описанной для фага T4 (*Virology*, 35,330,1966).

Качественное определение активности исследуемых препаратов проводили спот-тестом: исследуемый препарат в соответствующей концентрации вносили в пробирки с 2,5 мл 0,7%-ного расплавленного и остуженного до 46° МПА для верхнего слоя, куда предварительно вносили 0,5 мл ночной бактериальной культуры. Затем эту смесь равномерно

наносили на поверхность 1,2%-ного МПА в чашках Петри по методу Грация для получения бактериального газона. Через 1-2 ч на поверхность газона наносили капли бактериофага в титре $1,0 \times 10^7$ фаговых частиц в 1 мл среды. Чашки инкубировали в течение ночи при 30°. В качестве контроля использовали среды, не содержащие исследуемое вещество.

Таблица 1. Препараты, использованные в качестве ингибиторов фаголизиса

N п/п	Шифр	Название препарата
1	201	Стеароил молочная кислота
2	180	N-стеароил-L-аланин
3	181	N-стеароил-L-аланин
4	184	N-стеароил-L-валин
5	174	N-стеароил-L-метионин
6	178	N-стеароил-DL-аланин
7	185	N-стеароил-L-гистидин
8	206	N-стеароил-DL-метионин
9	207	N-ацетил-DL-аланин
10	203	N-ацетил-DL-лейцин
11	208	N-олеил-L-глутаминовая кислота
12	209	N-стеароил-L-глутаминовая кислота
13	183	N-стеароил-L-лизин
14	212	N-олеил-L-глицин
15	200	2,6-дипиколиновая кислота
16	213	трихлоргидрид L-амино-3,5,7-азда мантан
17	214	хлоргидрид-7-нитро-1,3,5-триазада мантан

Результаты и обсуждение. В целях определения оптимальной множественности инфицирования вирулентным фагом, при котором лизис культуры штамма 69-6 в жидкой питательной среде регистрируется наиболее четко и в сравнительно короткий промежуток времени, проводили опыты с различной множественностью инфицирования. Результаты 4 таких опытов обобщены в табл.2.

Таблица 2. Динамика изменения оптической плотности растущих бульонных культур штамма 69-6 после заражения их фагом PG-10 с различной множественностью инфекции

Множественность инфекции	Оптическая плотность в интервале времени, ч			
	0	2	3	6
moi = 1,0	0,80	1,18	1,00	0,21
moi = 0,1	0,80	1,19	1,74	0,69
moi = 0,01	0,85	1,24	1,98	2,10
moi = 0,001	0,90	1,43	2,08	2,50
moi = 0 (контроль)	0,83	1,38	1,95	2,30

Примечание: 0 часов - время внесения фага в бульонную культуру бактерий.

Из табл.2 видно, что через 6 ч роста после добавления фага к культуре штамма 69-6 фаголизис бактериальных клеток четко регистрируется только при $moi=1,0$ и $0,1$. Эти условия эксперимента были выбраны для определения активности исследованных препаратов, хотя в природе заражение бактериальных клеток вирусом с такой множественностью вряд ли возможно.

Типичная кривая антибактериального действия исследованных производных аминокислот представлена на рис.1. Видно, что эти препараты в концентрации до 100 мкг/мл не оказывают заметного бактериостатического влияния, в то время как в концентрации 150-300 мкг/мл они действуют бактериостатически, прекращая дальнейший рост штамма.

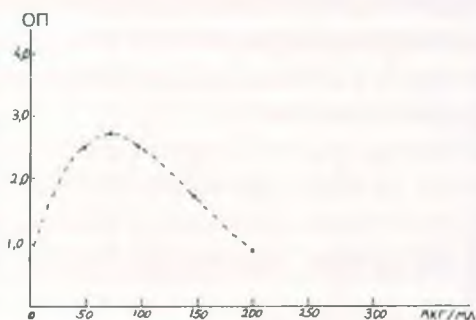


Рис.1. Влияние различных концентраций производных аминокислот на рост штамма 69-6 var. gallieriae.

Альфа-дипиколиновая кислота (α -ДПК) ингибировала рост штамма 69-6 в концентрации 1,2 мг/мл. В то же время производные адамантана не оказывали антибактериального действия в концентрации до 1000 мкг/мл (рис. 2 и 3).

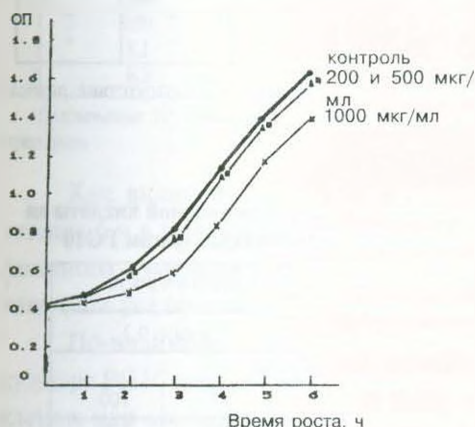


Рис. 2. Влияние различных концентраций трихлоргидрата L-амино-3,5,7-азаадамантана на рост штамма 69-6.

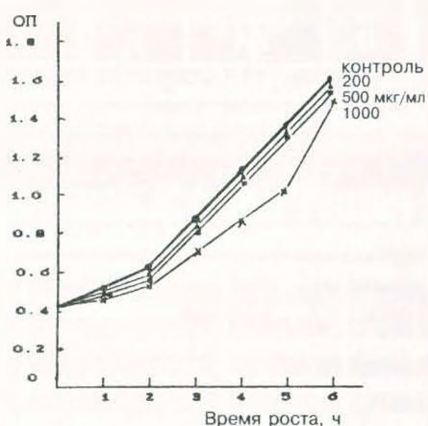


Рис. 3. Влияние различных концентраций хлоргидрата 7-нитро-1,3,5-триазаадамантана на рост штамма 69-6.

Свободный фаг PG-10 инактивировался на 2 порядка при наличии в среде производных адамантана уже в концентрации 200 мкг/мл. На основании этих опытов производные аминокислот испытывали в конечной концентрации 50 и 100 мкг/мл в среде, ДПК - 0,4 и 0,8 мг/мл, а производные адамантана - в концентрации 200 и 500 мкг/мл.

На первом этапе исследований препараты испытывали в спот-тесте с целью выявления качественной реакции на задержку фаголизиса штамма 69-6. Результаты этих опытов приведены в табл.3.

Из табл.3 видно, что только 6 из 17 исследованных в спот-тесте препаратов ингибируют фаголизис штамма 69-6, вызванный разными бактериофагами.

В табл.4 приведены результаты испытания препаратов в концентрациях 50 и 100 мкг/мл в жидкой среде при множественности заражения фагом $moi = 1,0$ и $0,1$.

Таблица 3. Влияние испытуемых препаратов на фаголизис штамма 69-6, вызванный различными бактериофагами

N п/п	Шифр препарата	Бактериофаги					
		PG10	PG56	PG42	PG8	PD1	PD2
1	174	+	-	-	-	-	-
2	178	+	-	-	-	-	-
3	180	-	-	-	-	-	-
4	181	-	-	-	-	-	-
5	183	-	-	-	-	-	-
6	184	+	-	-	-	-	-
7	185	-	-	-	-	-	-
8	200	-	-	-	-	-	-
9	201	+	-	-	+	+	+
10	203	-	-	-	-	-	-
11	206	-	-	-	-	-	-
12	207	-	-	-	-	-	-
13	208	+	+	+	-	+	-
14	209	+	-	-	-	-	+
15	212	-	-	-	-	-	-
16	213	-	-	-	-	-	-
17	214	-	-	-	-	-	-

Примечание: конечная концентрация препарата - 50 мкг/мл; "+" - отсутствие лизиса; "-" - наличие лизиса.

Таблица 4. Влияние производных аминокислот и стеароилмолочной кислоты на процесс фаголизиса штамма 69-6, вызванный вирулентным фагом PG10

N п/п	Шифр препарата	Оптическая плотность через 6 ч роста			
		moi = 1,0		moi = 0,1	
		мкг/мл			
		50	100	50	100
1	174	1,12	1,95	2,20	2,25
2	178	2,15	2,10	2,30	2,15
3	180	0,15	0,48	0,17	0,31
4	181	0,27	0,69	0,29	0,43
5	183	0,43	0,27	0,62	0,25
6	184	1,76	1,98	2,15	2,17
7	185	0,15	0,15	0,23	0,28
8	201	2,15	2,15	2,25	2,25
9	203	0,29	0,15	0,52	0,42
10	206	0,23	0,32	0,98	0,69
11	207	0,25	0,43	0,46	0,28
12	208	1,50	2,10	2,10	2,10
13	209	1,79	1,83	2,05	2,20
14	212	0,21	0,27	0,43	0,65
	K1	2,31	2,05	2,35	2,30
	K2	0,21	0,31	0,69	0,48

Примечание: K1 - контроль 1 - в культуру фаг не добавлен; K2 - контроль 2 - в культуру препарат не добавлен, фагом заразили через 2 ч роста.

Таким образом, экспериментально было показано, что 5 производных аминокислот и стеароилмолочная кислота в концентрации 50 и 100 мкг/мл способны задерживать лизис зараженных фагом PG10 клеток штамма

69-6 *var.galleriae*. При этом не менее 90% клеток сохраняют способность к дальнейшему росту в присутствии фага, тогда как за этот же период культура штамма 69-6 на среде, не содержащей какого-либо из этих препаратов, в присутствии того же фага PG10 лизируется полностью.

С целью выявления механизма влияния этих препаратов на процесс взаимодействия фага PG10 и клеток штамма 69-6 определяли титр фага в момент добавления его к культуре штамма 69-6 и через 6 ч культивирования (табл.5).

Таблица 5. Результаты определения титра фаговых частиц в момент заражения фагом PG10 и через 6 ч культивирования

Шифр препарата	Титр фаговых частиц	
	в момент заражения	через 6 ч культивирования
174	$3,1 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
178	$1,2 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
184	$1,8 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$
201	$4,6 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
208	$5,2 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$
209	$1,9 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7$
K1	0	0
K2	$1,6 \times 10^7$	$3,2 \times 10^6$

Примечание: K1 - контроль 1 -культура не заражена; K2 - контроль 2-культура не содержит препарата.

Как видно из табл. 5, в культурах штамма 69-6, инкубируемых в течение 6 ч в присутствии одного из активных препаратов, не происходит заметного изменения титра фага PG10, в то время как в отсутствие их титр фага увеличивается не менее чем на 2 порядка.

По-видимому, добавление испытанных препаратов к зараженной фагом культуре PG10 штамма 69-6 препятствует адсорбции фага на бактериальных клетках или значительно затрудняет этот процесс, в результате чего лизис бактериальных клеток резко задерживается. При этом каких-либо изменений в морфологии бактериальных клеток, в их способности к споруляции и образованию кристаллического эндотоксина не наблюдается.

Для выяснения возможности получения достаточно высокого урожая спор при культивировании штамма 69-6 в присутствии этих препаратов и фага PG10, исследовали продуктивность его на двух производственных средах - ДПС и КГС за 48 ч роста при $\text{moI} = 1,0$ и концентрации препаратов 100 мкг/мл. Результаты этих опытов суммированы в табл.6.

Видно, что эффективность защиты культуры продуцента от фаголизиса не превышает 60%, поэтому эти препараты на данном этапе не могут быть предложены для применения в производстве. Проведенные исследования показали, однако, что поиск веществ, способных защитить культуру продуцента энтобактерина *B.thuringiensis var.galleriae* от атаки вирулентных бактериофагов, перспективен. Полученные результаты позволили предположить, что действие исследованных препаратов на процесс фаголизиса является неспецифическим и не зависит от того, каким

фагом заражается чувствительная культура. Для проверки этого предположения опыты с отобранными веществами были проведены также с другими вирулентными фагами, полученными из Бердского химического комбината (Новосибирская область, Россия). При концентрации препаратов 100 мкг/мл и $mo_i = 1,0$ через 6 ч роста новые фаги с высокой эффективностью лизировали штамм 69-6 *var.galleriae* (табл.7).

Таблица 6. Продуктивность спорообразования штамма 69-6 в присутствии фага PG10 и производных аминокислот

Шифр препарата	ДПС		КГС	
	продуктивность, спор/мл		продуктивность, спор/мл	
	абс	%	абс	%
K1	$2,9 \times 10^9$	100,0	$2,5 \times 10^9$	100,0
K2	$0,6 \times 10^8$	2,1	$1,0 \times 10^8$	4,0
174	$1,3 \times 10^9$	44,8	$1,1 \times 10^9$	46,0
178	$1,6 \times 10^9$	55,2	$1,3 \times 10^9$	52,0
184	$1,3 \times 10^9$	46,5	$1,3 \times 10^9$	52,0
201	$1,8 \times 10^9$	63,8	$1,2 \times 10^9$	50,0
208	$1,0 \times 10^9$	35,9	$1,0 \times 10^9$	40,0
209	$1,8 \times 10^9$	60,7	$1,0 \times 10^9$	40,0

Примечания к таблице те же, что к таблице 5.

Таблица 7. Влияние производных аминокислот на фаголизис клеток штамма 69-6 новыми бактериофагами

Шифр препарата	Оптическая плотность при заражении фагом					
	PG10 контроль	PG56	PG42	PG8	PD1	PD2
174	1,95	0,29	0,98	0,69	0,27	0,21
178	2,10	0,15	0,32	0,29	0,43	0,27
184	1,98	0,27	0,31	0,23	1,00	0,80
201	2,12	0,15	0,92	2,07	2,17	2,00
208	2,15	2,10	2,10	0,27	1,95	0,15
209	2,05	0,93	1,15	1,00	0,43	2,05
K1	2,30	2,35	2,15	2,25	2,40	2,35
K2	0,29	0,18	0,42	0,31	0,21	0,23

Примечания те же, что к табл.6.

Из представленных в табл. 7 результатов видно, что среди отобранных препаратов наиболее эффективными оказались стеароилмолочная кислота (шифр 201), обеспечивающая защиту штамма 69-6 от 4 фагов (PG10, PG8, PD1, PD2), и N-олеил-L-глутаминовая кислота (шифр 208), также защищающая штамм 69-6 от литического действия 4 вирулентных фагов (PG10, PG42, PG56, PD1). N-стеароил-L-глутаминовая кислота (шифр 209) защищает штамм 69-6 от литического действия 2 фагов (PG10 и PD2). Остальные препараты активны только в отношении фага PG10.

Подобная избирательность в действии испытанных препаратов не

может быть расценена как неспецифическое действие и нуждается в специальных исследованиях. Это обстоятельство, несомненно, снижает ценность подобных препаратов как факторов, которые могут быть рекомендованы для применения в производстве с целью борьбы с промышленным фаголизисом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги, М., Мир, 1961.
2. Алиханян С.И., Ломовская Н.Д., Майсурян А.Н. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 125, 1973.
3. Арутюнян С.Ж., Крылов В.Н., Карабеков Б.П. и др. Авт.свид. СССР N 1235219, 1986.
4. Буяновская З.А., Майсурян А.М. Получение штамма бактерий, обладающих новой формой рестрикции размножения бактериофага. Там же, 133.
5. Звенигородский В.И. Получение и характеристика фагоустойчивых мутантов штамма продуцента энтобактерина. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 126, 1973.
6. Звенигородский В.И. Производственные испытания штамма продуцента энтобактерина, как один из этапов селекции. Тез.докл.конф. по генетике промышленных микроорганизмов. Цахкадзор, 10-14 декабря, 127, 1973.
7. Карабеков Б.П., Оганесян М.Г., Скворцова М.М. Авт.свид. СССР N 699016, 1979.
8. Карабеков Б.П. Тез. II науч. конф. ВМО Закавказских республик. 16-17. Телави, 1979.
9. Патент Франции N 2, 242, 462.
10. Amino acid compound cheek virus. Japan Economic Journal. 12, 600, 10, 1974.
11. Goldberg Y.D., Gallacota K. The phages of *Bacillus cereus*. В кн.: "Spores 2", 276-290, 1961.
12. Thorne C.B. В кн.: "Spores 2", 1961.

Поступила 16.IX.1997

ВЗАИМООТНОШЕНИЯ В СИСТЕМЕ ФАГ-КЛЕТКА У ЭНТОМОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ *BACILLUS THURINGIENSIS*

Б.П. КАРАБЕКОВ, А.С. ОВСЕПЯН, А.Х. ЧАХАЛЯН, С.К. КЕЛЕШЯН,
А.С. ЗУРАБЯН

НИИ "Биотехнология", АОЗТ, 375056, Ереван

Изучены промышленные штаммы *Bacillus thuringiensis*, используемые в производстве энтомоцидных препаратов, и вызывающие их лизис бактериофаги. Показано, что большинство этих штаммов лизогенны, однако полученные результаты дают основание считать, что производственный фаголизис является скорее результатом заражения культуры извне. Разработан специальный способ получения фагорезистентного штамма C-5 var. *dendrolimus* - продуцента дендробациллина, который внедрен в производство.

Անուննախիրվել են միջատասպան պատրաստուկներ արտադրելու համար օգտագործվող *Bacillus thuringiensis*-ի արդյունաբերական շտամների լիզիսը առաջացնող ֆագերը: Ցույց է տրվել, որ այդ շտամների մեծ մասը լիզոգեն է, սակայն ստացված արդյունքները հիմք են ծառայում եզրակացնելու, որ արտադրական ֆագոլիզիսը ավելի շուտ տեղի է ունենում արտադրող շտամի արտաքին միջավայրից վարակվելու հետևանքով: Մշակվել է հատուկ մեթոդ, որի շնորհիվ ստացվել է արտադրության մեջ է ներդրվել ֆագերի նկատմամբ կայուն դենդրոբացիլինի արտադրիչ C-5 var. *dendrolimus* շտամը:

The industrial strains of *Bacillus thuringiensis* used for producing of entomocide preparations and bacteriophages causing their lysis have been studied. Most of these strains have been shown to be lysogenic, but the results obtained caused the supposition, that the industrial strains lysis was rather the result of outside contamination of the producer with the virus. A specific method for isolation and industrial application of the phage resistant strain C-5 var. *dendrolimus* has been developed.

Бактерии энтомопатогенные - система фаг-клетка - Bacillus thuringiensis
- фаголизис

Все отрасли микробиологической промышленности, использующие в технологических процессах бактерии, неоднократно сталкиваются с лизисом бактерий-продуцентов специфическими бактериофагами. Фаголизисы наблюдались в различных странах [2, 3, 10-12]. Успешная организация борьбы с фаголизисом на производстве предполагает прежде всего хорошее знание особенностей взаимоотношений между вирусом и бактериальной клеткой.

По имеющимся в литературе данным, в отношении фагов *Bacillus thuringiensis* не применимы обычные понятия "умеренный" и "вирулентный", предполагающие определенные механизмы отношений между бактериальной клеткой и вирусом [1, 8].

Пробелы в генетическом изучении *B. thuringiensis* и их фагов значительно затрудняют поиски путей преодоления фагочувствительности производственных штаммов и определение источников появления литических бактериофагов на производстве. Поэтому очевидность проведения фундаментальных исследований в этой области не вызывает сомнений.

Как известно, фаголизис бактериальной культуры может быть результатом: а) заражения культуры диким (природным) фагом извне; б)

вирулентной мутации умеренного фага, которым лизогенны клетки данной бактериальной культуры; в) индукции профага у растущей лизогенной культуры, вызванной теми или иными факторами; г) нарушения равновесия временно установившегося фагоносительства у данной культуры [9]. С целью выяснения механизмов, приводящих к фаголизису производственных культур, а также взаимоотношений между бактериальным вирусом и клеткой хозяина были предприняты настоящие исследования.

Материал и методика. В работе использовано свыше 100 штаммов *B. thuringiensis*, представляющих все известные серотипы и варианты этого микроорганизма. Основное количество штаммов получено из Всесоюзного института защиты растений (Ленинград). Используются также штаммы, выделенные в Сибири, в Средней Азии, производственные штаммы-продуценты энтобактерина и дендробациллина (из Бердского химзавода), ряд штаммов, полученных из ВНИИгенетика (Москва).

Использованы вирулентные фаги, явившиеся причиной фаголизисных производственных операций при производстве энтобактерина и дендробациллина на Бердском химзаводе, трансдуцирующие фаги Ср-51 и Ср-54 *B. cereus* 569, любезно предоставленные нам профессором Торном (США). Ряд бактериофагов получен нами при работе с коллекцией штаммов *B. thuringiensis*, находящейся в нашем распоряжении.

В качестве питательной основы для приготовления жидких и агаризованных сред применяли 4%-ный гидролизат рыбный (паста) производства Дагестанского НИИ питательных сред (аминный азот - 3600 мг %) из расчета 4%. Агаризованные среды содержали 0,7 и 1,2% агар-агара при работе двуслойным методом Грация и 2,5% - при работе с бактериями. pH питательных сред устанавливали в пределах 7,0-7,2. Для нормальной споруляции к жидким средам добавляли $4,5 \times 10^6$ M $MnSO_4 \cdot 7H_2O$. Жидкие культуры бактерий выращивали с аэрацией на качалках со скоростью вращения до 220 об/мин при температуре 28-30°.

Штаммы бактерий проверяли на фагоносительство в перекрестном spot-тесте. Индукцию профага у лизогенных штаммов проводили с помощью УФ-облучения лампой БУВ-30 на расстоянии 50 см от поверхности облучаемой культуры.

Споровые инокулы готовили путем смыва стерильным физраствором густого посева культуры с поверхности агара после 5-6-суточного инкубирования при 30° с повторным центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин при 4°. Отмытые споры прогревали при 80° в течение 20 мин, подвергали повторному центрифугированию в тех же условиях и ресуспендировали в 10 раз меньшем объеме стерильного физиологического раствора. Приготовленный таким образом инокулум содержал в среднем 10^{10} - 10^{11} спор/мл и хранился в холодильнике при 4-8°.

Мутагенизацию спор проводили путем их обработки нитрозогуанидином в концентрации 500 мкг/мл в течение 30 мин в цитратном буфере (pH 6,0).

Применявшиеся в работе другие специальные методы исследования приводятся по ходу изложения материала.

Результаты и обсуждение. Исследовали лизогенность производственных штаммов 69-6 (*var. gallerae*, H5a5b) и 49-9 (*var. dendrolimus*). Подбор доз УФ-облучения, способных индуцировать профаг у названных штаммов, производился по кривой выживаемости этих штаммов при УФ - облучении. Было установлено, что примерно 6 мин облучения достаточно, чтобы вызвать гибель 90% клеток в результате их лизиса. Лизис культуры наступал по истечении 100 мин с момента завершения облучения. Лизису предшествовал период остаточного роста.

Полученный лизат обрабатывали хлороформом и проверяли на наличие в ней свободного фага в spot-тесте на ряд штаммов.

Установлено, что лизат культуры штамма 69-6 активен для 8 из 19

исследованных штаммов, что выражалось в возникновении зон лизиса на газоне этих культур. Лизаты штамма 49-9 были не активны на исследованных культурах. Все попытки получить изолированные колонии индуцированного литического агента штамма 69-6 оказались безуспешными. Выделить фаг из литических зон чувствительных культур не удалось. Индуцированный литический агент не перевивался ни на одной из 8 чувствительных культур, что не свидетельствовало в пользу его фаговой природы. Однако лизогенность штамма 69-6 удалось показать при перекрестной проверке всех штаммов коллекции на содержание спонтанного фага. Выяснилось, что как индуцированные лизаты штамма 69-6, так и его необлученная культуральная жидкость образуют хорошо перевиваемые негативные колонии (НК) на газоне штамма *B. megaterium* IFO-3003, причем в обоих образцах содержится одинаковое количество фаговых частиц 10^3 - 10^4 . Обнаруженный фаг был обозначен символом GP-696. На газоне штамма IFO-3003 он образует мутные НК, окруженные характерным ореолом диаметром 2-3 см с центральным ростом. Бульонные культуры штамма 69-6 содержали фаг GP-696, титр которого через 24 часа роста в условиях аэрации доходил до $1-2 \times 10^6$ частиц/мл. Одна НК колония фага GP-696 содержала порядка 10^7 - 10^8 частиц/мл.

Фаг GP-696 был очищен 5-кратным пересевом отдельных НК на газоне индикаторного штамма IFO-3003 и получен в высоком титре.

Результаты сравнительного изучения свойств фага GP-696 и фага ВФ, выделенного при производстве энтобактерина с использованием штамма 69-6, представлены в табл. 1. Видно, что фаги ВФ и GP-696 четко отличаются друг от друга по всем исследованным свойствам и, следовательно, не идентичны. Отсюда следует, что случаи фаголизиса этого штамма на производстве не связаны с его лизогенным состоянием.

Таблица 1. Свойства фагов ВФ и GP-696

Исследованные свойства	ВФ	GP-696
Лизирует штамм 69-6	+	-
Лизирует штамм IFO-3003	-	+
Чувствителен к низким температурам (инактивируется в холодильнике)	+	-
Чувствителен к обработке хлороформом	-	+
Инактивируется антисывороткой GP-696	-	+
Инактивируется антисывороткой ВФ	+	-
Оптимальная pH среды	7,0	7,5

Примечание: "+" - наличие признака; "-" - отсутствие признака.

Фагом GP-696 была лизогенизирована культура штамма *B. megaterium* IFO-3003 и получен его лизогенный вариант - штамм IFO-3003 (PG-96), иммунный к суперинфекции фагом GP-696.

Кроме штамма 69-6, при перекрестной проверке spot-тестом лизогенным оказались еще 10 из 25 исследованных штаммов, в том числе 5 штаммов 5 серотипа (*var. galleriae* H5a5b) и по одному из проверенных штаммов вариантов *dendrolimus*, *aizawai*, *finitimus*, *kenyae*, *entomocidus*. Все выделенные фаги отличались от фагов ВФ и GP-696 тем, что были устойчивы к действию хлороформа и низких температур, имели различных хозяев. Лизогенизация чувствительных культур этими фагами, наряду с лизогенным по фагу GP-696 штаммом IFO-3003, позволила изучить возможность образования у этих фагов С- и Vir-мутантов, способных преодолеть иммунитет лизогенных культур к суперинфекции. Результаты этих исследований приведены в табл. 2. Все штаммы, указанные в табл. 2, оказались устойчивыми к собственным фагам, т. е. были истинными лизогенами. Наличие у этих фагов С-мутантов при росте на индикаторных штаммах позволяет предположить появление у них также Vir-мутантов, хотя спонтанное появление их в штоках исследованных фагов мы не обнаружили.

Таблица 2. Способность фагов к образованию С и Vir-мутантов

Фаг выделения	Источник чувствительная	Индикаторная спонтанных мутантов культура	Наличие в штоках	
			С	Vir
PAz-1	<i>var. aizawai</i>	<i>B. cereus</i> 569	+	-
PF-1	<i>var. finitimus</i>	" " "	+	-
PE	<i>var. entomocidus</i>	<i>B. thuringiensis var. berliner</i>	+	-
PKen	<i>var. kenyae</i>	" " "	-	-
PD	<i>var. dendrolimus</i>	<i>B. cereus</i> 569	-	-
PG142	<i>var. galleriae</i>	<i>B. megaterium</i>	+	-
PG262	" " 262	" " "	+	-
PG316	" " 316	" " "	+	-
PG672	" " 672	" " "	-	+
PG3014	" " 3014	" " "	+	-

Не удалось выделить Vir-мутанты и при мутагенизации фагов гидроксиламином, проведенной по описанной методике [10].

Сравнительный анализ спектров литической активности фагов, выделенных на производстве и в лабораторных условиях из штаммов *var. galleriae* на различных промышленных штаммах *var. dendrolimus*, показал, что штаммы *var. dendrolimus* нечувствительны к фагам *var. galleriae*, выделенным из лизогенных культур в лабораторных условиях, что, по-видимому, свидетельствует об ином происхождении производственных фагов. Интересно, что заводские фаги, выделенные на производстве дендробациллина, имели весьма широкий спектр литической активности практически на всех испытанных серотипах *B. thuringiensis* (табл. 3).

Таким образом, фаги, выделенные на производстве, в отличие от фагов, выделенных в лаборатории из лизогенных штаммов *var. galleriae*,

обладают широким литическим спектром действия практически для всей группы бактерий *B. thuringiensis*; вместе с тем попытки с помощью мутагенеза получить вирулентные мутанты у выделенных в лабораторных условиях умеренных фагов не удаются. Поэтому мы склонны считать случаи фаголизиса на производстве энтомоцидных препаратов с использованием штаммов *B. thuringiensis* не следствием лизогенного состояния используемых штаммов бактерий, а скорее всего наличием внешнего источника заражения.

Таблица 3. Спектр литической активности вирулентных фагов *var. dendrolimus*, выделенных на Бердском химзаводе при производстве дендробациллина

Штаммы	Бактериофаги			
	РД1	РД2	РД3	РД4
<i>var. berliner</i>	-	-	+	+
<i>var. aizawai</i>	+	+	+	+
<i>var. alesti</i>	+	+	+	+
<i>var. finitimus</i>	+	+	+	+
<i>var. entomocidus</i>	-	+	+	+
<i>var. kenyae</i>	+	+	+	+
<i>var. caucasicus</i>	-	-	+	+
<i>var. subtoxicus</i>	-	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 69-6	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 262-6	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 3-16	+	+	+	+
<i>var. galleriae</i> 38	+	-	+	+
<i>var. galleriae</i> 142	-	+	+	-
<i>var. galleriae</i> 37-68	+	-	-	+
<i>var. galleriae</i> 71-3	+	+	+	+

Дальнейшие наши исследования были направлены на моделирование процесса фаголизиса бактериальной культуры при внешнем ее заражении вирулентным фагом. В этих опытах был использован производственный штамм *var. galleriae* 69-6, его бесспорные (аспорогенные) мутанты Sp-a и Sp-m. Как исходный штамм, так и его аспорогенные мутанты оказались высокочувствительными к заводскому вирулентному фагу ВФ при исследовании spot-тестом на газоне этих штаммов на пластинках агара в чашках Петри. Моделирование фаголизиса растущей культуры при внешнем заражении бактериофагом проводили по следующей методике: ночную аэрированную культуру штамма 69-6 и его аспорогенного мутанта освежали в свежем стерильном бульоне (МПБ) путем переноса культуры в серию из 10 пробирок. В первую пробирку фаг вносили сразу (время 0), в остальные - через 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 18 ч роста в условиях аэрации на качалке 220 об/мин при 30°. Последнюю пробирку оставляли незараженной (контроль опыта). Фаг в пробирки добавляли в количестве 1,0 мл с титром $2,0 \times 10^8$ частиц/мл. Результаты опыта регистрировали по оптической плотности растущей культуры на фотоэлектрическом колориметре КФК. Результаты приведены в табл. 4, из данных которой следует, что время наступления литической реакции зараженной растущей культуры зависит от времени

внесения фага в культуру. В литературе имеются данные о том, что время заражения фагом растущей культуры имеет существенное значение для наступления фаголизиса [6]. Наши исследования также подтверждают это обстоятельство во взаимоотношениях фаг-культура. Из данных этой таблицы видно также, что клетки штамма-хозяина наиболее активно взаимодействуют с частицами вирулентного фага в начале логарифмической фазы роста (2-3 ч роста после освежения культуры), на более поздних стадиях роста этот процесс затруднен и не по причине начала спорогенеза, поскольку и спорный и бесспорный штаммы ведут себя идентично.

Таблица 4. Зависимость времени наступления фаголизиса растущей культуры от времени заражения ее бактериофагом

Время заражения бактериофагом, ч	Время, необходимое для начала лизиса культуры, ч	Наличие вторичного роста после фаголизиса
Контроль (фаг не добавляли)	лизиса нет	-
О время	1	-
Через 1 ч после начала роста	2	-
Через 2 ч	2	+
Через 3 ч	2	+
Через 4 ч	4	+
Через 5 ч	7	+
Через 6 ч	8	+
Через 7 ч	10	+
Через 18 ч	лизиса нет	-

Следует отметить, что через 5-6 ч после наступления полного лизиса культуры наблюдается вторичный рост, обусловленный, однако, не резистентными к литическому фагу мутантами, а новой популяцией чувствительных бактериальных клеток. При этом титр фага в растущей вторичной культуре не снижается и держится на уровне 10^8 частиц/мл. Подобное поведение чувствительной культуры в присутствии вирулентного фага является необычным и, по-видимому, является результатом временного изменения рецепторного аппарата бактериальной культуры при взаимодействии с фагом. Аналогичное поведение отмечено у *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии вирулентного фага [7]. Авторы объясняют механизм этого явления временным смыыванием рецепторов для адсорбции фага с клеточных стенок бактерий фаговым лизосимом, в результате чего создается временное равновесие между вирусом и клеткой хозяина. Такое поведение, по мнению авторов, сложилось эволюционно и выгодно как вирусу, так и бактерии. Это объяснение нам представляется оправданным и для случаев, описанных нами выше.

С целью выяснения роли множественности заражения (дозы фага) в возникновении литического эффекта культуру штамма 69-6 заражали фагом ВФ с различной множественностью (от 10^1 до 10^{-6}), при этом, как и в предыдущем опыте, фаг вносили в растущую культуру в разное время от начала засева культур.

Таблица 5. Время проявления фаголизиса растущей культуры штамма 69-6 в зависимости от множественности заражения фагом ВФ

Условия эксперимента	Время проявления лизиса культуры после ее заражения фагом ВФ с множественностью инфекции, ч					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Заражение через 1 ч после начала роста культуры	2,0	2,3	3,0	3,8	4,6	5,3
Заражение через 2 ч после начала роста культуры	2,5	2,9	4,3	6,7	лизис не наблюдается	

Из табл. 5 следует, что время, необходимое для проявления литической реакции бактериальной культуры, зависит не только от времени попадания фага в растущую культуру, но и от множественности инфекции. При попадании фага в культуру через 2 ч после ее засева при множественности инфекции 10^{-5} - 10^{-6} в течение всего срока наблюдений (8 ч) лизис культуры не наступал: она росла нормально с такими же показателями оптической плотности, что и контрольная незараженная культура.

Полученные данные позволяют считать, что при фаголизисе на производстве заражение рабочей культуры фагом в ферментаторе должно происходить или с высокой множественностью (что маловероятно), или в ранний период засева аппарата.

Поскольку в наших исследованиях не подтвердилась причастность лизогенности производственных штаммов к производственному лизису культуры-продуцента, мы предположили, что источниками внешнего заражения производственных процессов могут быть фаги близкородственных спорообразующих бактерий, тем более что, как было показано выше, умеренный фаг, которым лизогенна культура *var. gallerae* 69-6 активен в отношении штамма *B. megaterium* IFO-3003.

Для проверки этого предположения нами была исследована эффективность посева бактериофагов СР-51 и СР-54 *B. cereus* [22, 24], тем более что литическая активность фагов в отношении некоторых штаммов *B. thuringiensis* ранее была показана [14].

Были получены различные штоки этих фагов с использованием в качестве хозяина штамма *B. cereus* 569 (эти штоки в дальнейшем будут обозначены символами СР-51.569 и СР-54.569) и чувствительного к этим штаммам *B. thuringiensis var. gallerae* 69-6 (эти штоки отмечены символами СР-51.ВТ и СР-54.ВТ). Как показали опыты по определению относительной эффективности посева этих фагов на различных штаммах *B. thuringiensis*, она всегда выше у штоков СР-51.569 и СР-54.569 (табл. 6). Как видно из таблицы, многие штаммы *B. thuringiensis* ограничивают рост фагов СР-51 и СР-54, однако, проходя один пассаж через штамм-

хозяина *B. thuringiensis* 69-6, они модифицируются, и модифицированный фаг растет на штаммах *B. thuringiensis* с такой же высокой эффективностью, что и на штаммах *B. cereus*.

Приведенные данные позволяют думать, что некоторые гетерогенные фаги близкородственных *B. thuringiensis* спорообразующих бактерий при росте на новом хозяине способны подвергаться модификации и с высокой литической активностью развиваться на штаммах *B. thuringiensis*. Установить истинное происхождение таких фагов практически невозможно, так как их бесчисленное множество.

Таким образом, хотя полученные данные не позволяют утверждать, что производственный фаголизис является результатом применения лизогенных штаммов, есть основание думать, что фаголизис на производстве является следствием заражения культуры продуцента вирусом извне. На такую мысль наводит способность бактериофагов близкородственных спорообразующих бактерий модифицироваться, пройдя один цикл развития на клетках нового хозяина.

Таблица 6. Относительная эффективность посева фагов CP-51 и CP-54

Штамм-хозяин	Относительная эффективность посева			
	CP-51.569	CP-54.569	CP-51.BT	CP-54.BT
<i>B. cereus</i> 569	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kenyae</i> P-35	0,2	0,1	1,0	1,0
var. <i>alesti</i> C-22	0,6	0,7	0,9	0,8
var. <i>sotto</i> C-55	0,6	0,6	0,8	0,8
var. <i>morrisoni</i>	0,3	0,7	1,0	1,0
var. <i>thompsoni</i>	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>galleriae</i> 38-19	0,1	0,2	1,0	1,0
var. <i>dendrolimus</i> B-68	0,1	0,1	1,0	1,0
var. <i>insectus</i> 1-51	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>caucasicus</i> 811-45	0,2	0,1	1,0	1,0
var. <i>berliner</i>	0,9	0,9	1,0	1,0
var. <i>israelensis</i>	0,5	0,5	1,0	1,0
var. <i>kurstaki</i>	0,3	0,3	1,0	1,0

Задача получения фагорезистентных мутантов-продуцентов энтобактерина и дендробациллина при таком необычном взаимодействии клеток бактерий с бактериальным вирусом у *B. thuringiensis* оказалась весьма сложной. Ни один из классических методов получения фагорезистентных мутантов, описанных Адамсом [1] и Стентом [5], не давал положительных результатов. Все выжившие в фаголизатах клетки вторичных культур оказывались носителями фага и вместе с освобождением от носительства теряли устойчивость к ним.

Для получения фагоустойчивых штаммов у производственных штаммов var. *dendrolimus* N58 и var. *galleriae* 69-6 были отобраны спонтанные мутанты, устойчивые к высоким концентрациям стрептомицина (5000 мг/мл). Последние обрабатывали нитрозогуанидином в сублетальных концентрациях: 500 мкг/мл для var. *galleriae* и 100 мкг/мл для var. *dendrolimus* в

течение 30 мин при температуре 30° в цитратном буфере (pH 6,0). Выжившие клетки высевали на пластинки 2,5%-ного мясопептонного агара, содержащего от 100 до 5000 мкг/мл стрептомицина. Поверхность пластинок предварительно пропитывали фаголизатом, содержащим не менее $1,0 \times 10^6$ фаговых частиц в 1 мл. Фаголизаты готовили на исходных чувствительных к стрептомицину штаммах 58 и 69-6. Выросшие стрептомицинустойчивые колонии с помощью spot-теста тотально проверяли на устойчивость к различным производственным вирулентным фагам.

С помощью описанной методики было проверено свыше 10 тысяч колоний и выделено 150 устойчивых к различным фагам мутантов. Последующий отбор позволил выделить лишь один мутант - С-5, который удовлетворяет требованиям производства по своим морфокультуральным и физиологическим свойствам, урожаю спор и времени высыпания спор, кристаллообразованию и вирулентности для гусениц непарного шелкопряда. Проверка полученного мутанта в производственных условиях подтвердила его положительные технологические качества [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Адамс М. Бактериофаги. М., 1961.
2. Арутюнян С. Генетика, 20, 5, 730-737, 1984.
3. Арутюнян С. Биотехнология, 1, 9-13, 1987.
4. Карабеков Б.П. Авт. свид. СССР 699016, 1979.
5. Стент Г. Бактериальные вирусы. М., 1963.
6. Goldberg R., Gallacota B. Spores 2, 276-290, 1961.
7. Herbert B., Gould H., Chain E. Eur. J. Biochem., 30, 330-338, 1972.
8. Kwetlas M., Rogoff M. Spores 2, 254-276, 1961.
9. Matsui T. Hakko to kole. 39, 294-308, 1977.
10. Ogata S. Biotechnol. and Bioeng., 22, 1, 177-193, 1986.
11. Oki T., Osaki A. Agric. Boil. Chem., 31, 1466-1473, 1997.
12. Oki T., Matsui T., Osaki A. Agric. Boil. Chem., 31, 861-867, 1987.
13. Thorne C. Canad. J. Microbiol., 21, 2, 328, 1975.
14. Van Tassei R., Yousten A. Canad. J. Microbiol., 22, 4, 583, 1976.
15. Yelton D., Thorne C. J. Bacteriol., 102, 2, 573, 1970.

Поступила 16.IX.1997

**АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ СЕРНЫЕ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИЕ
БАКТЕРИИ ИЗ СОДОВЫХ СОЛОНЧАКОВ АРМЕНИИ****А.Х. ПАРОНЯН***Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян*

Впервые из разных образцов почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины выделен и охарактеризован ряд алкалофильных галотолерантных миксотрофных серных пурпурных бактерий. Установлено широкое распространение этих микроорганизмов в содовых солончаках, а также их таксономическое и функциональное разнообразие. На основании изучения морфологических и физиолого-биохимических особенностей выделенные культуры отнесены к родам *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*.

Արարատյան հարթավայրի սոդային աղուտներից վերցված հողի, հոսքային և գրունտային ջրերի տարբեր նմուշներից առաջին անգամ անջատվել և բնութագրվել է մի շարք ալկալոֆիլ հալոտոլերանտ միքսոտրոֆ ծծմբային պուրպուր բակտերիաներ: Հաստատվել է այդ միկրոօրգանիզմների լայն տարածվածությունը սոդային աղուտներում, ինչպես նաև նրանց տատանմանական և ֆունկցիոնալ բազմազանությունը: Սորֆոլոգիական և ֆիզիոլոգո-կենսաքիմիական ստանձնահատկությունների ուսումնասիրման հիման վրա որոշվել է անջատված կուլտուրաների պատկանելությունը *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* ցեղերին:

A number of alcalophilic mixotrophic halotolerant sulfur purple bacteria from various samples of soils and underground waters of soda salted soils of Ararat plain has been isolated and characterized. Their wide distribution in soda salinated soils as well as taxonomical and metabolic diversity have been shown. The cultures isolated were assigned to *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* genera.

Фототрофные бактерии - алкалофилы - содовые солончаки

Фотосинтезирующие бактерии занимают важное место среди микроорганизмов [6, 9, 13].

В последнее время значительно возрос интерес к микроорганизмам, способным к существованию в экстремальных, в частности алкалофильных условиях окружающей среды. Это объясняется как научной важностью вопроса, так и практическим значением таких микроорганизмов [1, 7, 10].

В литературе мало сведений об алкалофильных фототрофных микроорганизмах, выделенных из солончаковых почв. Имеющиеся данные в основном касаются фототрофной экстремофильной микрофлоры различных соленых (содовых) водных экосистем [2, 7, 12]. Солончаковые почвы Араратской равнины в этом отношении до сих пор не были исследованы. Поиск и выделение фототрофных бактерий с экстремальными свойствами, изучение их физиологических особенностей и путей практического использования представляется актуальной задачей в связи с дальнейшим восстановлением заброшенных земель.

Настоящая работа посвящена выделению и описанию алкалофильных форм фототрофных бактерий из содовых солончаков с целью определения их таксономического статуса.

Материал и методика. Материалом для выделения фотосинтезирующих бактерий служили разные образцы почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины.

Для получения накопительных культур образцы обрабатывали методом Виноградского [3] или же их вносили непосредственно в различные селективные питательные среды с разным значением pH, содержанием источников питания и хлористого натрия. Накопительные культуры высевали методом серийных разведений в агаризованные среды в пробирки для получения глубинных колоний. Выросшие колонии вырезали из агара и переносили в соответствующие свежие питательные среды. Культуры выращивали в люминостате при температуре 28-35° и освещении 1500-2500 люкс лампами накаливания. Чистоту культур проверяли микроскопированием, а также высевали на МПА и среду Постгейта для обнаружения сульфатредуцирующих бактерий [15].

Рост культур определяли измерением оптической плотности суспензии на спектрофотометре СФ-26 при длине волны 660 нм. Спектры поглощения клеток культур в видимой области регистрировали на спектрофотометре "Specord UV-Vis". Экстракцию каротиноидов проводили методом Иенсена [11], идентификацию - на основании цвета, спектров поглощения и величин Rf отдельных пигментов, разделенных тонкослойной хроматографией на пластинках "Silufol".

Морфологию клеток изучали с помощью фазово-контрастного и электронного микроскопов [5]. Фиксацию клеток культур для ультратонких срезов проводили методом Келленбергерра. Для выявления элементарной серы клетки после обработки глутаральдегидом помещали в 1%-ный раствор AgNO_3 на 2 ч [2].

Отношение культур к различным углеродным соединениям определяли добавлением в среду последних в качестве единственного источника углерода в количестве 0,2%. В качестве источников азота испытывали различные аминокислоты в количестве 0,1%, гидролизат казеина, мочевины и неорганические соли азота в количествах, соответствующих 290 мг азота на 1 л среды. Потребность культур в витаминах определяли прямым добавлением их в среды в разных сочетаниях.

Опыты по окислению тиосульфата проводили с суспензиями клеток из культур в экспоненциальной фазе роста. Тиосульфат определяли колориметрически [16], а содержание сульфатов - нефелометрическим методом [8].

Результаты и обсуждение. Из разных образцов почв, промывных и грунтовых вод содовых солончаков Араратской равнины выделен, очищен и изучен ряд культур алкалофильных и галотолерантных фототрофных бактерий.

Выделенные микроорганизмы, имея морфологические различия, обладают общими физиологическими признаками: грамотрицательные, мезофильные организмы с оптимумом температуры 30-32°. Диапазон pH роста 7,0-10,0 при оптимуме 9,0-9,5, для роста не требуют NaCl . Будучи выделенными из соленых образцов, являются выраженными галотолерантами и выдерживают в среде до 6-8% NaCl . За исключением изолятов, принадлежащих к роду *Chromatium*, которые являются строгими анаэробами, остальные - факультативные анаэробы. Ни одна культура не проявила способности к росту в темноте в анаэробных условиях, но все они строго осуществляли фотосинтез. Миксотрофы, источниками углерода и H-донорами одновременно могут служить и органические, и неорганические соединения.

Анализ данных показывает, что подобно несерным пурпурным бактериям большинство культур, кроме органических кислот, использует также разные сахара и спирты. Следует особо отметить усвоение некоторыми культурами таких полисахаридов, как инулин и декстрин. Действительно, изучение ферментативной деятельности штамма *Ectothiorhodospira sp.* подтвердило наличие щелочной инулиназы [4].

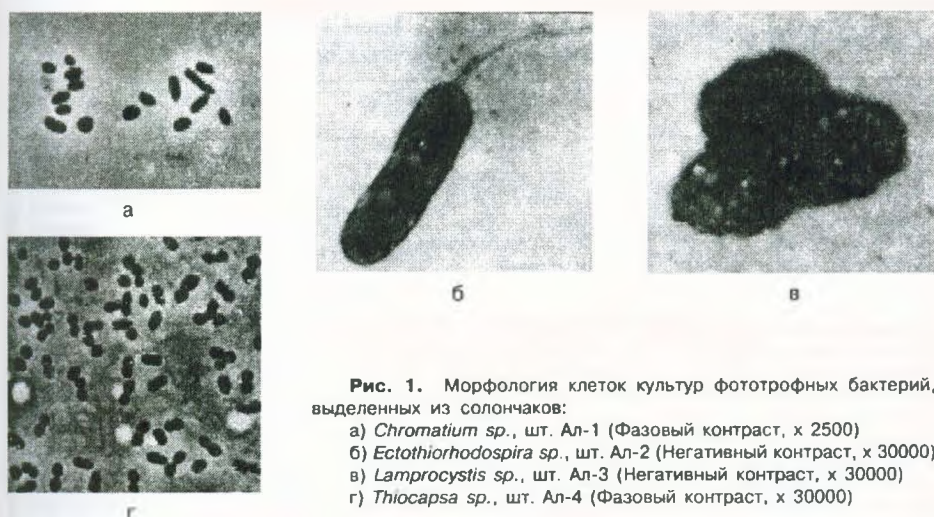


Рис. 1. Морфология клеток культур фототрофных бактерий, выделенных из солончаков:

- а) *Chromatium* sp., шт. Ал-1 (Фазовый контраст, х 2500)
 б) *Ectothiorhodospira* sp., шт. Ал-2 (Негативный контраст, х 30000)
 в) *Lamprocystis* sp., шт. Ал-3 (Негативный контраст, х 30000)
 г) *Thiocapsa* sp., шт. Ал-4 (Фазовый контраст, х 30000)

Эти организмы, будучи миксотрофами, при анаэробном росте способны осуществлять светозависимое окисление восстановленных серных соединений и в качестве Н-донора одинаково хорошо использовать сероводород и тиосульфат.

На основании изучения морфофизиологических и биохимических особенностей эти микроорганизмы дифференцированы как роды *Chromatium*, *Ectothiorhodospira*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa* (рис. 1-4, а-г).

Дифференцирующие признаки этих культур представлены в таблицах 1-4.

Таблица 1. Дифференцирующие признаки *Chromatium* sp., шт. Ал-1, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Ch. okenii</i> (типовой вид)	<i>Chromatium</i> sp., шт. Ал-1
Морфология		
Форма клетки	Овальные или бобовидные	Овальные
Размеры	8-15 мкм х 4,5-6,0 мкм	0,5-1,2 мкм х 1,4-4,0 мкм
Деление	Бинарное	Бинарное
Наличие жгутиков	Полярно расположенный жгутик	Полярно расположенный жгутик
Фотосинтетический аппарат	Везикулярный	Везикулярный
Газовые вакуоли	Отсутствуют	Отсутствуют
Общая физиология		
Температура роста	20-28°	28-35°
Потребность в NaCl	0-0,5%	0,5-1%
Оптимум pH	6,5-7,6	9,0-9,5
Потребность в витаминах	Витамин B ₁₂	Витамин B ₁₂
Аэробность	Строгий анаэроб	Строгий анаэроб
Фотосинтетические электрон-доноры	Сера, сульфид, в присутствии сульфида и бикарбоната также и органические кислоты	Сульфид, в присутствии бикарбоната также и органические кислоты
Сера накапливается	Внутри клетки	Внутри клетки
Ассимиляционное восстановление SO ₄	Отсутствует	Отсутствует
Источники азота	Соли аммония, мочевины	Соли аммония, мочевины
Цвет культуральной жидкости	Пурпурно-красный	Пурпурно-красный
Пигменты		
Хлорофиллы	Бактериохлорофилл а	Бактериохлорофилл а
Каротиноиды	Океноновой серии (окенон)	Океноновой серии (окенон)

Таблица 2. Дифференцирующие признаки *Ectothiorhodospira* sp., шт. Ал-2, выделенного из солончаков почв

Признаки	<i>Ectothiorhodospira mobilis</i> (типовой вид)	<i>Ectothiorhodospira</i> sp., шт. Ал-2
Морфология Форма клетки Размеры Деление Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	Короткие палочки 2,0-2,6 мкм x 0,7-1,0 мкм Бинарное Полярно расположенный жгутик Ламеллярный Отсутствуют	Слегка изогнутые палочки 1,-3,5 мкм x 0,5-1,2 мкм Бинарное Полярно расположенный жгутик Ламеллярный Отсутствуют
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Сера накапливается Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота Цвет культуральной жидкости	25-30° 2-3% 7,5-8,0 Витамин B ₁₂ Строгий анаэроб Сера, сульфид, тиосульфат, органические кислоты Вне клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония Коричнево-красный	28-35° Галотолерантность 6,5% 9,0-9,5 Не нуждается Строгий анаэроб Сульфид, тиосульфат, органические кислоты Вне клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония, некоторые аминокислоты Темно-красный
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия

Таблица 3. Дифференцирующие признаки *Lamprocystis* sp., шт. Ал-3, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Lamprocystis roseopersicina</i> (типовой вид)	<i>Lamprocystis</i> sp., шт. Ал-3
Морфология Форма клетки Размеры Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	От сферических до овальных Диаметр 3,0-35 мкм Один жгутик Везикулярный Содержит газовые вакуоли	Овальные Диаметр 2,5-3,8 мкм Один жгутик Везикулярный Газовые вакуоли неправильной формы
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота Цвет культуральной жидкости	20-25° Не нуждается 6,5-7,0 Не нуждается Строгий анаэроб Сера, сульфид, тиосульфат, в присутствии бикарбоната также и некоторые органические источники углерода Отсутствует Соли аммония Пурпурный, пурпурно-фиолетовый	28-35° Галотолерантность 6,5% 9,0-9,5 Аэротолерантный Строгий анаэроб Сульфид, тиосульфат, в присутствии бикарбоната также и некоторые органические источники углерода Отсутствует Соли аммония, некоторые аминокислоты Пурпурный-фиолетовый
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Ликопенальной серии	Бактериохлорофилл а Ликопенальной серии

Таблица 4. Дифференцирующие признаки *Thiocapsa* sp., шт. Ал-4, выделенного из солончаков

Признаки	<i>Thiocapsa roseopersicina</i> (типовой вид)	<i>Thiocapsa</i> sp., шт. Ал-4
Морфология Форма клетки Размеры Деление Наличие жгутиков Фотосинтетический аппарат Газовые вакуоли	Сферические или овальные Диаметр 1,2-3,0 мкм Бинарное Отсутствуют Везикулярный Всегда со слизистыми капсулами	Сферические или овальные Диаметр 1,5-2,5 мкм Бинарное Отсутствуют Везикулярный Всегда со слизистыми капсулами
Общая физиология Температура роста Потребность в NaCl Оптимум pH Потребность в витаминах Аэробность Фотосинтетические электрон-доноры Сера накапливается Ассимиляционное восстановление SO ₄ Источники азота	25-30° Не нуждается 7,0-7,5 Не нуждается Аэробные фототрофы, растут также аэробно в темноте Сера, сульфид, тиосульфат, некоторые органические источники углерода Внутри клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония	28-35° Галогерантность 6,5% 9,0-9,5 Не нуждается Аэробные фототрофы, растут также аэробно в темноте Сульфид, тиосульфат, некоторые органические источники углерода Внутри клетки Способны к сульфатредукции Соли аммония, некоторые аминокислоты
Цвет культуральной жидкости	От розового до розово-красного	Розово-красный
Пигменты Хлорофиллы Каротиноиды	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия	Бактериохлорофилл а Спириллоксантиновая серия

ЛИТЕРАТУРА

1. Заварзин Г.А., Жилина Т.Н., Ковбрин В.В. Микробиология, 68, 5, 579-599, 1999.
2. Компанцева Е.И. Микробиология, 54, 6, 974-982, 1985.
3. Кондратьева Е.Н. Фотосинтезирующие бактерии, 25-37, М., 1963.
4. Маркосян Л.С., Папикян С.Л., Паронян А.Х. Тр. Межд. симпозиума "Проблемы биохимии, радиационной и космической биологии". Дубна, 1, 160-172, 1997.
5. Методы общей бактериологии. Под ред. Ф.Герхарда и др., М., 1, 54-131, 1983.
6. Шестаков С.В. Биотехнология, 212-216, М., 1984.
7. Brayanseva I.A., Gorelenko V.M., Kompantseva E.I. et al. Int. J. Syst. Bacteriol. 49, 3, 697-703, 1999.
8. Dodgson K.S. Biochem. J., 78, 2, 312-315, 1961.
9. Drenes G. The phototrophic prokaryotes. Proc. ninth Int. Symp. of Phototrophic prokaryotes. Vienna, Austria. New York, 1-4, 1999.
10. Horikoshi K. FEMS Microbiol. Rev., 18, 2, 259-270, 1996.
11. Jensen S.L. The constitution of some bacterial carotenoides and their bearing on byosynthetic problems. Trondheim, 98-179, 1962.
12. Jones B.E., Grant W.D., Duckworth A.W., Owenson G.G. Extremophiles, 2, 1, 191-200, 1998.
13. Kondratieva E.N., Pfennig N., Truper H.G. The prokaryotes. Springer-Verlag, New York, 1, 312-330, 1992.
14. Ollivier B.m., Caumette P., Garsia J.L., Mah R.A. Microbiol. Reviews, 58, 1, 27-38, 1994.
15. Postgate J.R., Campbell I.L. Bacteriological Review, 30, 2, 732-738, 1968.
16. Schoon N.H. Acta chem. scand., 13, 3, 525-528, 1959.

Поступила 23.1.2000

ОБ АМИНОАЦИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ

А.А. ЭЛИАЗЯН, А.Х. ПАРОНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Выявлено наличие аминоксилазной активности у некоторых видов фототрофных бактерий. Подобраны оптимальные условия для биосинтеза фермента. Изучены методические подходы для повышения ацилазной активности.

Ֆոտոտրոֆ բակտերիաների մի քանի տեսակների մոտ հայտնաբերվել է ամինաացիլազային ակտիվություն: Ընտրվել են ֆերմենտի կենսասինթեզի օպտիմալ պայմանները: Ուսումնասիրվել են ացիլազային ակտիվության բարձրացման մեթոդական մոտեցումները:

The presence of the aminoacylase activity of photosynthetic bacteria was revealed. The optimal growth conditions of bacteria for enzymatic activity and methodical approaches for its increase have been investigated.

Фототрофные бактерии - аминокислоты - ацилазная активность

Одним из перспективных путей получения оптически чистых аминокислот является ферментативный метод расщепления химических рацематов аминокислот с применением микробных ацилаз. Исследования микробных аминоксилаз проводятся в целях поиска более активных продуцентов и определения характеристики ацилазной системы для выяснения ее биологического значения и возможностей направленного регулирования.

Аминоксилазы широко представлены у различных систематических групп микроорганизмов: бактерий, грибов, дрожжей [3, 6-8]. Исследования аминоксилаз у различных групп микроорганизмов показали, что они различаются по своим физико-химическим свойствам, что оказывает определенное влияние на выход фермента и его активность [1, 2, 6]. В этом аспекте в литературе нет сведений о представителях фототрофных бактерий. Между тем фотосинтезирующие бактерии представляют большой интерес как источник получения биомассы, богатой белком, витаминами и аминокислотами [5]. Среди них описаны многочисленные штаммы с высокой гидрогеназной, каталазной, нитрогеназной и другой ферментативной активностью [4, 9, 10].

Наша задача заключалась в выяснении наличия ацилазной системы у фотосинтезирующих пурпурных бактерий и изучении особенностей регуляции биосинтеза фермента у культур, обладающих выраженной ацилазной активностью.

Материал и методика. Объектом исследований были несерные пурпурные бактерии: *Rhodospirillum rubrum* (1 шт.), *Rhodobacter capsulatus* (3 шт.), *Rh.sulfidophilus* (1 шт.), *Rh.sphaeroides*

(4 шт.), *Rhodopseudomonas viridis* (1 шт.), *Rh. palustris* (3 шт.), всего 13 культур из коллекций МГУ и Института микробиологии НАН Армении.

Культуры выращивали на среде Ормеруда в течение 2-3 суток при анаэробных условиях в люминестате при освещении 2000 люкс и 30°. Собранные центрифугированием клетки трижды промывали охлажденным 0,1М фосфатным буфером и ресуспендировали в том же буфере. Реакционная смесь состояла из 1 мл клеточной суспензии, содержащей 20-30 мг в пересчете на сухой вес биомассы и 1 мл 0,2 М раствора субстрата, pH 7-8. Смесь инкубировали при 37° в течение часа. L-аминокислоты определяли методом хроматографии в тонком слое целлюлозы или на бумаге. Удельную аминокислотную активность выражали в мкМ/час/100 мг абсолютно сухой биомассы (6-7). В качестве субстратов применяли чистые препараты ацетил-производных расематов аланина, метионина, серина, триптофана и фенилаланина.

Результаты и обсуждение. Установлено, что большинство изученных штаммов фототрофных бактерий проявляют ацилазную активность в отношении нескольких ацил-производных аминокислот, т.е. обладают широким спектром субстратной специфичности. Некоторые из изученных микроорганизмов обладали слабой активностью (табл. 1).

Таблица 1. Ацилазная активность фототрофных бактерий
(мкМ аминокислоты/100 мг абсолютно сухой биомассы/час)

Штаммы	Ацетил DL -				
	метионин	аланин	серин	фенилаланин	триптофан
<i>Rh. capsulatus</i>	120,7	130,2	53,5	130,2	2,9
<i>Rh. capsulatus</i> B10	98,0	68,5	31,8	73,8	3,5
<i>Rh. capsulatus</i> lowis	87,5	110,0	28,7	122,4	5,6
<i>Rh. palustris</i> -1	126,3	92,7	84,3	108,9	10,3
<i>Rh. palustris</i>	97,8	83,6	65,6	73,9	8,7
<i>Rh. palustris</i> Ф-255	90,0	49,9	90,1	63,8	11,2
<i>Rh. sphaeroides</i> 59/3	57,6	63,8	23,6	102,8	13,5
<i>Rh. sphaeroides</i>	55,2	58,6	18,2	87,6	9,5
<i>Rh. sphaeroides</i> 8259	48,9	36,5	7,5	59,7	3,4
<i>Rh. sphaeroides</i> Am	70,5	41,0	14,3	60,0	8,5
<i>Rh. viridis</i>	45,4	68,7	11,5	121,3	9,3
<i>Rh. sulfidophilus</i>	41,2	32,7	12,2	110,4	4,8
<i>Rh. rubrum</i>	38,8	118,7	33,4	90,0	3,7

Для выявления оптимальных условий биосинтеза ацилаз и особенностей регуляции активности фермента у фототрофных бактерий были отобраны *Rh. capsulatus* и *Rh. palustris*-1, которые отличались выраженной ацилазной активностью. Как видно из табл. 2, на ацилазную активность благоприятно

Таблица 2. Влияние питательной среды на рост и ацилазную активность
(мкМ аминокислоты/100 мг абс. с. б./час)

Добавки к питательной среде, 1%	<i>Rh. capsulatus</i>		<i>Rh. palustris</i> -1	
	рост, ОП	аланин	рост, ОП	метионин
Пептон	0,51	148,2	0,47	156,0
Дрожжевой экстракт	0,48	152,7	0,40	149,9
Кукурузный экстракт	0,35	80,1	0,28	101,2
Контроль	0,30	115,2	0,23	121,3

действует наличие в питательной среде пептона или дрожжевого экстракта. В этом случае одновременно повышается выход биомассы.

Изучалось влияние ацилпроизводных аминокислот в качестве индукторов на ацилазную активность. Выявлено, что при наличии ацилпроизводных аминокислот продуцирование фермента не происходит (табл. 3).

Таблица 3. Влияние ацилпроизводных аминокислот на рост и ацилазную активность

Штаммы	Субстрат 0,01%	Без субстрата		С субстратом	
		рост, ОП	мкМ/100 мг абс.с.б.	рост, ОП	мкМ/100 мг абс.с.б.
<i>Rh. capsulatus</i>	ацетил DL-аланин	0,35	122,0	0,25	120,1
<i>Rh. palustris</i>	ацетил DL-метионин	0,30	125,3	0,26	122,7

Известно, что присутствие в среде некоторых ионов металлов, особенно кобальта, в большинстве случаев стимулирует ферментативную активность микроорганизмов. Как видно из табл. 4, активность ацилаз значительно повышается в присутствии ионов кобальта. Другие металлы оказывают угнетающее действие. Наиболее заметное ингибирующее влияние оказывают Cu, Zn, Ni, менее - Ca, Fe, Mn. Оптимальная концентрация Co^{++} для получения метионина культурой *Rh. palustris* составляет $10^{-3}M$, а для аланина - культурой *Rh. capsulatus* - $10^{-2}M$.

Таблица 4. Влияние ионов металлов на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б.с/час)

Ионы металлов, $10^{-3}M$	<i>Rh. palustris</i>	<i>Rh. capsulatus</i>
	метионин	аланин
Cu	32,3	41,5
Mg	49,7	50,0
Ca	53,6	38,9
Zn	28,0	30,2
Mn	88,7	98,9
Fe	82,5	80,1
Co	130,8	145,3
Ni	30,0	38,0
Контроль	100,8	120,3

Максимальная ацилазная активность проявляется в начале стационарной фазы роста, что соответствует 48 ч культивирования, тогда как максимальное накопление биомассы имеет место на четвертые сутки выращивания (рис. 1).

Установлено, что оптимальное значение pH для деацилирования отдельных аминокислот находится в пределах 7,5-8,5.

Нами были применены разные методы инкубирования фототрофных бактерий для увеличения ацилазной активности.

Клетки фототрофных бактерий обрабатывались различными органическими растворителями, известными как вещества, увеличи-

вающие проницаемость клеток и способствующие активности ферментов. Клетки бактерий до внесения в инкубационную смесь держали в одном из следующих растворителей: толуоле, спирте, хлороформе, ацетоне в течение 5, 10, 20 мин (табл. 5). Ацилазная активность повышалась, когда клетки обрабатывались ацетоном и толуолом, эффект был заметен иногда даже при небольших сроках обработки - 5, 10 мин. При 20-минутной обработке значительно увеличивалась степень гидролиза ацетил DL-метионина.

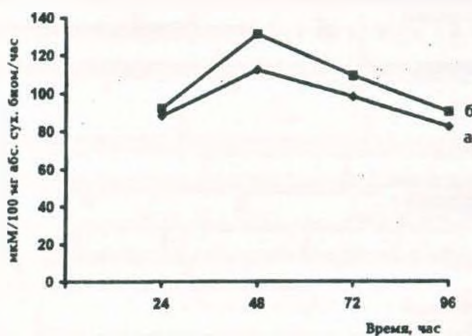


Рис. 1. Ацилазная активность в динамике роста:
а - *Rh. palustris* (метионин);
б - *Rh. capsulatus* (аланин)

Таблица 5. Влияние обработки клеток органическими кислотами на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б./час)

Органические растворители	<i>Rh. palustris</i> (метионин)			<i>Rh. capsulatus</i> (аланин)		
	5 мин	10 мин	20 мин	5 мин	10 мин	20 мин
Спирт	95,6	101,2	108,0	98,7	98,0	107,5
Ацетон	106,3	106,5	120,3	28,0	125,7	131,4
Хлороформ	80,9	88,7	89,0	90,3	89,0	89,6
Толуол	102,8	104,7	122,4	125,0	123,4	125,6
Контроль	98,7			110,3		

Известно, что поверхностно активные вещества (ПАВ) оказывают как стимулирующее, так и ингибирующее влияние на ферментативную активность различных микроорганизмов. Показано, что прединкубирование фототрофных бактерий с разными твинами в концентрации 0,1% в течение 24 ч приводит к увеличению ацилазной активности (табл. 6). Наиболее положительное действие отмечено в вариантах с твин-40 и твин-80.

Таблица 6. Влияние ПАВ на ацилазную активность (мкМ/100 мг абс.с.б./час)

ПАВ	<i>Rh. palustris</i> (метионин)	<i>Rh. capsulatus</i> (аланин)
Твин-40 (эфир пальмитиновой к-ты)	140,8	149,9
Твин-60 (эфир стеариновой к-ты)	98,8	107,7
Твин-80 (эфир олеиновой к-ты)	142,3	136,5
Контроль	108,3	116,2

Таким образом, все исследованные штаммы фотосинтезирующих бактерий проявляют аминоксилазную активность. Ацилазы фототрофных бактерий обладают широким спектром субстратной специфичности. При подборе оптимальных условий культивирования и методов обработки аминоксилазную активность фототрофных бактерий можно значительно повысить.

Полученные результаты позволяют более активно изучать группы фототрофных бактерий с целью поиска новых перспективных продуцентов аминоксилаз.

Авторы выражают глубокую признательность академику Африкян Эврикю Гегамовичу за научную консультацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аболинь Т.К. В сб.: Управление микробным синтезом, 76-82, Рига, 1977.
2. Африкян Э.К. Микробные ацилазы. Микробиологический синтез, 1, 17, 1967.
3. Кимура Ю., Африкян Э.К. ДАН СССР, 173, 4, 945-947, 1967.
4. Цыганков А.А., Гоготов И.Н., Кондратьева Е.Н. Микробиология, 53, 3, 392-398, 1984.
5. Элиазян А.А., Паронян А.Х., Африкян Э.К. Биотехнология, 6, 51-54, 1997.
6. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 21, 5, 304-307, 1957.
7. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 24, 1, 31-36, 1960.
8. Chibata I., Ishikawa T., Tosa T. Bull. Agr. Chem. Soc. (Japan), 24, 1, 37-44, 1960.
9. Kitai K., Jaoping I., Gary P. J. Bacteriol., 181, 3, 1698-1702, 1999.
10. Terzenbach D. P., Blaut M. Arch. Microbiol., 169, 2, 503-508, 1998.

Поступила 10.X.2000

О СПОСОБАХ ХРАНЕНИЯ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Л.Г. АКОПЯН, Л.М. ЧАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Исследования по культивированию, замораживанию, высушиванию, хранению в замороженном состоянии, восстановлению сухих культур молочнокислых бактерий при различных температурных режимах показали, что они сохраняют жизнеспособность в замороженном состоянии при температуре - 12-18° в течение 6-12 месяцев, при 4-6° - в течение 5 мес., при 18-20° - 10 дней, при 37° - 6 дней; лиофилизация обеспечивает повышенное содержание бактериальных клеток, стойкость хранения, гарантирует восстановление из длительно хранившихся сухих заквасок.

Կաթնաթթվային բակտերիաների կուլտիվացման, սառեցման, չորացման, սառեցված վիճակում պահպանման, չոր կուլտուրաների տարրեր ջերմային ռեժիմներում վերականգնման հետազոտությունները ցույց են տվել, որ կաթնաթթվային բակտերիաները պահպանում են իրենց կենսունակությունը - 12-18° 6-12 ամիս, 4-6°-ում 150 օր, 18-20°-ում - 10 օր, 37°-ում - 6 օր, լիոֆիլիզացիան ապահովում է բակտերիալ բջիջների բանակի ավելացումը, նրանց կայունությունը, երկարատև պահպանման ժամանակ երաշխավորում է չոր մակարիդների վերականգնումը:

Studies on cultivation, freezing, drying, preservation in frozen state, restoration of dry cultures of the lactic acid bacteria have been carried out. The lactic acid bacteria retain their viability in frozen state at 12-18° for 6-12 months, at 4-6° - 150 days, at 18-20° - 10 days, at 37° - 6 days. Lyophilization provides decrease of bacterial cells, their stability at long-term preservation, guarantees restoration of dry starters.

Молочнокислые бактерии - способы хранения

Одним из способов сохранения молочнокислых бактерий (мкб) являются периодические их перевивки в стерильное обезжиренное молоко. Однако исследования в этой области показали, что при периодических перевивках в стерильное обезжиренное молоко мкб постепенно утрачивают производственноценные свойства, активность кислотообразования, способность образовывать четырехуглеродные соединения, протеолитическую активность и т.д. Замечено, что стойкость во многом зависит от режима культивирования [3].

Лучшим способом сохранения производственноценных штаммов мкб является их высушивание лиофилизацией в ампулах и дальнейшее хранение в холодильнике. Данный метод сушки в настоящее время находит все большее применение для приготовления сухих заквасок. Хотя замораживание и последующее высушивание не может гарантировать сохранение всех свойств молочнокислых бактерий, данный метод дает возможность длительно сохранять жизнеспособность и все важнейшие физиолого-биохимические свойства микроорганизмов. Большое влияние на выживаемость клеток при сушке и последующем хранении сухих культур оказывает состав среды.

Для лучшего сохранения клеток при сушке и повышения стойкости сухих мкб при хранении многие авторы рекомендуют добавлять к среде

различные вещества [1, 4]. Однако при этом не устранялось полностью, а лишь несколько смягчалось губительное действие продуктов жизнедеятельности мкб. Дальнейшее совершенствование способа сохранения мкб лиофилизационной сушкой шло в направлении применения при сушке культур защитной среды. Многие из авторов как в бывшем СССР, так и зарубежом рекомендовали различные по составу и свойствам защитные среды. При высушивании данных культур в качестве защитной среды широко применяли обезжиренное молоко с повышенным содержанием сухих веществ (16-18% и более) и различными дополнительными компонентами [7, 8].

Главными факторами, определяющими выживаемость микроорганизмов при лиофилизационной сушке, являются температура, скорость замораживания и температура хранения. Чем выше температура хранения, тем больше гибнет клеток в сухих культурах (заквасках). Из изложенного следует, что качество и стойкость сухих заквасок зависит не только от биологических особенностей микроорганизмов, но и от параметров технологического процесса и условий их хранения [9].

Целью настоящих исследований являлось изучение влияния режима культивирования, различных методов хранения, замораживания и условий восстановления сухих заквасок мкб на жизнеспособность и свойства культур.

Материал и методика. Сухие и жидкие мкб получены в лаборатории бродильных микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении и депонированы в Центре депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки Армении и в лаборатории заквасок Научно-исследовательского института молочной промышленности (Россия-ВНИМИ). Испытаны штаммы мкб следующих видов: *Lactobacillus acidophilus* n.v. Ер.317/402 "Наринэ" - ИНМИА-9602 (*L. acidophilus*) [5, 6], *Lactobacterium mazuni* №2 "Каринэ" - ИНМИА-9604 (*Lbm. mazuni*) [6], *L. acidophilus* ЕН₁, ЕН₂ (автор штаммов *L. acidophilus* ЕН₁, ЕН₂ Л.А.Ерзинкян.). Титруемую кислотность определяли в градусах Тернера (°Т), количество мкб определяли методом предельных разведений по Мак-Креди [11].

Для приготовления сухой закваски в стерилизованное (1 атм, 15 мин) остуженное молоко жирностью 2,7-3,0% добавляли дрожжевой автолизат - 1,5-2,0%, гидролизованное молоко - 5 г/л и пепсин - 0,00015%. Эти добавки стимулируют развитие клеток. Затем молоко заквашивали мкб и выдерживали в термостате при 37-38° в течение 7-8 ч. Через 3, 5 ч проводили нейтрализацию среды (рН 6,6-6,8) 25%-ным водным раствором NaHCO₃. Скващенное молоко выдерживали 2-3 ч в холодильнике при 5-8°. Для приготовления сухой закваски жидкую закваску перемешивали в стерильных условиях, у горячей спиртовой горелки разливали в стерильные (2 атм, 5 мин) склянки, которые закрывали стерильными резиновыми пробками и металлическими колпачками и замораживали при - 50-55° в течение 2-2,5 ч. После замораживания, убрав металлические колпачки и резиновые пробки, склянки закрывали стерильными (2 атм) ватными пробками и высушивали в течение 22-24 ч при начальной температуре сушки 30° и конечной - 37-39° [2]. Антагонистическое свойство мкб определяли методом диффузии в агар [11].

Результаты и обсуждение. Влияние сроков культивирования на развитие мкб. Опыты проводили в два этапа.

Первый этап - мкб культивировали в стерильном молоке в течение 7, 20 и 30 дней при 37°. Из табл. 1 видно, что при перевивке культур через 20-30 суток не наблюдалось существенной разницы в энергии кислотообразования.

Второй этап - культивирование на стерилизованном обезжиренном молоке в течение 60, 90, 120 и 150 дней. По данным той же таблицы,

культуры лучше сохраняются при перевивке через 7-30 суток. Указанные сроки являются наиболее оптимальными для перевивок.

Таблица 1. Выживаемость и кислотообразование мкб при периодических перевивках

Мкб и штаммы	Энергия кислотообразования, °Т						
	перевивки через, сут						
	7	20	30	60	90	120	150
<i>Lactobacillus acidophilus</i> n.v. Ер.317/402 "Наринэ"	180	172	168	150	130	100	90
<i>L. acidophilus</i> 4 ар/8	160	152	150	130	125	105	85
<i>L. acidophilus</i> ЕН ₁	150	145	140	112	100	85	70
<i>L. acidophilus</i> ЕН ₂	150	140	138	110	90	82	68
<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринэ"	150	145	150	120	100	90	75

Примечание: температура культивирования 37°.

Замораживание и хранение в замороженном состоянии. Изучение влияния хранения различных видов мкб в замороженном состоянии на их жизнеспособность, биологическую активность (кислотообразование, титр клеток) показало (табл. 2), что жизнеспособность испытуемых штаммов в замороженном состоянии, при температуре от -12 до -18° сохраняется без изменений свойств в течение 6-12 месяцев. Кроме того видно, что концентрация сухих веществ в молоке также влияет на сохранение жизнеспособности замороженных культур: она должна составлять не менее 16%.

Таблица 2. Сохранение жизнеспособности мкб в замороженном состоянии

Наименование микроорганизмов	Сроки замораживания, мес.			
	6		12	
	предельная кислотность в °Т* на стерильном обезжиренном молоке			
	11% сухого вещества	16% с.в.	11% с.в.	16% с.в.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 317/402 “Наринэ”	450	500	350	400
<i>L. acidophilus</i> 4 ар/8	350	400	300	350
<i>Lbm. mazuni</i> №2 “Каринэ”	300	350	250	300

Примечание: * кислотность после 3-кратных перевивок.

Хранение при разных температурных режимах. Опыты показали, что при низкой температуре (+4°) жидкие закваски остаются активными в течение 15 сут. При температуре 18-20° жидкие закваски сохраняют жизнеспособность в течение 150 дней, за исключением *Lbm. mazuni* №2 "Каринэ".

При 18-20° уже на 10 сут отмечалось значительное изменение этих показателей. При добавлении к среде дрожжевого автолизата, гидролизованного молока выживаемость мкб продлевается (табл. 3).

Высушивание и хранение сухих культур. Молочная кислота, являясь продуктом жизнедеятельности мкб, в определенных количествах сама же подавляет их развитие, снижает титр клеток. Установлено, что чем выше

титр мкб в сухой закваске, тем больше продолжительность ее хранения и тем лучше ее производственные свойства.

Таблица 3. Хранение мкб при разных температурных режимах

Наименование микроорганизма	Выживаемость, дни														
	30	60	90	120	150	180	5	10	15	20	1-3	4	5	6	7
	4°						18-20°				37°				
<i>L. acidophilus</i> п.в. Ер.317/402“Наринэ”	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
<i>L. acidophilus</i> 4 аг/8	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>Lbm. mazuni</i> №2 “Каринэ” (с добавлением 2,5-2% дрожжевого автолизата и 5% гидролизованного молока	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
<i>L. acidophilus</i> п.в. Ер.317/402 (дрож. авт., гид. мол.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. acidophilus</i> 4 аг/8 (дрож. гид.)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

С целью повышения активности роста мкб использовали 1,5-2,0%-ный дрожжевой автолизат. В процессе культивирования в среде накапливаются стимуляторы роста мкб, в частности, витамины группы В. Кроме того, внесение в молоко естественных биологических субстратов - гидролизата обезжиренного молока (5 г/л), содержащего продукты распада белков молока (полипептиды, аминокислоты), микроэлементов и других веществ, положительно влияет на сохранение микрофлоры и обеспечивает повышение активного выхода готового продукта. В среду вносили также пепсин, который предварительно растворяли в 100 мл стерильного физиологического раствора. Пепсин, являясь протеолитическим ферментом животного происхождения, проводит гидролиз белков молока до аминокислот, которые хорошо усваиваются мкб и стимулируют их рост. Установлено, что дрожжевой автолизат, гидролизованное молоко и пепсин способствуют увеличению титра клеток (табл. 4). Последний увеличивается также благодаря активному снижению величины рН путем периодической нейтрализации среды 25%-ным водным раствором NaHCO_3 .

Исследования показали также, что бактериальная чистота сухой закваски (по микроскопическому препарату), продолжительность свертывания молока, сроки ее хранения, характер сгустка, титр клеток, органолептические свойства выше и лучше, чем в контроле (табл. 5).

В табл. 6 приведены технологические параметры для получения сухой закваски. Установлено, что для сохранения активности мкб наиболее благоприятной при сушке начальной температурой является 38-39°.

Сравнительное изучение всех основных признаков известного лактобактерина и сухой закваски показало, что количество живых клеток в лактобактерине значительно ниже (3,2 млн/г), чем в сухой закваске (5-6 млрд/г).

Таблица 4. Количество живых клеток в сухой закваске, млрд/г

Показатели	Без раскисления		Раскисление после 3 ч культивирования		Раскисление после 5 ч культивирования	
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринз"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринз"
Заквашенное стерильное молоко - контроль	3,2	2,8	3,4	3,0	3,6	3,2
Заквашенное стерильное молоко с добавлением в отдельности: - гидролизованного молока 5 г/л	3,6	3,0	3,8	3,2	4,2	4,0
- дрожжевого автолизата 1,5-02%	3,8	3,2	4,0	3,4	4,6	4,2
- пепсина - 0,00015%	4,0	3,4	4,2	3,6	4,8	4,6
Заквашенное стерильное молоко с добавлением вместе: гидролизованного молока 5 г/л, дрожжевого автолизата 1,5-2% и пепсина - 0,00015%	4,6	3,6	4,8	4,0	5,6	5,0

Антимикробная активность сухой закваски по отношению к тест-культурам весьма высокая. Лактобактерин не проявляет антимикробных свойств к *Staphylococcus aureus*, а по отношению к *Escherichia coli* и другим тест - микробам значительно менее активен, чем предложенная сухая закваска (табл. 7)[2].

Таблица 5. Некоторые свойства сухой закваски *L. acidophilus* 317/402 "Наринз" при хранении

Показатели	Хранение, мес.					
	0	4	8	12	24	36
Количество живых клеток, млрд/г	5,6	5,0	4,8	4,0	3,0	2,1-2,0
Консистенция и внешний вид	с однородной консистенцией, очень тягучая, плотный сгусток			тягучесть восстанавливается через 2-3 пересева		тягучесть восстанавливается через 4-5 пересевов
Вкус и запах	после восстановления приятный, характерный кисломолочный вкус, хороший аромат			после восстановления через 2-3 пересева характерный кисломолочный вкус, хороший аромат		

Таким образом, этот способ хранения мкб обеспечивает повышение содержания бактериальных клеток мкб, повышение стойкости при хранении, гарантирует получение восстановленных заквасок высокого качества и их стойкость при пересевах.

Хранение сухих заквасок. Практическая ценность сухих заквасок определяется их качеством не только в свежем состоянии, но и в течение установленного срока действия.

Таблица 6. Влияние технологических параметров на получение сухой закваски

Показатели	Количество живых клеток в 1 г сухой закваски, млрд.		
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"	<i>Lbm. mazuni</i> №2 "Каринэ"	лактобактерин прототип
Температура замораживания, °С, по прототипу	-40 3,0	3,2	3,2 млн
	-50 5,0	3,6	нет данных
	-55 5,6	4,2	" "
	-60 4,0	3,8	" "
Продолжительность замораживания, ч	1,0 2,2	2,0	нет данных
	1,5 2,6	2,4	" "
	2,0 4,8	4,0	" "
	2,5 5,6	4,8	" "
	3,0 5,2	5,0	" "
Продолжительность высушивания, ч	20 3,2	3,0	нет данных
	22 3,6	3,2	" "
	23 4,8	4,0	" "
	24 5,6	4,8	" "
	25 5,2	5,0	" "
Начальная температура высушивания, °С	25 4,0	4,0	нет данных
	30 5,6	4,8	" "
	35 5,2	4,2	" "
Окончательная температура высушивания, °С	35 3,2	3,0	-
	36 3,6	3,2	-
	37 4,8	4,0	-
	38 5,2	4,8	-
	39 5,6	5	60
	40 4,8	4,0	-

Таблица 7. Антагонистические свойства мкб при хранении

Наименование микроорганизмов	Зона угнетения (подавления) роста, мм в мес.								
	<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"						Лактобактерин		
	0	3	6	12	24	36	3	6	12
<i>Escherichia coli</i>	24-28	22-26	19-22	16-20	14-18	12-24	6-7	5-6	3-4
<i>Staphylococcus aureus</i>	24-26	20-24	18-20	16-18	14-16	12-14	0	0	0
<i>Salmonella typhimurium</i>	24-26	20-24	16-20	15-18	13-15	11-13	6-8	5-6	6-7
<i>Klebsiella sp.</i>	23-26	21-22	19-20	17-18	15-17	13-15	7-8	6-7	4-5
<i>Mycobacterium phlei</i>	26-28	20-23	17-20	15-18	13-15	10-15	нет данных		
<i>Citrobacter sp.</i>	24-28	20-22	16-18	13-15	12-13	10-11	нет данных		
<i>Bacillus subtilis</i>	25-27	20-24	18-20	15-20	13-18	11-15	нет данных		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25-29	20-24	17-20	15-19	13-18	9-12	нет данных		
<i>Serratia marcescens</i>	26-28	20-25	19-21	17-18	15-17	12-15	нет данных		
<i>Mycobacterium luteum</i>	26-30	22-25	18-22	18-20	18-20	12-15	нет данных		

Для установления стойкости сухих заквасок последние хранились в помещении с нерегулируемой температурой при 18-25°, в холодильнике при 4°-6° и в холодильной камере при -12-18° (табл. 8).

В помещении с нерегулируемой температурой наступала быстрая гибель клеток; уже в течение первых 3 месяцев вымерло 40-48% клеток. При более длительном хранении сухих заквасок в данных температурных условиях наблюдалось заметное снижение их качеств (свертываемость, консистенция, внешний вид, вкус, запах).

Таблица 8. Выживаемость сухих заквасок мкб при разных температурных режимах хранения

Сухие мкб	Интервал исследования, мес.	Хранение сухих заквасок при разных температурах		
		количество клеток, млрд/г		
		4-6°	18-25°	-12-18°
<i>L. acidophilus</i> 317/402 "Наринэ"	0	5,6	5,6	5,6
	3	5,6	5,0	5,6
	6	5,4	3,2	5,4
	9	5,0	2,8	5,0
	12	4,8	0,5	4,8
	24	4,0	-	4,6
	36	3,0	-	4,5
<i>Lbm. mazuni</i> № 2 "Каринэ"	0	5,0	5,0	5,0
	3	5,0	5,0	5,0
	6	4,8	4,0	4,8
	9	3,8	2,6	4,6
	12	3,6	2,0	4,4
	24	2,0	-	4,2
	36	1,2	-	4,0
Лактобактерин	0	3,2	3,2	3,2
	3	3,0	2,6	3,0
	6	2,2	2,0	2,8
	9	2,0	1,0	2,4
	12	1,0	-	2,0
	24	0,6	-	1,8
	36	-	-	1,0

Хранение сухих заквасок при 4-6° в течение 6 мес не выявило изменений в их качественных показателях, за исключением незначительного снижения количества живых клеток. При последующем хранении процент погибших клеток увеличивался и снижалась активность.

Таблица 9. Восстановление сухих мкб

Показатели	Сухие мкб <i>L. acidophilus</i>		
	ЕН ₁	ЕН ₃	317/402
	свертывание молока		
Контроль - заквашенное стерильное молоко	-	-	-
Заквашивание стерильного молока с добавлением в отдельности			
- гидролизованного молока - 5-10 г/л	-	-	-
- дрожжевого автолизата - 2,5 %	-	-	-
- обезжиренное молока (16% сухих веществ)	-	-	-
Заквашивание стерильного молока (16% сухих веществ) с добавлением вместе гидролизованного молока и дрожжевого автолизата	+	+	+

Наилучшие показатели стойкости сухих заквасок были получены при температуре хранения 18° в течение 2-3 лет, а именно замедление вымирания клеток, сохранение качественных показателей без особых изменений.

Восстановление сухих заквасок мкб. Как известно, сухие закваски мкб пригодны для использования от 6 месяцев до 2-3 лет.

Однако добавлением в обезжиренное молоко (при содержании сухих веществ до 16%) дрожжевого автолизата, гидролизованного молока, пепсина удалось восстановить долголетие сухих заквасок с сохранением их производственноценных свойств (табл. 9).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абызова Л.Ф., Полонская М.С., Монович В.В. Докл. ВАСХНИЛ, 2, 20-24, М., 1965.
2. Акопян Л.Г., Чарян Л.М. и др. Патент РФ, N2077214, 1994, 33 шрифтшқір, N 27, 1995.
3. Банникова Л.А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности. Пищевая промышленность, М., 1975.
4. Гриневич А.Г. Основные направления селекции молочнокислых бактерий в молочной промышленности, 13-26, М., 1970.
5. Ерзинкян Л.А. Авт. свид. СССР, N 163573, 1964.
6. Ерзинкян Л.А., Чарян Л.М., Акопян Л.Г. и др. Авт. свид. СССР, N590335, 1978.
7. Ерзинкян Л.А. Биологические особенности некоторых рас молочнокислых бактерий. Изд. АН Арм.ССР, Ереван, 1971.
8. Королева Н.С. Техническая микробиология кисломолочных продуктов. Пищевая промышленность, М., 1966.
9. Лагода И.В., Банникова Л.А. Молочная промышленность, 2, 1970.
10. Лагода И.В., Банникова Л.А. Молочная промышленность, 3, 1973.
11. Скородумова А.М. Практическое руководство по технической микробиологии молока и молочных продуктов. М., Пищепромиздат, 1963.

Поступила 01.X.1999

О ВОЗМОЖНОСТИ ИНФИЦИРОВАНИЯ КЛУБЕНЬКОВЫМИ БАКТЕРИЯМИ ЗЛАКОВЫХ КУЛЬТУР

С.А. АРУТЮНЯН, С.Г. АСЛАНЯН, Н.М. АЛЕКСАНЯН, Т.У. СТЕПАНЯН,
Ф.С. МАТЕВОСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Получены пассированные через пшеницу и овес штаммы клубеньковых бактерий гороха, люцерны и сои, образующие мелкие "клубеньки" на пшенице и своем бобовом растении-хозяине. "Клубеньки" на пшенице проявляют нитрогеназную активность.

Ստացվել են ցորենի և վարսակի բույսերի արմատների միջով բազմակի անգամ անցկացված ոլոռի, առվույտի և տոլայի պալարաբակտերիաների շտամները, որոնք առաջացնում են մանր «պալարիկներ» ցորենի և իրենց տեր քիթեռնածաղկավորներ բույսերի վրա: Ցորենի արմատային «պալարիկները» ցուցաբերում են նիտրոգենազային ակտիվություն:

The strains of peas, alfalfa's and soybean root nodule bacteria over and over again passed through wheat and oat, forming small nodules on wheat and it's bean host-plant. The "nodules" on wheat show nitrogenase activity.

Клубеньковые бактерии - бобовые растения - злаковые

Создание азотфиксирующего симбиоза между *Rhizobium* и злаковыми культурами могло бы быть полезным не только с точки зрения азотного питания, но и полной экологической безопасности биологического азота.

В литературе имеются данные об азотфиксирующем симбиозе между эндифитами и небобовыми растениями [2, 6, 7, 9, 14]. Кроме того, выявлено образование клубеньков на небобовых, тропических растениях *Тrema aspera* и *Parasponia* под влиянием клубеньковых бактерий группы гороха, донника, фасоли и сои [3-5, 8, 10-12].

Цель настоящего исследования - изучить возможность симбиотических взаимоотношений между пассированными через злаки штаммами *Rhizobium* и растением пшеницы.

Материал и методика. Для исследований использовали штаммы клубеньковых бактерий видов *Rh. leguminosarum*, *Bradyrhizobium japonicum* коллекции ИНМИА, из которых были получены пассированные через пшеницу штаммы: *Rh. leguminosarum* П-3, П-5, П-6, П-8 (третьего, пятого, шестого и восьмого пассажей), а также *B. japonicum* 0-1, п-1, п-4 (пассированные через овес и пшеницу).

Растения-хозяева: пшеница яровая, сорт "Шираки", озимая, сорт "Армянка 60", горох. Вирусентность и активность пассированных штаммов определяли в микровегетационных опытах на стерильном песке (объем сосудов 200 мл) с безазотистой питательной средой Енсена [13]. Для выявления инфекционных нитей в корневых волосках брали пробы корней растений через 3-4, 10 и 20 суток после инокуляции. Корни фиксировали 96% этанолом и окрашивали 1%-ным раствором кристаллического фиолетового. Затем корни пшеницы помещали на предметное стекло в каплю воды, накрывали покровным стеклом и просматривали под световым микроскопом при увеличении 250-500 х.

Нитрогеназную активность определяли ацетиленовым методом [1].

Выделение культур из клубеньков на корнях пшеницы проводили после стерилизации последних сулемой.

Результаты и обсуждение. После инфицирования пшеницы клубеньковыми бактериями из образовавшихся на корнях выростов были выделены чистые культуры этих бактерий. Этими культурами повторно инокулировали пшеницу и получили штаммы 1-8 пассажей, с которыми и проводили дальнейшие исследования.

Через 3-4 суток после инфицирования пшеницы (яровой и озимой) пассированными штаммами обнаружено искривление кончиков корневых волосков и образование в них инфекционных нитей (рис.1). В контрольном варианте и при инокуляции исходными (непассированными) штаммами клубеньковых бактерий корневые волоски не искривлены и в них не выявлены инфекционные нити (рис.2).

Различные пассированные штаммы отличались друг от друга по способности инфицировать корневые волоски пшеницы (табл.1).

Таблица 1. Влияние пассированных штаммов клубеньковых бактерий на пшеницу

Штаммы	Шираки		Армянка-60	
	количество инфицированных корневых волосков, %	азот, мкг/г корней, ч	количество инфицированных корневых волосков, %	азот, мкг/г корней, ч
<i>Rhizobium leguminosarum</i>				
Контроль (без инокуляции)	0	0	0	1,098
шт. исходный, из клубеньков гороха	0	1,1	0	0,94
шт. П-3 из клубеньков пшеницы	12,6	3,91	15,3	2,6
П-5 - "-	19,53	6,15	17,71	3,67
П-6 - "-	19,87	3,36	-	-
П-8 - "-	-	4,66	-	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>				
шт. исходный из клубеньков сои	0	1,46	0	-
О-1 из клубеньков овса	30,97	5,21	11,67	3,82
П-1 из клубеньков пшеницы	-	2,47	-	3,68
П-4 - "-	25,6	4,83	-	-

Примечание: (-) - данные отсутствуют.

Наибольшее количество волосков с инфекционными нитями обнаружено у яровой пшеницы при инокуляции шт. О-1 и п-4 (*B.japonicum*) 30, 97 и 25,6%.

Через 25-30 суток после инокуляции пшеницы пассированными штаммами клубеньковых бактерий на ее корнях образовались мелкие

выросты, узелки диаметром до 1 мм, которые содержали грамотрицательные палочковидные бактериальные клетки (рис.3). При этом следует отметить, что образование выростов на корнях пшеницы не всегда стабильно, на одних растениях их больше, на других - меньше. Имеются также различия в размерах и расположении выростов на корнях.



Рис. 1. Образование инфекционных нитей в корневых волосках пшеницы.

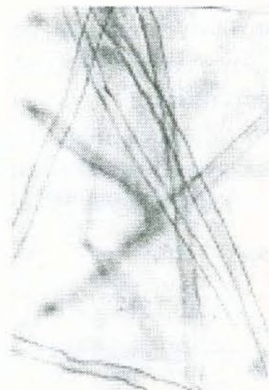


Рис. 2. Корневые волоски пшеницы, контроль.

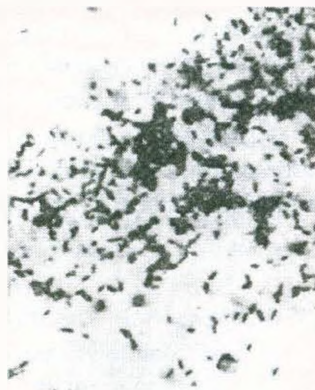


Рис. 3. Отпечаток среза клубенька пшеницы.

Образовавшиеся на пшенице “клубеньки” обладают нитрогеназной активностью в пределах 2,6-1,15 мкг азота/г корней, час.

Наиболее высокая нитрогеназная активность отмечена у шт. п-5 (*Rh. leguminosarum*) на пшенице “Шираки”. На озимой пшенице “Армянка-60” нитрогеназная активность всех пассированных штаммов была почти на одном уровне.

С целью выяснения принадлежности штаммов, выделенных из пшеницы и овса, к роду *Rhizobium* ими инокулировали бобовые растения-хозяева.

Все “пшеничные” штаммы образовали клубеньки на своих бобовых растениях и проявили нитрогеназную активность.

Таблица 2. Влияние “пшеничных” штаммов клубеньковых бактерий на своем растении-хозяине горохе

Штаммы	Среднее количество клубеньков на 1 растении	Азот, мкг/г корней, ч
Контроль (без заражения)	0	0,72
Шт. исходный (<i>Rh. leguminosarum</i>)	13,7	12,96
Шт. П-2 (из клубеньков пшеницы)	11,0	10,52
Шт. П-5 - “ -	11,3	7,42
Шт. П-6 - “ -	17,7	7,24

В табл. 2 приведены данные лишь по гороху. На других бобовых растениях-хозяевах получены сходные результаты.

Было отмечено, что пассированные через пшеницу штаммы *Rh. leguminosarum*, хотя и образовали клубеньки на своем растении - горохе,

но были более мелкими по сравнению с исходным штаммом и обладали несколько меньшим уровнем нитрогеназной активности.

Проведенные исследования позволяют сделать следующие выводы.

Пассированные через злаки штаммы клубеньков бактерий инфицируют корневые волоски и затем образуют мелкие клубенькообразные выросты на корнях пшеницы, проявляющие некоторый уровень нитрогеназной активности, что может предположительно свидетельствовать от элементах симбиотических взаимоотношений между клубеньковыми бактериями и злаковыми растениями.

Штаммы, выделенные из пшеницы, образуют азотфиксирующие клубеньки на своих бобовых растениях-хозяевах, чем подтверждается принадлежность этих штаммов к роду *Rhizobium*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по использованию ацетиленового метода. ВНИИ с-х микробиологии, Л., 1982.
2. Родынюк И.С. Вопросы метаболизма. Новосибирск, Наука, 101, 1984.
3. Симаров Б.В., Тихонович Н.А. Сб: Минеральный и биологический азот в земледелии СССР. Наука, М., 165-175, 1985.
4. Beking J.H. *Plant and Soil*, 75, 3, 309, 1983.
5. Bender G.L., Rolfe B.D., *Plant and Soil*, 38, 2, 135, 1985.
6. Beringer Y.E., Brewin N., Yohnston A.W., Schulman K.W., Hopwood A.D. *Proc. Roy. Soc, London, B.*, 204, 165, 219-233, 1979.
7. Klevenkaya Y.L. *Soil. Biol. and Conserv. Biosphere*. 481, Budapest, 1984.
8. Moffat Anne Simon *Science*, 250, № 4983, 910-912, 1990.
9. Schwinter Q.R. *Amer Y.Bot.*, 70, 7, 1071, 1983.
10. Scott K.F., Rolfe B.G., Shine Y. *DNA*, 2, 2, 141, 1986.
11. Scott K.F. *Nucl. Acids Res*, 14, 7, 2905, 1986.
12. Trinick M.G. *Nature*, 244, 459, 1973.
13. Vincent J.M. A. manual for the Practical study of the root-nodule bacteria. London, Edinburgh, 1970.
14. Wenshengwu Auebao *Acta. microbiol. Sin.*, 23, 4, 347, 1983.

Поступила 10.XII.1999

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА НА СТРУКТУРНУЮ ЛАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ

Г.А. САМВЕЛЯН

Научный центр виноградопородовиноделия, 378312, Армавирская область,
с. Мерцаван

Используя метод триптофановой фосфоресценции, проведены исследования лабильности мембран винных дрожжей. Выявлены критические концентрации этилового спирта, влияющие на структурную лабильность мембран для дрожжей *Saccharomyces vini* раса Агавнатун 123 - 9, *Schizosaccharomyces pombe* раса 554 - 12 и *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1 - 15 об.%. Рекомендуется использование дрожжей *Schiz. pombe* в производстве хереса на стадии брожения.

Օգտագործելով տրիպտոֆանային ֆոսֆորեսցենցիայի մեթոդը, կատարվել են հետազոտություններ շաքարասնկերի բջիջների մեմբրանների անկայունության վերաբերյալ: Բացահայտվել են մեմբրանների կառուցվածքի անկայունության վրա ազդող էթիլ սպիրտի կրիտիկական կոնցենտրացիաները հետևյալ շաքարասնկերի համար - *Saccharomyces vini* Աղավնատուն 123 ռասա - 9, *Schizosaccharomyces pombe* 554 ռասա - 12 և *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* Բյուրական 1 ռասա - 15 ծավ. %: Արդյունքում խորհուրդ է տրվում *Schiz. pombe* շաքարասնկերի օգտագործումը խերեսային գինիների արտադրության մեջ խմորման ստադիայում:

Based on the use of triptophane phosphorescence method the lability of membrane of some industrial strains of wine yeasts has been studied. The critical value of ethanol on the membrane structural lability varies in different strains tested: *Saccharomyces vini*, strain Aghavnatun 123 - 9, *Schizosaccharomyces pombe* - 12 and *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* strain Byurakan - 15 vol. per cent. The application of *Schiz. pombe* during the fermentation process in production of shern wines is recommended.

Винные дрожжи - мембраны - этиловый спирт - виноделие

Структурное состояние биологических мембран в достаточной мере характеризует функциональную активность дрожжевых микроорганизмов. Этиловый спирт в зависимости от концентрации в среде способен тормозить рост многих микроорганизмов в культуре и влиять на структурную лабильность мембранных клеток. Однако критическая концентрация спирта, ингибирующая скорость размножения клеток и влияющая на структурную реорганизацию мембран, для разных видов микроорганизмов различна. Для установления структурных перестроек мембран и изменения подвижности мембранных белков эффективным методом является триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре (ТФКТ) [5]. Этот метод основан на измерении спектральных и кинетических параметров фосфоресценции макромолекул белков триптофанилов и позволяет изучать состояние мембраны непосредственно в клетке без предварительного выделения.

По данным литературы [7], критическая концентрация этилового спирта 8% вызывает структурную перестройку клеточных мембран винных дрожжей (здесь и далее об.%). Практическое значение этого эффекта заключается в том, что по достижении в брозящем сусле концентрации

этилового спирта 8%, необходимо отделение дрожжей от виноматериала для получения биологически стабильных столовых вин, поскольку этим предотвращается выход аминокислот из автолизированных клеток в среду.

Нами ставилась цель выявить различия в структурной лабильности биологических мембран дрожжей - шизосахаромикетов в отношении к разным концентрациям этилового спирта, образующегося при брожении виноградно-ного сусла в концентрации 3-20%.

Материал и методика. Материалом для исследований служили чистые культуры дрожжей рода *Sacch. vini* раса Агавнатун 123, *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан-1 и *Schiz. pombe* раса 554, взятые из музея отдела микробиологии ВНИИВ и ПИ "Магарач".

Для регистрации структурного состояния мембран дрожжевых клеток использовали метод ТФКТ [3, 9]. Исследования проводили на установке, созданной в Институте фотобиологии АН Республики Беларусь [4, 6].

Измерения дыхательной активности дрожжевых клеток регистрировали полярографическим методом с помощью полярографа *Radecis* ОН 101/1 [8]. Об изменении проницаемости клеточных мембран судили по выходу свободных нуклеотидов в инкубационную среду [10]. В качестве инкубационной среды использовали среду Ридер и виноградное сусло [2].

Результаты и обсуждение. Результаты наших опытов показали, что этиловый спирт в критической концентрации 9,0% для *Sacch. vini*, раса Агавнатун - 123, 12% - *Schiz. pombe* раса 554 и выше 15% - для хересной культуры *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан-1 приводит к изменениям критических параметров ТФКТ - увеличению τ_m , τ_0 и $\bar{\tau}$ (рис. 1, 2, 3).

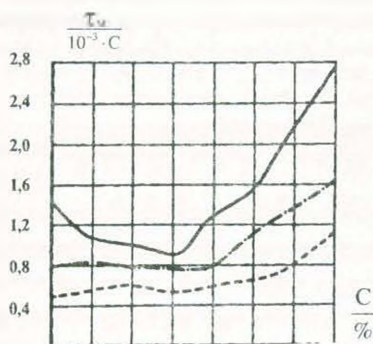


Рис. 1. Влияние концентрации этилового спирта на время жизни медленнозатухающей компоненты ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 --- *Schiz. pombe* раса 554
 - · - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

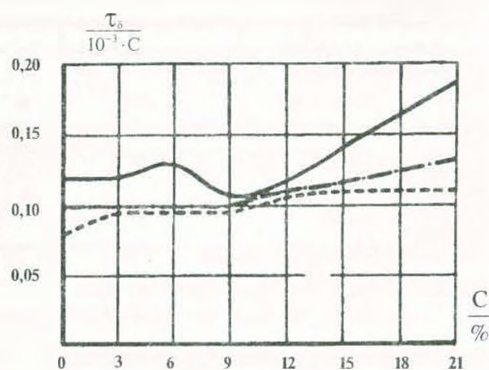


Рис. 2. Влияние концентрации этилового спирта на время жизни быстро затухающей компоненты ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 --- *Schiz. pombe* раса 554
 - · - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

Зарегистрированные изменения кинетических параметров ТФКТ свидетельствуют о том, что этиловый спирт способен инициировать структурную перестройку мембран дрожжевых клеток, затрагивает их белковую компоненту, сопряженную с изменением уровня равновесной внутримолекулярной динамики структуры мембранных белков.

Наиболее выраженная структурная реорганизация мембран дрожжевых клеток наблюдается у культуры *Sacch. vini*, менее у *Schiz. pombe*.

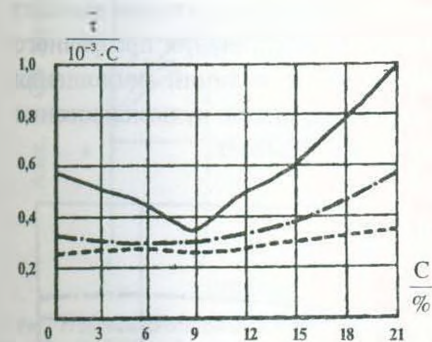


Рис. 3. Влияние концентрации этилового спирта на среднее время жизни ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 *Schiz. pombe* раса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

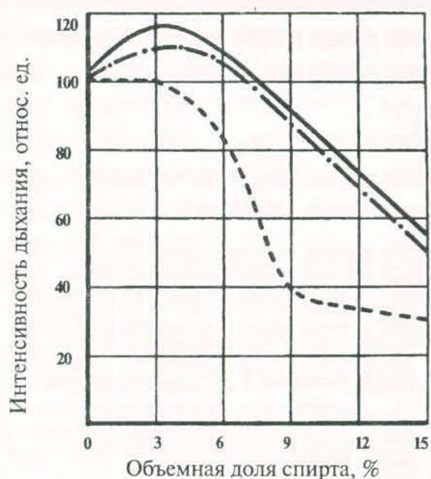


Рис. 4. Влияние концентрации этилового спирта на интенсивность дыхания дрожжей

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 *Schiz. pombe* раса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

Совершенно не чувствительна к этиловому спирту в интервале концентраций 3-15% культура *Sacch. oviformis* Бюракан-1.

Полученные данные показывают, что испытанные нами культуры дрожжевых микроорганизмов различны по структурному состоянию мембран и их химическому составу.

Измерения дыхательной активности клеток различных культур дрожжей показали, что снижение этих показателей происходит при различных концентрациях этилового спирта в среде (рис. 4).

Заметное снижение дыхательной активности клеток дрожжей *Sacch. vini* происходит при концентрации этилового спирта 6-9%, что подтверждается литературными данными [1].

Довольно толерантным к этиловому спирту по дыхательной активности являются клетки дрожжей *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* и *Schiz. pombe*, снижение дыхательной активности у которых наступает при концентрациях спирта в среде свыше 15%.

Немаловажной функцией активности дрожжевых клеток является трансмембранная проницаемость для внутриклеточных свободных нуклеотидов, не исключен также при этом выход из клеток и других соединений, в том числе азотистых.

На рис. 5 и 6 приведены кривые поглощения дрожжевых суспензий при $\lambda = 260$ нм, инкубированных в среде Ридер и в виноградном сусле.

Выявлено, что трансмембранная проницаемость клеток дрожжей сахаромисетов расы Агавнатун-123 и Бюракан-1 в процессе культивирования в среде Ридер и виноградном сусле возрастает, при этом проницаемость мембран клеток Бюракан-1 (хересные дрожжи) сравнительно выше, чем у расы Агавнатун-123. Следует также отметить, что при культивировании дрожжей вила *Sacch. vini* в среде Ридер наблюдалась отчетливая S-образность

кривой зависимости выхода из клеток свободных нуклеотидов. Мембранная проницаемость клеток *Schiz. pombe* в процессе культивирования различна: в среде Ридер кривая зависимости выхода свободных нуклеотидов выходит на константу, а в виноградном сусле величины поглощения прозрачного супернатанта дрожжей шизосахаромицетов выше величин поглощения сахаромицетов. Примечательно, что в конце процесса культивирования мембранная проницаемость клеток *Schiz. pombe* убывает.

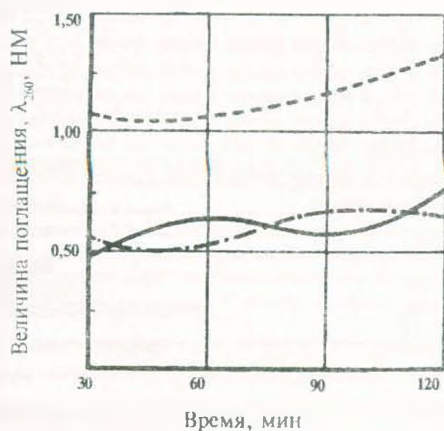


Рис. 5. Изменение величины поглощения дрожжевых суспензий, инкубированных в среде Ридер

— *Sacch. vini* паса Аравнатун 123
 — *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

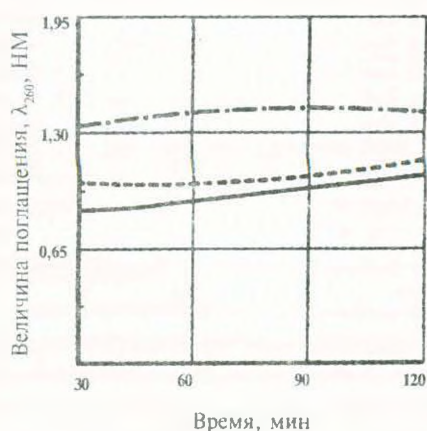


Рис. 6. Изменение величины поглощения дрожжевых суспензий, инкубированных в виноградном сусле

— *Sacch. vini* паса Аравнатун 123
 — *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

Учитывая, что в процессах брожения виноградного сусла и дальнейшего хересования виноматериала важное значение имеют азотистые вещества, нами определялось содержание общего азота и азота белка в сухом веществе дрожжей в зависимости от фазы роста. По результатам анализов, наибольшим содержанием общего азота в клетках отличаются дрожжи - шизосахаромицеты, к тому же их содержание в клетках в процессе роста культуры увеличивается, в конечном итоге приближаясь к постоянной величине (рис. 7).

Накопление азота в клетках хересных дрожжей протекает аналогично накоплению в клетках дрожжей шизосахаромицетов, хотя его содержание в хересных дрожжах на всех стадиях роста несколько ниже, чем в дрожжах шизосахаромицетах. Дрожжи вида *Sacch. vini* отличались более высоким содержанием общего азота в начальной фазе роста. В процессе роста количество азота в клетках несколько увеличивалось, но в ходе всего опыта было сравнительно ниже, чем в клетках хересных дрожжей и дрожжей шизосахаромицетов.

Сравнительно высоким содержанием белкового азота в начальной фазе роста и сравнительно низким в конечной фазе отличаются клетки хересных дрожжей (рис. 8). Наибольший прирост белкового азота в клетках и максимальное его количество в конечной фазе роста наблюдалось в дрожжах-шизосахаромицетах.

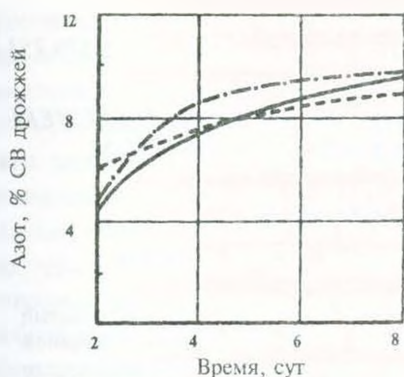


Рис. 7. Динамика содержания общего азота в сухом веществе (%) дрожжей в процессе роста культур
 — *Sacch. vini* паса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

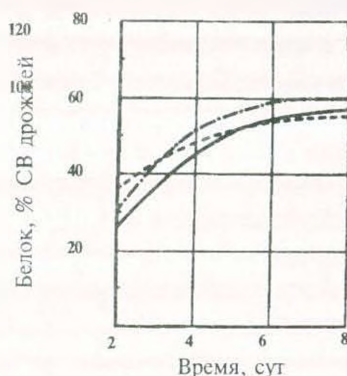


Рис. 8. Динамика содержания белка в сухом веществе (%) дрожжей в процессе роста культур
 — *Sacch. vini* паса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что структурная перестройка мембран, затрагивающая белковую компоненту, осуществляется этиловым спиртом, образующимся в результате сбраживания сахаров виноградного суслу. Наиболее влиятельная концентрация этилового спирта находится в разных интервалах для различных видов дрожжевых микроорганизмов.

Установлены критические концентрации этилового спирта для дрожжей *Sacch. vini* (Агавнатун-123) - 9.0%, *Schiz. pombe* (паса 554) - 12% и более 15% для *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* (Бюракан 1).

Можно считать целесообразным использование дрожжей - *Shiz. pombe* в хересном производстве на стадии брожения виноградного суслу без риска получения недобродов и для обогащения виноматериалов веществами азотистой природы, необходимых для интенсификации процессов хересования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажаев З.Ю. Автореф. канд. дисс., 26с., Ялта, 1988.
2. Бурьян Н.И., Тюрина Л.В. Микобиология виноделия, Пищевая промышленность, 271с., М., 1979.
3. Ермолаев Ю.С. Автореф. канд. дисс., 20с., Минск, 1985.
4. Ермолаев В.М., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б. Безизлучательный перенос энергии электронного возбуждения, Наука, 311с., Л., 1977.
5. Мажуль В.М., Ермолаев Ю.С., Конев С.В. Журн. прикл. спектроскопии, 32, 5, 903-907, М., 1980.
6. Мажуль В.М., Конев С.В., Ермолаев Ю.С. и др. Автоматизация цитологических исследований, 88-93, Киев, 1985.
7. Разуваев В.С., Бурьян Н.И., Саркисян А.С., Бажаев З.Ю. В сб. научн. тр. Научные основы переработки винограда. ВНИИ ВиПП "Магарач", 28, Ялта, 1987.
8. Шюльц К.Ф., Островский Д.Н. Методы современной биологии, Наука, 52-58, М., 1975.
9. Horie T., Vanderkooi J.M. Biochim. Biophys. Acta., 670, 2, 294-297, 1981.
10. Strombini G.B. Biophys. J., 43, 1, 127-130, 1983.

Поступила 19.XII.2000

ПОЛНАЯ СУПРЕССИЯ ПРОЯВЛЕНИЯ *lon* МУТАЦИЙ *ESCHERICHIA COLI K-12* ХРОМОСОМНЫМ ФРАГМЕНТОМ

Г.Г. ОГАНЕСЯН, С.С. ОГАНЕСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 375810, г. Абовян

У *lon* мутанта *Escherichia coli K-12 CA154 HfrH* был отобран *Lon*⁺ неслизистый ревертант *NM144*, обладающий устойчивостью к УФ облучению. Причиной возникновения *Lon*⁺ фенотипа является образование автономно реплицирующего фрагмента хромосомы *pHS44*, который содержит по крайней мере *his-tyrA* область хромосомы *E.coli*. Обратная интеграция *pHS44* в хромосому приводит к восстановлению мутантного *Lon* фенотипа. По данным конъюгационных экспериментов, интеграция *pHS44* происходит на свой прежний участок хромосомы. Один или несколько молчащих на хромосоме генов, переходя в автономное состояние, активизируются и супрессируют все проявления *lon* мутации, по-видимому, путем синтеза альтернативной *Lon* протеазы (*Alp*).

Escherichia coli K-12 CA154 HfrH lon մուտանտից անջատվել է *Lon*⁺ ոչ լորձավոր *NM144* ռեվերտանտը, որը կայուն է ՈւՎ-ճառագայթման նկատմամբ: *Lon*⁺ ֆենոտիպի առաջացման պատճառը հանդիսանում է *pHS44* քրոմոսոմից անջատ ինքնուրույն ռեպլիկացվող մասնիկի ձևավորումը, որը ներառում է *E. coli*-ի քրոմոսոմի առնվազն *his-tyrA* մասը: *pHS44*-ի հետադարձ ինտեգրացիան քրոմոսոմի մեջ բերում է մուտանտային *Lon* ֆենոտիպի վերականգնմանը: Կոնյուգացիոն փորձերի համաձայն *pHS44*-ի ինտեգրացիան կատարվում է քրոմոսոմի իր նախկին տեղում: Քրոմոսոմի վրա մեկ կամ մի քանի լռող գեներ անցնելով *pHS44*-ի վրա ակտիվանում և սուպրեսիայի են ենթարկում *lon* մուտացիայի բոլոր դրսևորումները, հավանաբար, ալտերնատիվ *Lon* պրոտեազի (*Alp*) սինթեզման ճանապարհով:

From *lon* mutant of *Escherichia coli K-12 CA154 HfrH* a *Lon*⁺ nonmucoide revertant resistant to UV radiation has been selected. The cause of *Lon*⁺ phenotype appearance is a autonomously replicating chromosomal fragment, designated as *pHS44*, which includes at least the *his-tyrA* region of *E. coli* chromosome. Reintegration of *pHS44* into the chromosome brings to recovery of mutant *Lon* phenotype. According to conjugation experiments data the integration of *pHS44* takes place on its own region in chromosome. One or more silent chromosome genes duration transference on autonom conditions are activated and suppress all *lon* mutations, probably by synthesizing of an alternative *Lon* protease (*Alp*).

Lon мутация - супрессия - АТФ-зависимые протеазы - УФ-чувствительность - биосинтез капсулы

Lon ген *Escherichia coli K-12*, детерминирующий биосинтез АТФ-зависимой протеазы, играет ключевую роль в регуляции биосинтеза капсулярных полисахаридов (КП), клеточного деления, наследования плазмид, лизогенизации умеренными бактериофагами и деградации дефектных белков [3-9]. *Lon* мутанты отличаются высокой чувствительностью к УФ лучам, нитрофурантоину (НФ), метил-метансульфонату и другим ингибиторам биосинтеза ДНК, после действия которых клеточное деление необратимо ингибируется и образуются филаменты, которые впоследствии лизируют [3-12]. В разное время были получены внегенные супрессорные мутации *non*, *rsc* и *cps*, подавляющие слизистый фенотип [9, 14], и *suf*, *sfiA*, *sulA*, *sulB*, подавляющие УФ-чувствительный

фенотип [5, 8, 12], но супрессоры, угнетающие одновременно все проявления *lon* мутаций, не были обнаружены. Недавно было показано существование слабой АТФ-зависимой протеазной активности у *lon* нуль мутанта, названной Alp (alternative Lon protease). Увеличение дозы *alp* гена методом клонирования в многокопийную плазмиду приводило к подавлению слизистого и MMS-чувствительного фенотипов *lon* мутантов. Однако клонированный ген непосредственно не отвечал за биосинтез Alp-протеазы, а оказался позитивным регулятором *slpA* гена, который в свою очередь служил негативным регулятором *ssrA* гена, кодирующего биосинтез небольшой стабильной 10Sa РНК, частично находящейся внутри генома криптического Р4 подобного профага CP4-57. При инактивации или утрате *ssrA* гена после индукции и элиминации профага появлялась слабая Alp-активность. Но только при наличии в клетке канамицинустойчивой плазмиды, роль которой не совсем понятна, активность Alp проявлялась полностью [11, 15, 16]. Сам ген, детерминирующий биосинтез Alp-протеазы, не удалось идентифицировать.

В нашей работе приводятся данные по обнаружению и изучению крупного фрагмента хромосомы *E. coli*, способного супрессировать все проявления *lon* мутаций.

Материал и методика. Использованы бактериальные штаммы *E. coli* K-12: J62 F pro trp his str-r, X'121 F pyrD trp his tyrA str-r, CA154 HfrH lacZ thi (из лабораторной коллекции), MUC154-2 *lon* дериват штамма CA154 и NM144 неслизистый, УФ-резистентный мутант штамма MUC154-2 (получены Оганесяном Г.Г.), AB2463 F thr leu proA his argG recA str-r.

Питательные среды: полноценный бульон NB (Serva), триптоз-агар (Ferak), минимальная среда M9 (2), среда Эндо (Serva), фосфатный буфер pH 6,8.

Реактивы: стрептомицин-сульфат (РФ), нитрофурантоин (Calbiochem), акридиновый оранжевый и агароза (Serva).

УФ облучение культур проводили под спаренными лампами БУВ-15 на расстоянии 50 см, при постоянном перемешивании в условиях, исключающих фотореактивацию. Бактериальную культуру, находящуюся в экспоненциальной фазе роста, осаждали при 3000 об/мин, ресуспендировали в фосфатном буфере, по 2 мл заливали в чашки Петри диаметром 50 мм и облучали при постоянном перемешивании, затем из серийных разведений высевали на триптоз-агар.

Чувствительность культур к нитрофурантоину (НФ) проверяли спот-тестом с помощью игольчатых репликаторов на агаризованных средах.

Конъюгационные скрещивания производили по известным методикам [2]. Прерывание конъюгативных пар производили на встряхивателе 326m (Польша) в течение 40 сек.

Исцеление бактерий от плазмид производили акридиновым оранжевым по общепринятой методике [2]. Плазмидную ДНК определяли по известному методу [1]. Эти эксперименты проводились в Институте им. Пастера в Париже.

Результаты и обсуждение. Была изучена чувствительность к УФ облучению и действию НФ родительских штаммов CA154, MUC154-2 и неслизистого мутанта NM144 (табл. 1).

Как видно из табл. 1, по устойчивости к УФ лучам NM144 резко превосходит родительский штамм MUC154-2, однако, примерно в два раза уступает дикому штамму CA154. Повышение устойчивости к лучам УФ и НФ у неслизистого мутанта могло быть следствием внутригенной или внегенной супрессорной мутации. Для определения места супрессорной мутации был проведен генетический анализ.

Таблица 1. Чувствительность мутанта *NM144* и родительских *lon⁺* и *lon* штаммов к УФ и НФ

Штамм	Выживаемость штаммов, %, после УФ облучения, сек.				Чувствительность к НФ (2мкг/мл)
	5	10	20	30	
CA154 <i>lon⁺</i>	66	35	10	18	-
MUC154-2 <i>lon</i>	3,4	0,48	0,031	0,0035	+
NM144	36	19	2,6	0,47	-

NM144 мутант методом общей конъюгации был скрещен с реципиентным *F* штаммом *J62*. У отобранных *Pro⁺*, *His⁺* и *His⁺Pro⁺* рекомбинантов определяли долю слизистых рекомбинантов (табл. 2).

Таблица 2. Частота выхода слизистых рекомбинантов при конъюгационном скрещивании *HfrH* мутанта *NM144* и его родительских штаммов с *F J62* штаммом

Донорский штамм	Доля слизистых рекомбинантов (%) среди		
	<i>Pro⁺</i>	<i>His⁺</i>	<i>Pro⁺His⁺</i>
NM144	48	2	12
MUC154-2	54	30	32
CA154	0	0	0

Как видно из табл. 2, среди эксконъюгантов очень высокий процент составляют слизистые рекомбинанты. Их доля особенно высока, около 48%, среди *Pro⁺* эксконъюгантов. За редким исключением, слизистые рекомбинанты оказались чувствительными, а неслизистые - устойчивыми к действию НФ.

Расщепление потомства на слизистых и неслизистых свидетельствует о сохранении исходной *lon* мутации и наличии в штамме *NM144* внегенной супрессорной мутации, способной полностью подавлять ее экспрессию. Судя по резкому снижению доли слизистых колоний среди *His⁺Pro⁺* рекомбинантов, этот супрессор тесно сцеплен с *his* локусом.

При конъюгационном скрещивании *Hfr* штаммов, как правило, выход рекомбинантов по проксимальным к *F* фактору маркерам намного выше по сравнению с дистальными. Но вопреки ожиданиям, рекомбинантов по *His* маркеру, находящемуся на 45 мин генетической карты, получалось значительно больше, чем по более ранним *Pro* и *Trp* маркерам, локализующимся соответственно на 5 и 28 мин.

Для выяснения механизма этого явления было решено провести конъюгационные скрещивания с прерываниями и проследить порядок и время передачи каждого маркера. В качестве контроля был использован исходный штамм *CA154*. Прерывания конъюгации производили с интервалом в 10 мин. Данные выхода рекомбинантов в процессе конъюгации приведены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, штамм *CA154* передает свои маркеры *F* штамму с частотами и очередностью *HfrH* штамма, а у *NM144* они сильно

нарушены. Так, выход Pro^+ рекомбинантов у *CA154* намного выше, чем у *NM144*, в то же время как по выходу His^+ рекомбинантов *NM144* превосходит родительский штамм более чем в 100 раз.

Таблица 3. Количество рекомбинантов, полученных при скрещивании донорских штаммов *NM144* и *CA154* с реципиентным штаммом *F J62* методом прерванной конъюгации

Донор	Время, мин	Селективный маркер					
		Pro^+		Tgr^+		His^+	
		всего	слизист.	всего	слизист.	всего	слизист.
NM144	10	1	0	0	0	0	0
	20	3	1	0	0	0	0
	30	4	2	0	0	3	0
	40	4	2	1	0	27	0
	50	6	3	2	0	568	22
	60	44	21	18	0	926	37
	70	42	24	222	2	1288	53
CA154	10	31	0	0	0	0	0
	20	133	0	0	0	0	0
	30	380	0	2	0	0	0
	40	520	0	10	0	0	0
	50	650	0	274	0	4	0
	60	634	0	235	0	9	0
	70	-	-	-	-	26	0

Чтобы исключить штаммоспецифичность, *NM144* был скрещен с реципиентным штаммом *F X'121* (табл. 4).

Таблица 4. Выход рекомбинантов при скрещивании *NM144* с *X'121* методом прерванной конъюгации

Время, мин	Селективный маркер				
	Pyr^+	Tgr^+	His^+	Tyr^+	His^+Tyr^+
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0
30	1	0	3	4	2
40	2	1	58	40	22
50	5	4	318	365	236
60	3	58	460	480	285
70	6	326	486	520	532
80	18	284	608	636	628

Исследования показали, что градиент переноса маркеров, свойственный *HfrH* штаммам при скрещивании с *F- X'121* реципиентным штаммом, тоже нарушен. Сначала передается His^+ маркер, затем TyrA^+ , потом Tgr^+ (табл. 4). При этом частота передачи PyrD^+ маркера, несмотря на близкое расстояние на хромосоме, всего 6 мин, в 20-40 раз меньше, чем у Tgr^+ маркера. Обнаруженные нарушения градиента переноса маркеров могли быть следствием возникновения самостоятельного репликона, который наподобие плазмид может мобилизоваться и передаваться в реципиентную клетку раньше основной хромосомы.

Образование самостоятельно реплицирующегося фрагмента хромосомы длиной примерно 40% интактной хромосомы с охватом генов от *trp* до *tyrA* произошло, по-видимому, путем выщепления из хромосомы очень крупной F'-эписомы. Если учесть, что *NM144* является лизогенным по фагу λ , а *X'121* нет, то из данных табл. 4 можно заметить отсутствие зиготной индукции, доказывающей, что *his*, *tyrA* и *trp* маркеры передаются реципиентной клетке раньше, чем профаг λ .

Для установления наличия плазмиды была проведена обработка бульонной культуры штамма *NM144* акридиновым оранжевым в ожидании высокого выхода слизистых ревертантов. Однако многократное повторение опытов с различными концентрациями акридинового оранжевого не дали положительных результатов. При посевах бульонных культур *NM144* на среде Эндо удалось обнаружить единичные мукоидные колонии. Изолированные мукоидные ревертанты не нуждались в дополнительных факторах роста и хорошо росли на минимальной среде с тиаминном. При конъюгационных скрещиваниях было обнаружено, что у мукоидных ревертантов восстановлены градиент передачи генетических маркеров и зиготная индукция профага λ свойственных *HfrH λ ⁺* штаммам.

Для удостоверения в отсутствии плазмид были поставлены также опыты по пульс - электрофорезу очищенных лизатов штамма *NM144*, показавшие, что мелкие и очень крупные до 350 Mg плазмиды в нем отсутствуют.

Обнаруженные нарушения градиента переноса генов и высокая частота выхода *His⁺*, *TyrA⁺* и *Trp⁺* эксконъюгантов в большей степени можно объяснить образованием меродиплоидов, чем рекомбинантов. Для проверки этого предположения конъюгационные скрещивания были повторены с *recA* реципиентным штаммом, у которого крайне низка вероятность рекомбинаций (табл. 5.).

Таблица 5. Выход прототрофных эксконъюгантов при скрещивании донорного штамма *NM144* с F реципиентом *AB2463 recA*

Время прерыва- ния конъюгации	Выход прототрофов по селективным маркерам			
	T ⁺ L ⁺	ProA ⁺	His ⁺	ArgG ⁺
10	0	0	0	0
20	0	0	12	0
30	0	0	19	0
40	0	0	63	0
50	1	0	232	0
60	0	0	346	0
70	0	1	758	1
80	1	2	836	0

Данные табл. 5 подтверждают, что несмотря на отсутствие рекомбинаций, выход *His⁺* эксконъюгантов опять чрезмерно высок, а по остальным маркерам рекомбинанты вовсе отсутствуют. Единичные прототрофы, обнаруженные по этим маркерам, скорее всего являются ревертантами, а не рекомбинантами. Эти результаты свидетельствуют о том, что высокий выход эксконъюгантов по дистальным маркерам действительно связан с

переносом в реципиентную клетку. самостоятельно реплицирующегося фрагмента хромосомы и образованием мерозигот.

Полученные мерозиготы не приобретают чувствительности к мужским фагам MS2 и fd103 и при использовании в качестве доноров в конъюгационных опытах не передают приобретенные генетические маркеры реципиентным штаммам.

Мы предполагаем, что *NM144* мутант возник в результате выщепления очень крупной *F'*-эписомы, превосходящей по размеру оставшуюся часть хромосомы. Оставшийся сегмент хромосомы, названный нами *pHS44*, содержит *trp*, *his*, *tyrA* гены и охватывает участок хромосомы по крайней мере от 28-й до 59-й мин временной карты *E. coli*. *pHS44* замыкается в кольцо и реплицируется, по-видимому, от *oriJ* (30,5 мин). Невзирая на отсутствие полового фактора, из-за своего сравнительно малого размера *pHS44* мобилизуется и передается в реципиентную клетку раньше *F'*-эписомы. Согласно конъюгационным данным, порядок передачи маркеров таков: *oriJ-his-tyrA-trp*. Расстоянием около 25 мин между *oriJ* и *his* можно объяснить появление первых His⁺ эксконъюгантов через 30 мин после начала скрещивания.

Согласно приведенным данным, супрессор *lon* мутаций локализован на *pHS44*. Так как он восстанавливает весь Lon⁺ фенотип, то мы предполагаем, что он представляет собой АТФ-зависимую протеазу со специфичностью Lon-протеазы. Возможно, она идентична с найденной ранее Alp-протеазой [11, 15, 16]. Интересно, что для проявления и Alp-активности, и нашего супрессора необходим акт выщепления хромосомного сегмента в области *tyrA* гена. Однако, в отличие от искусственно созданного путем многоступенчатых манипуляций штамма, обладающего Alp-активностью, наш мутант *NM144* был получен в естественных условиях и обладал высокой супрессорной активностью. Возможно, при выщеплении *F'*-эписомы одним концом задевает *ssrA* ген и тем самым индуцирует Alp-активность. Ранее было обнаружено, что штаммы, содержащие инсерции типа *ssrA::cat* на полноценном агаре образуют мелкие колонии [13]. Штамм *NM144* на полноценной питательной среде тоже образовывал мелкие колонии, что подтверждает предположение о повреждении *ssrA* при образовании *pHS44*. Для полного проявления *alp* гена в нашем случае нет необходимости в присутствии *Tn903* канамицин резистентного элемента. По-видимому, само нахождение гена, кодирующего Alp-активность на *pHS44*, достаточно для обеспечения его полного проявления.

О появлении Alp-протеазной активности свидетельствует также более высокая чувствительность *NM144* к аналогам аминокислот D,L-норвалину и канаванину по сравнению с родительским *lon* штаммом *Muc154-2*. Это, очевидно, связано с более быстрой деградацией аналогсодержащих белков в Alp⁺ штамме. Подобную разницу в скорости деградации аналогсодержащих белков у *lon*⁺ и *lon* штаммов было показано также другими авторами [10].

Супрессия проявления *lon* мутаций детерминирования *pHS44* не является специфичным. Способность подавлять проявление любых *lon*

мутаций еще раз подтверждает наш вывод о том, что *pHS44* кодирует биосинтез новой Lon-протеазной активности. Иначе трудно представить, каким образом могут такие независимые процессы, как биосинтез ПС и нарушенное клеточное деление, восстанавливаться одновременно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Маниатис Т., Фрич Э., Самбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М., Мир, 1984.
2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., Мир, 1976.
3. Оганесян Г. Г. Биолог. журн. Армении, 48, 2, 55-58, 1995.
4. Berg P. E., Gayda R., Avni H., Zehnbauser B., Markovitz. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1, 697-701, 1976.
5. Gayda R., Jamamoto L. T., Markovitz A. J. Bacteriol. 127, 3, 1208-1216, 1976.
6. Gayda R. C., Markovitz A. J. Bacteriol. 136, 1, 369-380, 1978.
7. Gayda R. C., Avni H., Berg P. E., Markovitz A. Molec. Gen. Genet., 175, 325-332, 1979.
8. George J., Castellazzi M., Buttin G. Mol. Gen. Genet., 127, 3, 1208-1216, 1976.
9. Gottesman S., Trisler P., Torres-Cabassa A. Mol. Gen. Genet., 140, 4, 309-332, 1975.
10. Gottesman S., Zipser D. J. Bacteriol., 133, 2, 844-851, 1978.
11. Kirby J. E., Trempe J. E., Gottesman S. J. Bacteriol., 176, 7, 2068-2081, 1994.
12. Ogannessian H. G., Ogannessian M. G. Genetics, 74, 2, 200, 1973.
13. Oh B.-K., Apirion D. Mol. Gen. Genet., 221, 52-56, 1991.
14. Radke K., Siegel E. C. J. Bacteriol., 106, 2, 432-437, 1971.
15. Trempe J. E., Gottesman S. J. Bacteriol. 171, 5, 3348-3353, 1989.
16. Trempe J. E., Kirby J. E., Gottesman S. J. Bacteriol., 176, 7, 2061-2067, 1994.

Поступила 20.V.1999

ОНКОГЕН V-SRC: ТРАНСКРИПЦИЯ И ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

Н.С. АМБАРЦУМЯН*, Н.Г. НАЛБАНДЯН*, А.Г. ТАТОСЯН**, Ж.И. АКОПЯН*

*Институт молекулярной биологии НАН РА, 375044, Ереван

**Онкологический научный центр АМН РФ, 115478, Москва

В клетках *Escherichia coli*, несущих рекомбинантные плазмиды pPrC11 и psrcC с фрагментами генома вируса саркомы Рауса, наблюдается эффективная транскрипция вирусспецифических последовательностей. Анализ транскриптов выявил несколько классов РНК, один из которых считается со структурой части гена src вируса саркомы Рауса.

Escherichia coli-ի բջիջներում, որոնք կրում են pPrC11 և psrcC պլազմիդները Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի գենոմի ֆրագմենտներով, նկատվում է վիրուսահատկանշական հարդրականությունների արդյունավետ տրանսկրիպցիա: Տրանսկրիպտորենի անալիզը բացահայտեց մի բանի դասի ՌևԹ-ներ, որոնցից մեկը կարողացվում է Ռաուսի սարկոմայի վիրուսի src գենի կառուցվածքային հատվածից:

Effective transcription of virus-specific sequences was shown in *Escherichia coli* cells that carry recombinant plasmids pPrC11 and psrcC with fragments of the Rous sarcoma virus (RSV) genome. Analysis of transcripts revealed several classes of RNA, one of which is probably transcribed from the structural part of the RSV src gene.

*Вирус саркомы Рауса - онкоген src - рекомбинантная плазида -
тирозинспецифическая фосфопроteinкиназа*

В последние годы решение проблемы онкогенеза рассматривается как один из основных вопросов биологии. В настоящее время интенсивные исследования, проведенные в целом ряде лабораторий мира, привели к формированию основной концепции о механизмах неопластической трансформации клеток.

В основу этой концепции легло представление об онкогенах-мутировавших вариантах нормальных генов (протоонкогенов), ответственных за процессы пролиферации и дифференцировки клеток.

Внимание исследователей сосредоточено на решении проблемы выявления функций этих онкобелков в клетке и на том, каким образом функционирование этих белков приводит к необратимым изменениям-раковому перерождению.

В свете вышеизложенного перспективным представляется поиск упрощенных модельных систем для изучения функций различных онкогенов.

В настоящей работе такой модельной системой служили клетки *Escherichia coli*, несущие плазмиды pPrC11 и psrcC [1], полученные ранее в нашей лаборатории.

Геном вируса саркомы Рауса (RSV) состоит из четырех генов: gag, pol, env и src [4]. Трансформирующий потенциал вируса обусловлен экспрессией гена src, кодирующего фосфобелок pp60^{src}. Онкобелок pp60^{src} обладает фосфопроteinкиназной активностью и специфически фосфорилирует тирозин в белках-субстратах [3].

На рис.1 представлена структура плазмид рPrC11 и psrcC, использованных в работе. Плазмида рPrC11 представляет собой рBR322, в которую по участку HindIII встроен фрагмент генома RSV длиной 6 т.н.п. В состав рPrC11 входят интактные гены gag и src, 2 копии LTR, 5' область гена pol и 3'-область гена env. Плазмида psrcC представляет собой субклон рPrC11, содержащий интактный ген src, 3'- область гена env и С-нетранслируемую область RSV.

Материал и методика. В работе использовали штаммы *E.coli* HB101, несущие плазмиды рPrC11 и psrcC (1).

РНК из клеток *E.coli* выделяли с помощью гуанидинизотионата [2], разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, затем переносили на нитроцеллюлозные фильтры и гибридизовали по методу Томас [12]. В отдельных случаях пробу РНК предварительно подвергали обработке РНКазой и ДНКазой I.

[³²P]кДНК RSV синтезировали в реконструированной ревертазной реакции с помощью фермента из вируса миелобластома птиц и статистической затравки ДНК по методу, описанному ранее [11]. В качестве матрицы использовали 70S РНК RSV, синтезированный продукт подвергали щелочному гидролизу и гель-фильтрации на сефадексе G50 "Fine". Удельная активность пробы составляла $(2-4) \times 10^8$ имп/мин на мкг.

Синтез [³²P] ДНК рBR322 проводили по методу ник-трансляции [8].

Удельная активность проб составляла $2 \cdot 10^8$ имп/мин на 1мкг.

Фосфопротеинкиназную активность определяли по методу, подробно описанному ранее [8].

В работе использовали [³²P]дезокситрифосфаты (2000-3000 Ки/ ммоль) фирмы "Amersham", ревертазу, смесь ферментов для ник-трансляции фирмы "Amersham", ДНКазу I фирмы "Worthington" (США).

Результаты и обсуждение. Ранее нами был обнаружен высокий уровень транскрипции вирусспецифических последовательностей в клетках *E.coli*, несущих плазмиду рPrC11 [3]. Высокий уровень гибридизации (60%) меченой пробы с РНК *E.coli*, несущей рPrC11, соответствует процентному содержанию последовательностей RSV, включенных в структуру рPrC11, от общей длины генома вируса. Следовательно, можно предположить, что практически все последовательности RSV, клонированные в рPrC11, эффективно транскрибируются в бактериальных клетках. Этот вывод относится также и к онкогену src, входящему в состав рPrC11.

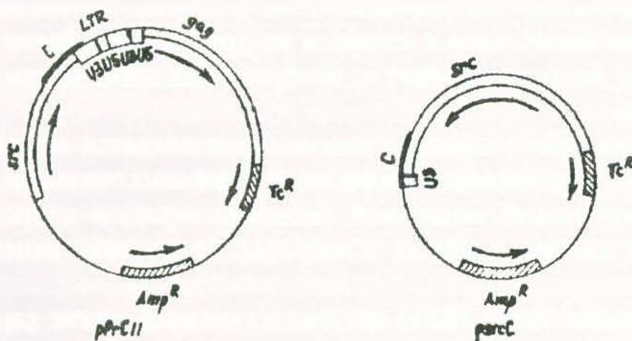


Рис.1. Структура плазмид, несущих фрагменты генома RSV-рPrC11 и psrcC. Стрелками указано направление транскрипции генов, входящих в состав плазмид.

При рассмотрении структуры и направления транскрипции генов, входящих в состав рPrC11 (рис.1), обнаруживается, что синтез РНК гена src в этом клоне маловероятен. Если инициация транскрипции в этой плазмиде происходит с последовательностей LTR RSV, которые имеют

сходство с бактериальными промоторами, то для считывания РНК *src* необходимо сквозное считывание всей плазмиды. Транскрипция гена *src* не может инициироваться также и с последовательностей рВР322, так как ген *Amp^r*, примыкающий к участку *src*, имеет противоположное направление транскрипции (рис.1). Альтернатива заключается в постулировании возможности существования в участке, прилегающем к структурной части гена *src*, последовательностей, способных инициировать считывание РНК в бактериальных клетках. Но тогда в клетках *E.coli* должна транскрибироваться и плазмида *psrcC*, которая содержит ген *src* и межгенное пространство между генами *src* и *env*. Кроме того, участок U3 LTR в этой плазмиде не содержит последовательностей, гомологичных бактериальному промотору и описанных ранее. Для проверки предположения о независимой транскрипции гена *src* RSV в *E.coli* мы провели анализ вирусспецифических РНК, синтезируемых в *E.coli*, несущих плазмиды рPrC11 и *psrcC*.

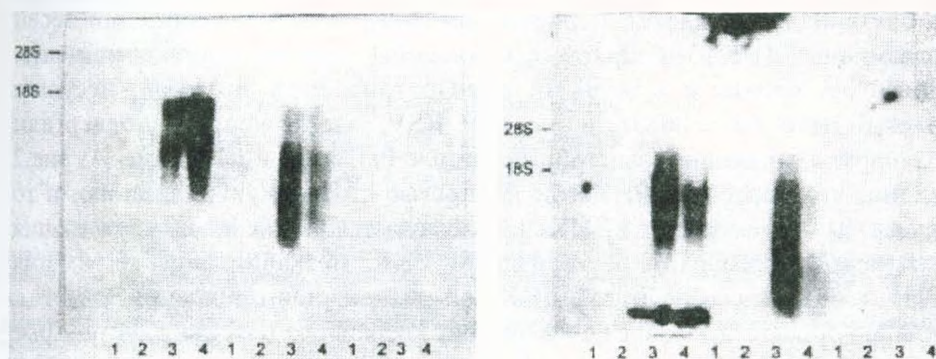


Рис.2. Гибридизация препаратов РНК, выделенных из клеток *E.coli*, несущих рPrC11 и *psrcC*, с [³²P]кДНК RSV (а) и [³²P]кДНК рВР322 (б): 1-красные клетки TWERC, трансформированные RSV; 2-*E.coli* HB101; 3-*E.coli* HB101, несущая *psrcC*; 4-*E.coli* HB101, несущая рPrC11.

На рис.2 представлены данные по блот-гибридизации кДНК RSV с РНК из клеток *E.coli*, несущих плазмиды рPrC11 и *psrcC*. В обоих препаратах выявляются молекулы длиной 2,2 тыс. нуклеотидов (т.н.), которые соответствуют по длине *src*-специфическому транскрипту, синтезируемому в клетках, трансформированных RSV [10]. Обнаружены также и другие классы РНК, гибридирующие с кДНК RSV. В клетках *E.coli*, несущих рPrC11, они имеют размер 4 т.н. и 1,4-1,6 т.н.. В клетках *E.coli*, несущих *psrcC* 3,3 т.н. и 1,4-1,6 т.н. РНК, выделенная из клеток *E.coli* HB101, не гибридуется с кДНК (рис.2а). При использовании этого фильтра в гибридации с [³²P]ДНК рВР322 в бактериях, несущих рPrC11, обнаруживается РНК длиной 1,5 т.н., а в клетках, несущих *psrcC*, обнаруживается более гетерогенная популяция РНК длиной 2,2-1,2 т.н. (рис.2,б).

Таким образом, в клетках, несущих как рPrC11, так и *psrcC*, выявляется гомогенная популяция вирусспецифических РНК длиной 2,2 т.н.; видимо, эта РНК представляет собой независимый транскрипт *src*-области генома RSV.

Гетерогенность популяции РНК, выявляемая при гибридизации препарата бактерий, несущих *psrcC*, с *pBR322* может быть объяснена возможностью непрерывного считывания РНК в направлении *src-Amp^R*, так как терминирующие транскрипцию последовательности LTR RSV в данной плазмиде отсутствуют. Это предположение подтверждается также тем, что гены *src* и *Amp^R* в составе *psrcC* находятся в одинаковой ориентации (рис.1). Природа других RSV- специфических РНК, не совпадающих с известным транскриптом гена *src*, неясна. Вопрос этот требует дополнительного исследования, не исключено, что они являются результатом неспецифической инициации транскрипции или сквозного считывания генов в плазмиде.

Гомогенная РНК, длиной 1,5 т.н., гибридизующаяся с пробой *pBR322*, является продуктом экспрессии плазмидного гена *Amp^R*.

В параллельных экспериментах использованные препараты РНК были проверены на наличие примесей ДНК плазмид, реплицирующихся в бактериальной клетке. Присутствие даже незначительных примесей плазмидных ДНК в препаратах отразилось бы на результатах эксперимента. Поэтому, наряду с обычными препаратами РНК из *E.coli*, несущих плазмиды с последовательностями RSV, электрофорезу подвергали препараты, предварительно обработанные РНКазой и ДНКазой. Из рис.2 видно, что обработка РНКазой полностью снимает гибридизацию, в то время как после обработки ДНКазой наблюдается интенсивная гибридизация полученных препаратов бактериальной РНК. Незначительная деградация РНК в опытах с обработкой ДНКазой объясняется примесями РНКазы, обычно присутствующей в коммерческих препаратах ДНКазы. Контрольные опыты указывают на то, что гибридизация RSV-пробы осуществляется с РНК, экспрессируемой в бактериях, несущих рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты генома RSV.

Таким образом, доказано существование независимого транскрипта гена *src* в бактериальных клетках, несущих плазмиды с фрагментами генома RSV. В связи с этим можно предположить, что в зоне, прилежащей к структурной части гена *src*, могут находиться последовательности, имеющие сходство с известными бактериальными промоторами, которые могут инициировать транскрипцию гена *src*. Анализ первичной структуры участка, примыкающего к гену с 5' -конца, показал, что подобная последовательность локализована в зоне несовершенного прямого повтора *dr2* и отстоит от начала транскрипции гена *src* на 6 нуклеотидов [10]. Сравнение первичной структуры в этой зоне проводилось с промотором бактериальной природы, определенным ранее [9]. Аналогичный участок был выявлен ранее и в LTR провируса RSV (рис.3).

Область *dr2* RSV, в структуре которой найдена гомология с бактериальным промотором, представляет собой несовершенный прямой повтор, локализованный слева и справа от гена *src*, причем в последнем случае эта зона непосредственно прилегает к началу U3-области LTR RSV и продолжается внутрь U3, охватывая инвертированный повтор на конце

вируспецифических последовательностей. Видимо, только незначительная часть синтезированной RSV-специфической РНК транслируется в клетках *E.coli*, приводя к образованию функционально активного белка.

Таким образом, из представленных данных следует, что в клетках *E.coli*, несущих плазмиды rPrC11 и rsrcC, происходит эффективная транскрипция вируспецифических последовательностей. Предполагается, что считывание гена src в бактериальных клетках происходит с потенциального промотора, находящегося в геноме RSV и имеющего сходство с бактериальными промоторами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амбарцумян Н.С., Татосян А.Г., Ениколопов Г.Н. Молекулярная биология. 16, 1183-1187, 1982.
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., Мир, 192-193, 1984.
3. Татосян А.Г., Амбарцумян Н.С., Тополь Л.З., Мазуренко Н.Н. Молекулярная генетика и микробиология. Вирусология, 16, 18-22, 1986.
4. Baltimore D. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 39, 1187-1200, 1975.
5. Collett M.S., Erickson R.L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2021-2025, 1978.
6. Guntaka R.V., Mitsialis S.A. Gene., 4, 113-121, 1980.
7. Merner B., Malamy M., Coffin J. Mol. Cell. Biol., 3, 1746-1758, 1983.
8. Rigby P. W., Dichmann H., Rhodes C., Berg P. J. Molec. Biol., 113, 237-251, 1977.
9. Rosenberg M., Court D. Annu. Rev. Genet., 13, 319-353, 1979.
10. Schwartz D., Tizard R., Gilbert W. Cell., 32, 853-869.
11. Tatosyan A. G., Topol L. Z., Feinstein E. et. al. Neoplasma, 30, 681-690, 1983.
12. Thomas P.S. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201-5205, 1980.

Поступила 01.XII.2000

КОНСТРУИРОВАНИЕ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ *HELIANTHUS TUBEROSUS* L. С БАКТЕРИАЛЬНЫМ ГЕНОМ ЛЕВАЗАЗЫ

А.Н. АРЗУМАНЯН, И.Л. БАЗУКЯН, Ю.Г. ПОПОВ

Ереванский государственный университет,
кафедра микробиологии и физиологии растений, 375049

Сконструирована рекомбинантная плазмида pAPL, несущая леваназный ген *sacC* *Bacillus subtilis*, экспрессия которого контролируется сигналами инициации транскрипции промотора 1' из Т-ДНК *Agrobacterium tumefaciens* и сигналами полиаденилирования polyA g7, функциональными в растительных клетках. Полученная конструкция была использована для трансформации агробактериальных клеток с последующим переносом в топинамбур. Получены устойчивые к канамицину растения топинамбура, что позволяет предположить интеграцию рекомбинантной конструкции, содержащей леваназный ген, с геномом растительной клетки.

Ստացվել է *Bacillus subtilis*-ի *sacC* լանագային գեն կրող ռեկոմբինանտ pAPL պլազմիդ: Գենի էքսպրեսիան վերահսկվում է *Agrobacterium tumefaciens*-ի T-ԴՆԹ-ի 1' պրոմոտորի տրանսկրիպցիայի և polyA g7 պոլիադենիլացման ազդանշանների միջոցով, որոնք գործում են բուսական բջիջներում: Ստացված կոնստրուկցիան օգտագործվել է ագրոբակտերիալ բջիջների տրանսֆորմացիայի համար տոպինամբուրի մեջ նրանց հետագա տեղափոխման նպատակով: Ստացված են տոպինամբուրի կանամիցինակայուն բույսեր, ինչը փոխ է տալիս ենթադրելու լանագային գեն պարունակող ռեկոմբինանտ կոնստրուկցիայի ինտեգրացումը բուսական բջիջների գենոմի հետ:

It was constructed recombinant plasmid pAPL which contained *Bacillus subtilis* levanase gene *sacC* with initiation signals of transcription controlling region of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA 1' promoter and polyadenylation signals polyA g7. Both of them are functional in plant cells. The construction was used for *Agrobacterium* cells transformation following by their transfer into the topinambur. Kanamycin resistant plants were obtained. It permits to suggest integration of recombinant construction containing levanase gene with the plant genome.

Леваназа - рекомбинантная ДНК - трансформация - топинамбур

Развитие методов генной инженерии, осуществляющих клонирование чужеродных генов в растительных клетках, позволяет конструировать растения, обладающие новыми признаками. С доказательством естественной рекомбинации между агробактериальной плазмидной ДНК и хромосомами высших растений стало возможным применение Ti-плазмид *Agrobacterium tumefaciens* в качестве переносчиков (векторов) генов в растительные клетки [4].

В растениях уже показана экспрессия различных бактериальных, животных и неродственных растительных генов [2, 4].

Цель работы - разработка целостной системы экспериментов, позволяющих осуществить клонирование чужеродных генов на примере переноса леваназного гена *sacC* *Bacillus subtilis* в клетки топинамбура. Разработанная система послужит моделью для получения трансгенных растений. Кроме того, перенос в топинамбур леваназного гена, расщепляющего полифруктаны, в том числе инулин, которым богаты клубни топинамбура, позволит подойти к разработке методов воздействия

на углеводный обмен топинамбура.

Материал и методика. Ген леваназы *sac C B.subtilis*, кодирующий внеклеточную β -D-фруктозилтрансферазу [7], был клонирован в экспрессионном векторе pAP2034 [13], представленном лабораторией молекулярной генетики растений Института общей генетики РАН. Источником гена *sac C* служила рекомбинантная плазмида rIPS, сконструированная в НИИ "Биотехнология". Стандартные процедуры клонирования проводили в соответствии с протоколами, описанными в руководстве [3]. Выделение плазмидной ДНК осуществляли методом щелочного лизиса [5]. Трансформацию кальцинированных клеток *E.coli* проводили по методу Мандела и Хига [10]. Полученные компетентные клетки выдерживали при 4° в течение 12-24 ч для повышения эффективности трансформации. Расщепление ДНК рестрикционными эндонуклеазами и лигирование с использованием полинуклеотидлигазы фага T4 осуществляли в универсальных буферах [3] при 37° в течение 2-3 ч (для рестрикции) и при 12° 10-12 ч (для лигирования). Анализ ДНК проводили с помощью электрофореза в агарозном геле (0,7-0,8%), приготовленном на трис-ацетатном буфере при напряженности электрического поля 5 В/см [3]. В качестве маркеров для определения размеров фрагментов использовали ДНК фага λ , расщепленную рестриктазами HindIII и PstI.

Полученную конструкцию с помощью прямых методов трансформации [1], в том числе электропорации, переносили в штамм *A.tumefaciens* C58C1, содержащий плазмиду pGV3850 [14]. Электропорацию проводили в приборе, предоставленном НИИ "Биотехнология", при 4° в объеме 20 мкл и напряженности электрического поля 300 кВ/см $\pm$ 30 В/см с разрядной емкостью 20-70 мкФ. Оптимальной оказалась разрядная емкость 70 мкФ. Агробактериальные трансформанты отбирали на соответствующих селективных средах [1] с антибиотиками.

Гибридизацию ДНК проводили по методу описанному в руководстве [3].

Трансформацию растений осуществляли методом "листовых дисков" [1]. Как каллусы, так и поддерживаемые *in vitro* стерильные интактные растительные линии получали из клубней, побегов, верхушечных почек. Растительный материал тщательно промывали и после соответствующей обработки высевали на базовые питательные среды Мурасиге-Скуга с соответствующими гормонами [12].

Растения выращивали в условиях постоянной освещенности (1000 люкс) при 24-25°, каллусные культуры культивировали в темноте при 26-28°.

Селекция трансгенных растений велась по способности к росту на средах с канамицином (100 мкг/мл), который в норме токсичен для клеток высших растений.

Результаты и обсуждение. В некоторых непатогенных микроорганизмах, в том числе *B.subtilis*, синтезируются 3 типа β -D-фруктофуранозидаз: сахараза (продукт гена *sacA*) [9], левансахаразы (продукт гена *sacB*) [8] и леваназы (продукт гена *sacC*) [7]. Последний является дистальным геном сложного оперона, включающего также гены *levD*, *levE*, *levG*.

Леваназа имеет молекулярный вес 73 кДа, ее синтез индуцируется небольшим количеством фруктозы по сложному, не понятному до конца механизму, включающему фруктозоспецифическую фосфоенолтрансферазную систему. Леваназа гидролизует не только сахарозу и леваны, но и инулин - запасной полисахарид ряда растений, в том числе и топинамбура.

Для экспрессии бактериальных генов в растениях клонирование вышеуказанного гена необходимо было осуществить под контролем промотора эукариотического типа (октопинсинтазного, нопапинсинтазного). Поэтому нами был использован вектор pAP2034 [13]. Он содержит изолированный из Т-ДНК дуальный промоторный фрагмент 1'-2' октопинового типа величиной 479 пар оснований (п.о.). Один из разнонаправленных промоторов этого фрагмента (2') в растительных клетках определяет транскрипцию бактериального гена неомицинфосфотран-

сферазы (NPT II), кодирующего устойчивость к канамицину и используемого благодаря этому в качестве маркера для отбора растительных трансформантов. Сразу же вслед за другим промотором I' находятся уникальные сайты Sal I и Bam HI, по которым и клонировался ген sacC. 3'-Нетранскрибируемая область гена g7 обуславливает полиаденидирование чужеродных последовательностей.

Переклонирование sacC гена из донорной плазмиды rIPS на вектор pAP2034 осуществляли следующим образом. На первом этапе работы предварительно переклонировали в плазмиду pUC7 [11] Pst I-Bam HI фрагмент структурной части sacC гена с последовательностью, содержащей собственный участок связывания рибосом (Шайн-Дальгарно); это было необходимо для того, чтобы указанная последовательность оказалась между сайтами Bam HI и Sal I полилинкера pUC7. Для этого ДНК плазмид rIPS и pUC7 обрабатывали в отдельности эндонуклеазами рестрикции Pst I и Bam HI. Для плазмиды pUC7 осуществляли недорестрикцию по Bam HI сайту, поскольку полилинкер pUC7 несет два Bam HI сайта. Рестрицированные ДНК смешивали в объеме 20 мкл (конечная концентрация ДНК - 150 мкг/мл) и сшивали с помощью ДНК-лигазы (1 ед.). В процессе лигирования происходит соединение Pst I - Bam HI фрагмента rIPS, величиной 2,4 тысяч пар оснований (т.п.о.), с плазмидой pUC7, раскрытой по Pst I и Bam HI сайтам.

Лигированной смесью трансформировали клетки реципиентного штамма *E.coli* TG1 [3]. Трансформанты с искомой рекомбинантной плазмидой, содержащей sacC в векторе pUC7, отбирали на L-агаре с добавлением 100 мкг/мл ампициллина (маркер pUC7), 0.1 мМ IPTG (изопропилтио-β-D-галактозид) и 40 мкг/мл X-gal (5Br-4Cl-3-индолил-β-D-галактозид - аналог лактозы). Плазида pUC7 содержит N-концевую часть гена lac Z *E.coli*, которая экспрессирует α-пептид β-галактозидазы [11]. α-Пептид способен комплементировать мутацию lac M15 хромосомы хозяйского штамма TG 1, что обуславливает синтез функциональной β-галактозидазы. Клонирование фрагментов ДНК в полилинкере перед структурной частью α-пептида приводит к его инактивации. На средах с индуктором β-галактозидазы IPTG и ее хромогенным субстратом X-gal штамм TG-1, трансформированный вектором pUC7, дает синие колонии, а трансформированный pUC7, несущим инсерцию в полилинкере, - белые. Отбор искомых трансформантов проводили также параллельным высевом лигированной смеси на минимальной среде M9 [3] с сахарозой и ампициллином.

Из отобранных трансформантов выделяли плазмидную ДНК и подвергали рестрикционному анализу, который указал на присутствие в них наряду с векторной ДНК pUC7 дополнительных фрагментов, соответствующих ожидаемому размеру гена sac C (рис.1).

Для доказательства того, что нами клонирован именно 2,4 т.п.о. Pst I-Bam HI, а не 2,7 тпо Bam HI - Bam HI фрагмент с sacC, мы сравнили размеры рестриктов, полученных по Sal I и XmaI сайтам, с рестриктами

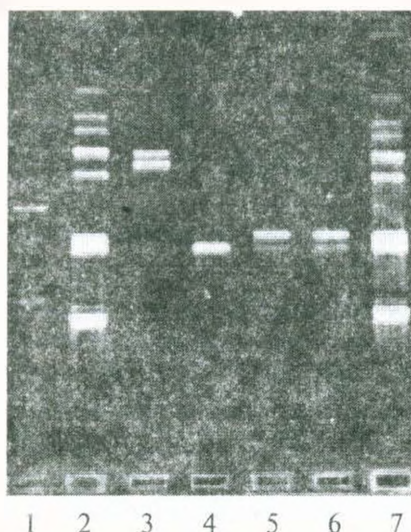


Рис. 1. Электрофореграмма рестрицированных плазмидных ДНК.

1. pUC7::sacC нативная;
2. I/PstI контроль;
3. pUC7::sacC/BamHI;
4. pUC7::sacC/Sal I и PstI;
5. pUC7::sacC/PstI и XmaI;
6. pUC7::sacC/SalI и XmaI;
7. I/PstI контроль.

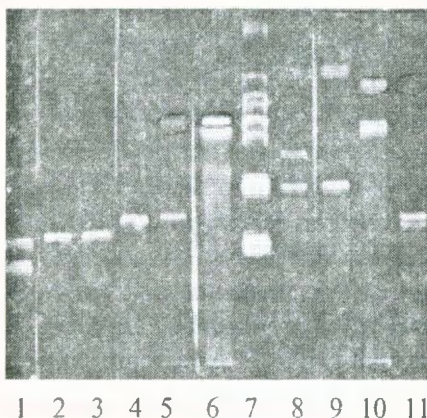


Рис. 2. Электрофоретическое разделение плазмидных рестриков.

1. pAP2034::sacC нативная;
2. pAP2034::sacC/Sal I;
3. pAP2034::sacC/Bam HI;
4. pAP2034/Bam HI;
5. pAP2034::sacC/Bam HI и Sal I;
6. pUC7::sacC/Bam HI и Sal I;
7. I/PstI контроль;
8. pAP2034::sacC/ PstI;
9. pAP2034/PstI;
10. pUC7::sacC/XmaI и Bam HI;
11. pAP2034::sacC/XmaI и Bam HI.

по сайтам Pst I и Xma I. Если бы образовались фрагменты с разницей в 0,3 т.п.о. (0,95 т.п.о. в первом случае и 0,65 т.п.о. во втором), то это свидетельствовало бы о присутствии в плазмиде pUC7 Bam HI-Bam HI фрагмента. А у нас образовались примерно одинаковые фрагменты размером около 5 т.п.о., что соответствует весу искомой рекомбинантной молекулы (рис.2).

Этот предварительный этап позволил на следующей стадии легко переклонировать ген из pUC7 уже на вектор pAP2034 по сайтам Bam HI и Sal I в правильной и единственно возможной ориентации. Для этого ДНК-плазмиды pUC7 : : sac C и pAP2034 расщепляли по Bam HI сайтам, затем рестрикты сшивали с помощью ДНК-лигазы и лигированной смесью трансформировали клетки *E.coli* штамма HB101 [3]. Трансформанты отбирали на селективной среде с ампициллином и стрептомицином, а также на минимальной среде M9 с необходимыми добавками для штамма HB101. Из предполагаемых трансформантов также выделяли ДНК и подвергали ее рестрикционному анализу, который показал, что сконструированная плазмида состоит из полного вектора pAP2034 (8 т.п.о.) и дополнительного Sal I-Bam HI фрагмента (2,4 т.п.о.) (рис.2).

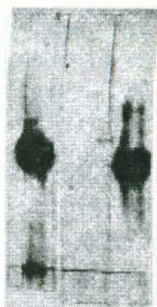
Представленные данные однозначно свидетельствуют о том, что полученная нами конструкция pAP2034 : : sacC, названная pAPL, содержит химерный ген промотор I'- sacC -

polyAg7. Промотор I' и polyAg7 функциональны в растениях и обеспечивают вставленную между ними последовательность ДНК (в данном случае sacC) сигналами инициации транскрипции и полиаденилирования.

Плазмида rAPL была использована в дальнейшем для трансформации клеток *A.tumefaciens* C58CI. Выбор данного штамма обусловлен следующим: он содержит обезоруженную плазмиду pGV3850, у которой онкогены Т-ДНК нопаинового типа были заменены последовательностями pBR322. Присутствие последовательностей pBR322 в составе pGV3850 делает этот вектор универсальным акцепторным вектором: любой ген, клонированный в плазмиде pBR322 или ее производных (каковой и является конструкция rAPL), может быть легко вставлен между последовательностями Т-ДНК за счет гомологичной рекомбинации с образованием плазмидных коинтеграгов [1].

Введение плазмидной ДНК rAPL в клетки *A.tumefaciens* проводили как методом прямой трансформации [1], так и электропорацией. Агробактериальные клоны, содержащие pGV3850 х rAPL, отбирали на селективных средах со стрептомицином, спектиномицином, рифампицином, ампициллином.

Наличие гена sacC в этих клетках подтверждено также блот-гибридизацией по Саузерну рестрицированной тотальной ДНК из отобранных клонов с зондом - последовательностью sacC плазмиды rAPL (рис.4).



1 2 3

Рис. 3. Авторадиограмма агробактериальных ДНК, гибридизирующихся с ³²P-ДНК плазмиды rAPL.

1. ДНК rAPL; 2. ДНК нетрансформированных агробактерий;

3. ДНК агробактериальных трансформантов.



Рис. 4. Этиолированное растение топинамбура на среде с канамицином.

Перенос гена sacC в топинамбур проводили методом "листных дисков" полученными трансформированными агробактериальными клетками.

Селекция трансформированных растений велась по способности к росту на средах, содержащих канамицин (100 мкг/мл), который в норме токсичен для клеток высших растений. Агробактерии удаляли путем обработки антибиотиком цефотаксимом (500 мкг/мл), который не токсичен

для растительных клеток.

На 6-7 день инкубации устойчивые к канамицину растения этиолировались. Наблюдаемое явление альбинизма вызвано, возможно, нарушением генетического аппарата растений (рис.4), что могло быть следствием интеграции рекомбинантной конструкции в геном топинамбура. Изучение физиолого-биохимических особенностей растений несущих, по всей вероятности, ген *sac C*, продолжается.

Выполненная работа частично финансировалась за счет гранта Ассоциации ИНТАС ЕС.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гловер Л.М. Клонирование ДНК. Методы. М., 1988.
2. Гассер Ч.С., Фрейли Р.Т. Трансгенные культурные растения. В мире науки, 8, 24-30, 1992.
3. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М., 1981.
4. Пирюзян Э.С., Андрианов В.М. Плазмиды агробактерий и генетическая инженерия растений. М., 1985.
5. Birnboim H.C., Doly J. NAR, 7, 1513-1523, 1979.
6. De Block Mare, Herrera-Estrella L., Van Montagu M et. al. EMBO. J., 3, 8, 1681-1689, 1984.
7. Kunst F., Lepesant J.-A. and Dedonder R. Biochimie, 168, 59, 287-292, 1977.
8. Lepesant J.-A., Kunst F., Lepesant-Kejzlarova J. and Dedonder R. Mol. Gen.Genet., 118, 135-160, 1972.
9. Lepesant J.-A., Billault A., Keijlarova-Lepesant J., Pascal M., Kunst F. and Dedonder R. Biochimie, 56, 1465-1470, 1974.
10. Mandel M., Higa A. J.Mol.Biol., 53, 154, 1970.
11. Messing J., Viera J. Gene, 19, 259, 1982.
12. Murachige T., Skoog F. Plant. Physiol., 15, 473-497., 1962.
13. Velten J., Schell J. Nucleic Acids Res., 13, 6981-6998, 1985.
14. Zambryski P., Joos H., Genetello C. EMBO J., 2, 2143-2150, 1983.

Поступила 12.XII.1997

ИЗОЭНЗИМНЫЙ СПЕКТР И ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АРГИНАЗЫ В СЕМЕНАХ ГОРОХА *PISUM SATIVUM* L.

А.Х. АГАДЖАНЫН, М.Б. МОЛАН РАД, М.А. ДАВТЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Активность аргиназы в стебелях и корешках гороха резко падает как в темноте, так и на свету. При выращивании в среде с фруктозой в стебелях она подавляется, и наоборот, стимулируется в среде с хлористым натрием и гидроксиламином более чем 3,5 раза. При гелефильтрации бесклеточного экстракта корешков гороха обнаружены два пика аргиназной активности. Определена константа Михаэлиса (K_m) и ингибирования (K_i) для двух изоэнзимов. Валин заметно подавляет активность аргиназы, в то время как пролин и орнитин оказывают слабое влияние.

Ոլոռի ցողուններում և արմատներում արգինազի ակտիվությունը խիստ ընկնում է ինչպես մութ այնպես էլ լույսի պայմաններում: Ֆրուկտոզի միջավայրում աճեցնելիս ցողուններում ֆերմենտի ակտիվությունը ճնշվում է ընդհակառակը, խթանվում է ավելի քան 3,5 անգամ NaCl-ի հիդրոքսիլամինի միջավայրում աճեցնելիս: Ոլոռի արմատների ոչ բջջային մզվածքը հեղիտրացիայի ենթարկելուց հայտնաբերվում է արգինազի ակտիվության 2 գագաթ: Որոշվել է Սիխալիսի (K_m) և ինհիբիցիայի (K_i) հաստատունը երկու իզոէնզիմների համար: Վալինը զգալի ճնշում է արգինազի ակտիվությունը, իսկ պրոլինը և օրնիտինը ֆերմենտի ակտիվության վրա ունենում են թույլ ազդեցություն:

Arginase activity of root and stalk of pea *Pisum sativum* L. sharply falls in dark as in light. By cultivation peas in fructose containing medium it is depressed at stalk and on the contrary, is stimulated in NaCl and hydroxylamine containing media more than 3,5 times. Gel-filtration of pea root extract revealed two peaks showing arginase activity. Michaelis constant (K_m) and kinetic of inhibition (K_i) of these isoenzymes are detected. Valine strongly depresses arginase activity, in that time, proline and ornithine weakly affect.

Растения гороха - аргиназа - изоэнзимный спектр

На основании результатов собственных исследований Давтян [6] выдвинул и обосновал положение о существовании в природе двух различных ферментов аргиназ: уреотелической, участвующей в механизме нейтрализации аммиака через цикл мочевины, и неуреотелической, не связанной с указанным механизмом и имеющей широкое биологическое распространение. В дальнейшем было установлено, что роль неуреотелической аргиназы сводится главным образом к обеспечению процесса образования орнитина путем гидролиза аргинина [2], полиаминов (спермина и спермидина) [13], возможно, и других соединений.

Основным аргументом в пользу представления о функционировании неуреотелической аргиназы в ферментативной системе биосинтеза пролина является выявленная корреляция между активностями аргиназы и ферментов биосинтеза пролина из аргинина у неуреотелических организмов и в непеченочных органах уреотелических животных, где орнитиновый цикл не действует [2].

Аргиназа растений расщепляет аргинин, обеспечивая потребности организма в азоте [8]. Во многих растениях обнаружен весь набор ферментов

орнитинового цикла, и, следовательно, аргиназа в них носит уреотелический характер [15]. Исследования, касающиеся изоэнзимного спектра аргиназы у растений, малочисленны.

Осуществлена очистка аргиназы семян гороха сорта Рамонский-77 [4]. Считается перспективным применение высокоочищенных препаратов аргиназы различного происхождения в качестве противоопухолевого средства [9].

В данной работе приводятся результаты изучения аргиназной активности в стебельках и корешках гороха в различных условиях выращивания, а также изоэнзимного спектра фермента и некоторых физико-химических свойств его.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum* сорта Краснодарский. Органы растений гороха гомогенизировали в 0,1М калий-фосфатном буфере, pH 7,4. Готовили 10%-ный гомогенат. Аргиназную активность определяли методом Ратнер [14]; мочевины - методом Арчибалда [10]. Гельфильтрацию экстрактов для изучения изоэнзимного спектра аргиназы проводили на колонке с сефадексом G-150.

Константу Михаэлиса (Km) и константу ингибирования (Ki) для аргиназы определяли графическим методом Лайнуивера-Бэрка [7].

Результаты и обсуждение. Данные о динамике аргиназной активности в стебельках и корешках гороха, выращенных на свету и в темноте, приведены в табл.1

Таблица 1. Динамика аргиназной активности в стебельках и корешках гороха, мкМ на 1г

Дни прорастания	На свету		В темноте	
	стебельки	корешки	стебельки	корешки
5	33,5 ± 0,88	27,0 ± 0,80	44,3 ± 1,2	35,0 ± 1,0
7	21,5 ± 0,74	18,3 ± 0,79	31,2 ± 0,9	24,3 ± 0,9
9	9,5 ± 0,48	7,3 ± 0,44	15,3 ± 0,8	11,4 ± 0,48
11	5,2 ± 0,32	4,1 ± 0,30	10,2 ± 0,7	6,3 ± 0,35
14	2,6 ± 0,15	1,6 ± 0,15	7,4 ± 0,7	2,8 ± 0,18
18	1,8 ± 0,10	0,8 ± 0,10	5,9 ± 0,5	1,6 ± 0,11

Полученные данные показали, что аргиназная активность в стебельках и корешках гороха сравнительно низка. В стебельках по сравнению с корешками она несколько выше. В процессе прорастания семян активность аргиназы резко падает как в темноте, так и на свету. На 18 день прорастания активность фермента на свету в стебельках и корешках составляла соответственно 1,8 и 0,8 мкМ, а в темноте - 5,9 и 1,6 мкМ. Подобная закономерность выявлена также у гороха сортов V.faba, Рамонский - 77 [4].

Наблюдаемые различия в динамике активности аргиназы на свету и в темноте объясняются тем, что аргиназа семян гороха является ферментом, активность которого в наибольшей степени проявляется в темноте, на свету же она не индуцируется.

В следующей серии экспериментов мы изучали изменение активности аргиназы в стебельках и корешках гороха в зависимости от среды роста (табл.2).

Данные, приведенные в табл.2, показывают, что аргиназная активность стебельков гороха подавляется при выращивании семян в среде с фруктозой, а в среде с хлористым натрием и гидроксиламином, наоборот, фермент проявляет значительную активность. Аналогичная картина

обнаруживается также в корешках, однако здесь активирующее влияние этих соединений значительнее. На 6-й день роста семян под действием хлористого натрия и гидроксиламина активность фермента удваивается, а на 12-й повышается более чем в 3,5 раза. Столь ощутимое активирование аргиназы можно объяснить тем, что в неблагоприятных для организма условиях как приспособительная реакция для биосинтеза пролина субстрат орнитин образуется из аргинина, расщепляемого аргиназой.

Таблица 2. Влияние среды роста на активность аргиназы в стебельках и корешках гороха, мкМ мочевины на 1г ткани

Среда выращивания	Дни прорастания			
	Стебельки		Корешки	
	6	12	6	12
Контроль	33,5 ± 1,65	21,5 ± 1,21	27,0 ± 1,29	17,5 ± 1,04
Фруктоза	27,5 ± 1,33	26,5 ± 1,30	21,0 ± 1,19	19,0 ± 1,12
NaCl	39,0 ± 1,68	64,0 ± 2,1	51,5 ± 2,01	77,0 ± 2,38
Гидроксиламин	36,1 ± 1,62	32,0 ± 1,60	56,0 ± 1,98	64,0 ± 2,11

Нами исследовалась также активность аргиназы в разных частях корешков гороха, выращиваемого на свету и в темноте (табл.3).

Таблица 3. Активность аргиназы в разных частях корешков гороха, выращиваемого на свету и в темноте, мкМ мочевины на 1г ткани

Среда выращивания	Кончик		Середина		Основание	
	на свету	в темноте	на свету	в темноте	на свету	в темноте
Контроль	5,0±0,44	11,1±0,84	3,8±0,41	4,4±0,42	5,6±0,48	6,8±0,51
Фруктоза	2,4±0,23	9,2 ±0,74	1,6±0,12	4,5±0,41	4,0±0,37	7,4±0,65
NaCl	3,8±0,36	7,4±0,63	2,0±0,19	6,8±0,55	3,1±0,32	9,4±0,72

Данные табл.3 показывают, что в темноте все части корешка обладают высокой аргиназной активностью, особенно кончики и основания, и это характерно для всех вариантов (включая контрольный). Сравнительно низкая активность фермента отмечалась в средней части корешка. В варианте с фруктозой в кончике и средней части корешка активность аргиназы в темноте была в 3-3,5 раза выше, чем на свету, а у основания активность фермента в темноте превышала этот показатель на свету менее двух раз.

Обнаруженные нами ранее (неопубликованные данные) высокое содержание свободного пролина и активирование аргиназы в корешках гороха, выращиваемого в темноте, являются существенными аргументами в пользу представления о функционировании аргиназы в ферментативной системе биосинтеза пролина для обеспечения последнего орнитином.

Фракционированием на сефадексе G-150 мы изучали изоэнзимный спектр аргиназы в корешках гороха. Полученные данные (рис.1, 2) показывают, что при гельфильтрации экстракта корешков гороха выявляются два четко разграниченных пика аргиназной активности. Максимум первого пика проявляется во фракции 6, второго - во фракциях 16 и 17. Обнаруживаемые два пика активности аргиназы, очевидно, соответствуют двум (I и II) изоэнзимам фермента. На кривой видно также, что при

выращивании семян на свету и в темноте в присутствии фруктозы оба изоэнзима сильно активируются, а в темноте обнаруживается дополнительный пик аргиназной активности, который при гельфильтрации элюируется в 9-й фракции. В семенах контрольного варианта, выращиваемых на свету, также обнаружены два пика аргиназной активности, элюируемых в тех же фракциях, однако активность первого пика почти в 2 раза уступает таковой второго. В темноте же активности обоих пиков равны.

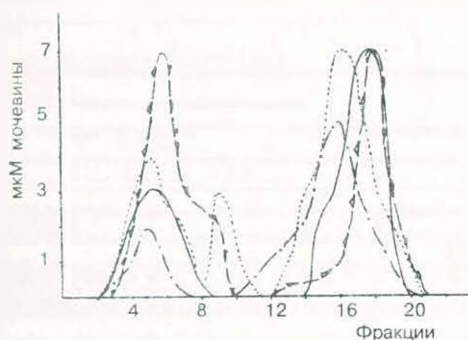


Рис. 1. Изоэнзимный спектр аргиназы в корешках гороха, выращиваемого на свету и в темноте; контроль: на свету (· · · ·), контроль в темноте (— — —), фруктоза: на свету (— · — ·), фруктоза в темноте (— 0 — 0).

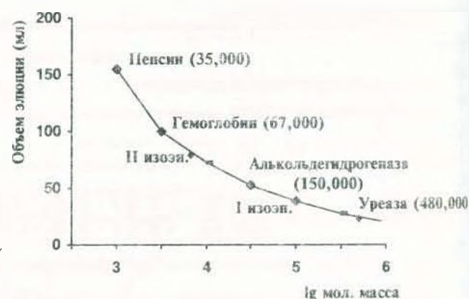


Рис. 2. Калибровочная кривая определения молекулярных масс изоэнзимов аргиназы методом гельфильтрации на сефадекс G-200.

Усиление активности фермента целого гомогената приписывается повышению активности первого высокомолекулярного изоэнзима аргиназы. При гельфильтрации во всех вариантах обнаруживаются два пика белка.

Определена также константа Михаэлиса для двух изоэнзимов аргиназы по графическому методу Лайнуивера-Бэрка [7].

Таблица 4. Ингибирование аргиназы стебельков гороха валином, мкМ мочевины на 1г ткани

Валин, мкмоль	Аргинин, мкмоль	10		50	
		активность аргиназы	% ингибиро- вания аргиназы	активность аргиназы	% ингибиро- вания аргиназы
Контроль		0,880	-	1,55	-
5		0,510	42	0,790	49
10		0,270	69	0,705	55
15		0,260	70	0,580	63
25		0,250	72	0,520	66
35		0,190	78	0,500	68
50		0,170	81	0,400	74

По полученным данным, K_m обнаруживаемых изоэнзимов на свету в присутствии фруктозы составляет: для I - $15,1 \cdot 10^{-3}$, а для II - $26,6 \cdot 10^{-3}$ М. Следовательно, обнаруженные изоэнзимы корешков гороха почти не отличаются по сродству к субстрату - L-аргину. В темноте в присутствии фруктозы K_m для I изоэнзима составляет $8,2 \cdot 10^{-3}$ М, а для II - $21,4 \cdot 10^{-3}$ М. Отсюда следует, что в темноте первый высокомолекулярный изоэнзим

аргиназы не только проявляет высокую активность, но и увеличивается примерно в 2 раза.

Гельфильтрацией на колонке с сефадексом G-200 определена молекулярная масса обнаруженных изоэнзимов (рис.2). Приведенная кривая свидетельствует, что молекулярная масса I изоэнзима составляет 200 кД, а II - 105 кД. Выясняется, таким образом, что по молекулярной массе II изоэнзим аргиназы стебельков гороха близок к большинству аргиназ, а I - к аргиназе ряда уреотелических организмов (печень птиц, рептилий и др.) [12].

В задачу наших исследований входило также изучение характера ингибирования высокомолекулярного (I) изоэнзима аргиназы орнитином, лизином, валином, пролином (L - форма аминокислот). Полученные данные по валину приведены в табл. 4.

Данные таблицы показывают, что валин заметно подавляет аргиназу стебельков гороха (на 70-80%) при наличии субстрата - аргинина в указанных количествах. Известно [1], что влияние орнитина и пролина на активность фермента незначительно. Характер ингибирования валина - конкурентный, а орнитина и пролина - неконкурентный.

Последние две аминокислоты не оказывают никакого влияния на аргиназу гороха сорта Рамонский - 77 [5]. Известно также, что орнитин не ингибирует лишь активность изоферментов аргиназы мозга эмбриона кур [3] и аргиназы *B.subtilis* [11].

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Докт.дисс., Ереван, 1990.
2. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог.ж.Армении, 27, 5, 19-23, 1974.
3. Арутюнян Т.Г., Карапетян С.А., Байков В.А. Биолог.ж.Армении, 34, 8, 813-817, 1981.
4. Варданян Дж.А. Биолог. журн. Армении, 33, 8, 853-856, 1980.
5. Варданян Дж.А., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 37, 1, 36-40, 1984.
6. Давтян М.А. Докт. дисс., Ереван, 1970.
7. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Изд. ИЛ., М., 1966.
8. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях, М., Наука, 1972.
9. Abdelal R.M. Annu.Rev.Microbiolog, 33, 139, 1979.
10. Archibald R.M. J.Biol.Chem., 156, 121-142, 1944.
11. Nakamura N., Mosako F., Kasuo K. Agr. Biol. Chem, 37, 2827-2833, 1978.
12. Porembska Z. Enzyme., 15, 198-209, 1973.
13. Russel. Biochem J., 130, 71-76, 1972.
14. Ratner S., Pappas A. J. Biol. Chem., 179, 1183-1198, 1949.
15. Shen T.E., Rird H.R., Sunde M.Z. Poultry Sci, 52, 676-682, 1973.

Поступила 30.VII.2000

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭФФЕКТОРОВ НА НАКОПЛЕНИЕ СВОБОДНОГО ПРОЛИНА В ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ ГОРОХА *PISUM SATIVUM L.*

А.Х. АГАДЖАНЯН, М.Б. МОЛАИ РАД, Дж.Г. ГУКАСЯН, А.А. АГАДЖАНЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

Показано высокое содержание аминокислот в проростках гороха, выращиваемого в растворе с хлористым натрием. Получены данные о значительно низком по сравнению с контролем содержании свободного пролина в корешках и стебельках в присутствии НАДФ, фруктозы, фруктозо-6-фосфата. Выявлена повышенная активность ферментов биосинтеза пролина в варианте с гиббереллином. При наличии в среде фруктозы наибольшее количество свободного пролина обнаружено у основания корешков (как в темноте, так и на свету), а в кончике корня, наоборот, обнаруживается минимальное содержание его.

Նադրիումի քլորիդի միջավայրում աճեցված դրոշի ծլած սերմերում հայտնաբերվել է ազատ ամինաթթուների բարձր քանակություն: Ստուգիչի համեմատությամբ դրոշի ցողունների և արմատների ազատ պրոլինի քանակությունը զգալի ցածր է ՆԱԴՖ, ֆրուկտոզի, ֆրուկտոզ-6-ֆոսֆատի միջավայրում: Պրոլինը կենսասինթեզի ֆերմենտի ակտիվությունը բարձր հիբերելինի միջավայրում աճեցնելիս, իսկ ֆրուկտոզի միջավայրը ազատ պրոլինի բարձր քանակություն և հայտնաբերվում է արմատների հիմքում (ինչպես մթնոթյան այնպես էլ լույսի պայմանում), իսկ արմատի ծայրապայտյանում ընդհակառակը, այն հայտնաբերվում է մինիմալ քանակությամբ:

High free aminoacids containing (pool) in peas stalk germinate in sodium ehloride solution. At the presence of NADP, fructose, fructoso-6-phosphate and free proline level in root and stalk in comparison with control is less. In gibberellin variant high proline biosynthesis enzymes activity is appeared. At the presence of fructose the highest amount of free proline is detected at the basal segment of root (as in the dark, so at light), in opposite at the end of root is detected the minimum content of it.

Растения гороха - эффекторы - пролин

Вопрос о связи между накоплением свободного пролина и интенсивностью ростовых процессов может быть изучен с использованием ингибиторов роста и ретардантов. Было показано [6], что хлорхолинхлорид (ССС) подавляет рост пшеницы и способствует увеличению в растениях свободного пролина.

Имеются малочисленные сведения [10] о существовании взаимосвязи между ростом растений и накоплением свободного пролина. Остановка или снижение интенсивности ростовых процессов в большинстве случаев приводит к накоплению свободного пролина и, наоборот, усиление нормального роста сопровождается снижением содержания этой аминокислоты [1].

Содержание свободных аминокислот в клетке в зависимости от внешних факторов подвергается глубоким изменениям [1, 6]. Особое место в этом отношении занимает свободный пролин, которому отводят протекторную роль в экстремальных для клеток условиях и обмен которого тесно связан с различными физиологическими состояниями организма. Для большинства растений, произрастающих в нормальных условиях,

характерно низкое содержание свободного пролина в вегетативных органах и необычайно высокая концентрация его в пыльце [1, 6], что является показателем нормальной жизнедеятельности и фертильности ее. В семенах свободный пролин либо отсутствует, либо содержится в очень малых количествах [8].

Настоящая работа посвящена изучению некоторых сторон обмена пролина в корешках гороха *Pisum sativum* L. под влиянием различных факторов среды.

Материал и методика. Объектом исследования служили семена гороха *Pisum sativum* L. Экстракцию свободных аминокислот, их хроматографирование, количественное определение проводили по Лисицки и Лоран [12]. Химическое определение пролина осуществляли по Блюменкрантцу [9]. Активность фермента биосинтеза пролина определяли по описанному нами ранее методу [4].

Результаты и обсуждение. В первую очередь мы изучали содержание свободных аминокислот в проростках гороха, выращиваемого на дистиллированной воде и в 0,1%-ном растворе хлористого натрия.

Таблица 1. Влияние хлористого натрия на содержание свободных аминокислот в корешках гороха, мкМ на 1 г ткани

Аминокислоты	Варианты опыта	
	с дистиллятом	с раствором хлористого натрия
цис	3,78±0,3	4,0±0,35
лиз	17,3±1,5	13,1±1,2
арг	5,8±0,5	9,09±0,8
асп	30,9±3	67,4±6,5
гли-сер	93,2±8	118,2±10,5
глу	173,0±17	240,0±20
ала	25,0±2,2	43,9±3,8
про	9,57±0,85	87,7±8
тир	33,0±3,1	33,6±2,9
Азетидин-2-карбоновая кислота	-	66,4±6,1
вал-мет	15,1±1,3	15,0±1,3
лей-илей	12,0±1	13,0±1,1

Полученные данные, приведенные в табл.1, показали, что наибольшее накопление свободных аминокислот в основном происходит при выращивании семян в растворе с хлористым натрием, особенно пролина, аспартата, глутамата, аргинина, аланина и серин-глицина. Следует отметить, что механизм накопления пролина в стрессовых условиях окончательно не установлен. По данным некоторых исследователей [11], в условиях солевого стресса превращение меченого по углероду ^{14}C -L- про в глутамат и аргинин задерживается. Однако с этим трудно согласиться, поскольку результаты наших экспериментов свидетельствуют об обратном, т.е. при солевом стрессе, наряду с увеличением содержания пролина, наблюдается также накопление аргинина и глутамата. Примечательно, что при солевом стрессе в корешках гороха обнаруживается одно

нингидринположительное соединение, которым, по-видимому, является азетидин-2-карбоновая кислота. Это соединение нами было обнаружено в большом количестве при нагревании хроматограммы при 120°. Имеются данные [5], что эта аминокислота, в частности у ландыша, образуется из S-аденозил-метионина при внутренней перестройке.

Получены данные, согласно которым азетидин-2-карбоновая кислота конкурирует с пролином при включении последнего в структуру белка [7].

В табл.2 приводятся результаты изучения влияния различных эффекторов на содержание свободного пролина в стебельках и корешках гороха.

Таблица 2. Влияние различных эффекторов на содержание свободного пролина в стебельках и корешках гороха, мкМ про на 1г ткани

Эффекторы	Содержание свободного пролина	
	в стебельках	в корешках
Контроль	2,88 ± 0,2	0,48 ± 0,02
НАДФ	2,40 ± 0,3	0,40 ± 0,02
Фруктоза	0,96 ± 0,1	0,16 ± 0,01
Фруктозо-6-фосфат	0,76 ± 0,1	0,13 ± 0,001
Гиббереллин	0,65 ± 0,1	0,10 ± 0,01
NaCl	10,08 ± 0,7	1,68 ± 0,05
KCl	2,78 ± 0,2	0,48 ± 0,03
NaHCO ₃	2,84 ± 0,2	0,48 ± 0,03
NH ₄ OH	2,70 ± 0,2	1,2 ± 0,04

Видно, что эффекторы по-разному влияют на уровень накопления пролина. Так, например, в присутствии НАДФ, фруктозы, фруктозо-6-фосфата и гиббереллина содержание свободного пролина значительно ниже по сравнению с контролем как в корешках, так и в стебельках, особенно при наличии в среде последних трех эффекторов. Следует отметить также, что в варианте с гиббереллином наблюдается довольно интенсивный рост корешков. Таким образом, не вызывает сомнения тот факт, что при росте и размножении клеток потребность в свободном пролине сильно возрастает для обеспечения анаболических процессов. В нашей лаборатории получены аналогичные результаты в опытах с лактирующей молочной железой и мозгом крыс, где возрастание потребности в пролине приводило к ингибированию ферментов его биосинтеза, однако содержание эндогенного пролина оставалось на очень низком уровне [2]. У жуков же фасоловой зерновки, где синтетические процессы заметно уступают гидролитическим, пролин не расходуется, что приводит к увеличению уровня эндогенного пролина [3].

Уменьшение содержания свободного пролина под действием фруктозы и фруктозо-6-фосфата можно объяснить, с одной стороны, взаимосвязью между нециклическим фотосинтетическим

фосфорилированием и биосинтезом пролина через кофактор НАДФН, а с другой - стимулирующим влиянием фруктозо-6-фосфата на фотосинтез путем усиления активности рибулозо-дифосфат карбоксилазы, одного из узловых ферментов темновой фазы фотосинтеза.

На рис.1 показано влияние различных эффекторов на ферменты биосинтеза пролина и содержание свободного пролина в корешках гороха. Активность ферментов биосинтеза пролина высока в варианте с гиббереллином, но в остальных вариантах заметной разницы в этом показателе по сравнению с контролем не выявляется. Тем не менее в этих вариантах по сравнению с контролем содержание свободного пролина значительно ниже. Очевидно, это обусловлено высокой пролиноксидазной активностью, что приводит к включению пролина в метаболический путь через глутамат.



Рис. 1. Влияние различных эффекторов на ферменты биосинтеза пролина и на содержание свободного пролина в корешках гороха.

1 - Контроль, 2 - НАДФ⁺, 3 - фруктоза, 4 - гиббереллин, 5-фр-6-ф.

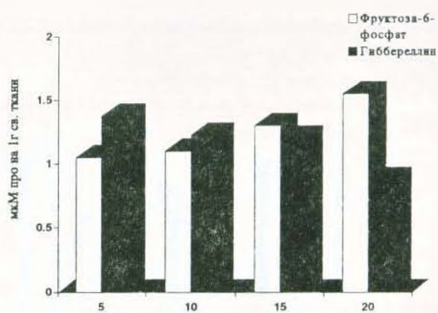


Рис. 2. Влияние различных концентраций фр-6-ф и гиббереллина на содержание свободного пролина в корешках гороха.

В одной из серий экспериментов мы изучали влияние различных концентраций фруктозо-6-фосфата и гиббереллина на накопление свободного пролина в корешках гороха.

Данные, представленные на рис.2, свидетельствуют о том, что под влиянием фруктозо-6-фосфата содержание свободного пролина уменьшается, в то время как в концентрации 20 мг %

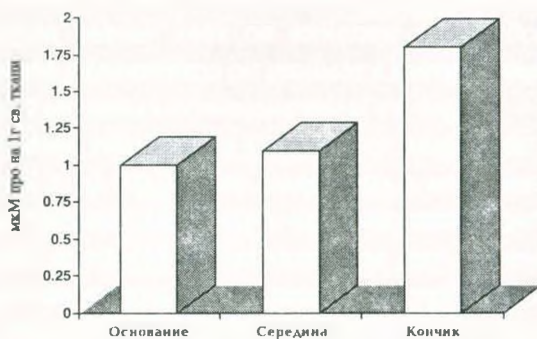


Рис. 3. Содержание свободного пролина в разных частях корня гороха.

гиббереллин, наоборот, способствует повышению этого показателя более чем в 1,5 раза, что трудно объяснить.

Далее для подтверждения высказанного выше предположения, согласно которому активные процессы роста и размножения клеток сопровождаются интенсивным расходом свободного пролина для реализации синтетических процессов в клетке, мы изучали накопление его в различных частях корешка.

Данные рис.3 показывают, что в корневом чехлике, под которым расположена зона роста и растяжения корня, содержание свободного пролина в 2 раза выше, чем у основания корня. Этим полностью подтверждается, что между ростом и размножением клеток и содержанием свободного пролина имеется четко выраженная обратная корреляция.

Мы изучали также накопление свободного пролина в разных частях корешка гороха при выращивании его на свету и в темноте в присутствии фруктозы и хлористого натрия. Полученные данные приведены на рис.4.

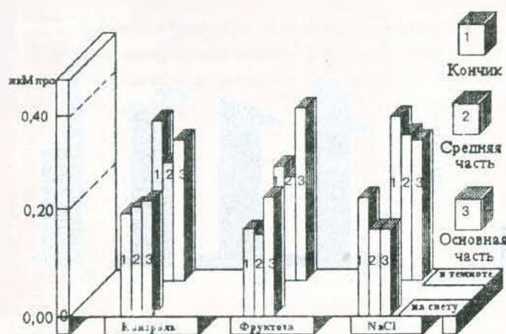


Рис. 4. Содержание свободного пролина в разных частях корешка гороха на свету и в темноте.

Видно, что в контрольном варианте в кончике корешка на свету содержание свободного пролина уступает таковому в средней его части и у основания. В темноте наименьшее количество свободного пролина обнаруживается в средней части корешка, а в кончике и у основания оно почти одинаково. В варианте с фруктозой высокое содержание свободного пролина отмечается у основания корешка как в темноте, так и на свету, а в кончике его, наоборот, количество этой аминокислоты минимальное. Тем не менее в этом варианте содержание свободного пролина во всех частях корешка довольно высокое при выращивании в темноте по сравнению с аналогичным показателем на свету.

Такая же закономерность выявлена в варианте с хлористым натрием, однако здесь содержание свободного пролина в кончике корешка гораздо выше, чем в остальных частях его (как в темноте, так и на свету). Это объясняется тем, что хлористый натрий подавляет рост и размножение клеток, что задерживает включение пролина в структуру белка и способствует накоплению его в кончике корешка, где расположена зона роста и растяжения. Следует отметить также и тот факт, что, по-видимому, под влиянием хлористого натрия стимулируется активность пирролин-5-карбоксилат редуказы, что приводит к усилению синтеза пролина. Такое

объяснение тем более оправданно, что другими авторами [13] установлено, что в листьях галофитов в условиях солевого стресса активность пирролин-5-карбоксилат редуктазы возрастает в несколько раз. Разумеется, при стрессе усиливаются адаптивные реакции организма, проявляются тонкие регуляторные возможности ферментативных процессов, в частности, пирролин-5-карбоксилат редуктазы, одного из ферментов биосинтеза пролина.

В заключение отметим также, что во всех изученных нами вариантах, включая контрольный, в темноте во всех частях корешка обнаруживалось более высокое содержание свободного пролина, чем на свету. Это объясняется тем, что, по-видимому, ферменты окисления пролина сильнее стимулируются светом, нежели ферменты его биосинтеза, поэтому процесс окисления пролина в темноте протекает медленнее по сравнению с синтезом этой аминокислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агаджанян А.Х. Канд. дисс., Ереван, 1966.
2. Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М. Биолог. журн. Армении, 27, 4, 1974.
3. Агаджанян А.Х., Арутюнян Л.М., Гукасян Дж.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 1, 176, 1981.
4. Агаджанян А.Х., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 5, 1974.
5. Кретович В.Л. Обмен азота в растениях. М., 1972.
6. Савицкая Н.Н. Научн. докл. высш. шк., Биолог. науки, 2, 1976.
7. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. М., 1985.
8. Aspinall L., Singh T.N., Paleg L.G. Austrel. J. Biol. Sic., 26, 2, 1973.
9. Blumenkrantz N. Clin. Biochem., 13, 177, 1980.
10. Fowolen., Richmond M.H. Biochem. Biophys. Acta, 71, 2, 1963.
11. Goas M.C. Acad. Sci., Ser. D., 272, 414, 1971.
12. Lisitzky S., Laurent S. Bull. Soc. Chem. Biol., 1137, 1955.
13. Treichel S. Ber. Deutch. Bot. Ges., 29, 1, 1979.

Поступила 28.VII.2000

ВЛИЯНИЕ ОБРЕЗКИ НА ВОДНЫЙ РЕЖИМ НЕКОТОРЫХ ДРЕВЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

В.О.КАЗАРЯН, Р.Ф.ХАЧАТРЯН

Институт ботаники НАН Армении, 375063, Ереван

На ясене, грабе и рябине показано, что обрезка значительно улучшает водный режим растений, у обрезанных деревьев в течение всего вегетационного периода наблюдается более высокое содержание общей и свободной воды в листьях, повышается интенсивность транспирации листьев, снижается водный дефицит. Подобное влияние обрезки на водный режим объясняется изменением корне-листового соотношения растений в пользу активных корней, т. е. повышением корнеобеспеченности листьев.

Հացենու, բոխու և արոսենու ծառատեսակների վրա ցույց է տրված, որ եղի ազդեցությամբ զգալիորեն բարելավվում է բույսերի ջրային ռեժիմը. ետված բույսերի մոտ ռդջ վեգետացիայի ընթացքում նկատվում է ընդհանուր ջրի և նրա ազատ ձևի պարունակության աճ տերևներում, բարձրանում է տերևների տրանսպիրացիոն ակտիվությունը, նվազում է ջրային դեֆիցիտը: Եղի նման ազդեցությունը ջրային ռեժիմի վրա բացատրվում է բույսերի արմատա-տերևային փոխհարաբերակցության փոփոխությամբ՝ ի օգուտ ակտիվ արմատների, այսինքն մեծանում է տերևների արմատաապահովվածությունը:

The pruning considerably improves water relationships of the plants: ash, honbeam and mountain ash, the pruned trees, during the whole vegetation period, have higher contents of general and free water. Transpiration intensity of leaves is increased, and a water deficit is reduced. Such influence of the pruning on the water relationships can be explained by assuming that the root-leaf correlation of the plants is changed in favour of active roots, i.e. the root-security of leaves is increased.

Обрезка деревьев - водный режим - интенсивность транспирации

Обрезка является одним из эффективных фитотехнических приемов, воздействующих на вегетативный рост, плодоношение, продолжительность жизни, а также на другие показатели жизнедеятельности растений. В одной из первых работ, касающихся причин улучшения водного режима листьев обрезанных деревьев [4], показано, что вследствие укорачивания ветвей повышается содержание воды в листьях яблони. В дальнейшем было установлено, что количество воды в листьях, побегах и плодовых почках у обрезанных деревьев удерживается на более высоком уровне, чем у контрольных [1, 7, 10, 12].

Улучшение водоснабжения растений при обрезке некоторые авторы [5, 6] объясняют удалением верхушечных метамеров ветвей со слабо развитой проводящей системой. Это утверждение основано на экспериментальных данных, свидетельствующих о более развитой ксилеме в побегах обрезанных деревьев [5]. Однако лишь на основании анатомических изменений вряд ли возможно объяснение активации жизнедеятельности растений вследствие обрезки. Этот фитотехнический прием прежде всего приводит к существенному изменению соотношения массы активных корней и листьев надземных органов, в результате чего интенсифицируются основные физиологические процессы, в первую очередь водообмен растений [3]. Это подтверждается имеющимися в литературе экспериментальными данными, касающимися обрезки подземных органов. Установлено, что удаление части корней приводит к противоположному эффекту: подавлению роста надземных органов [3], снижению интенсивности транспирации [8].

Таким образом, изменение соотношения массы корней и листьев

способствует усилению функциональной активности и роста тех полярных органов, которые подвергались обрезке [3].

Изложенные выше немногочисленные данные дают основание полагать, что укорачивание ветвей, в первую очередь улучшая водный баланс растений, должно влиять и на интенсивность транспирации, насыщение и тургоресцентность листьев, а также на другие показатели водного режима.

Для экспериментального подтверждения этого предположения нами были поставлены опыты с некоторыми древесными растениями.

Материал и методика. Опыты проводили в Ереванском ботаническом саду. Объектами исследований служили: деревья ясени (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.), граба (*Carpinus caucasica* A. Grossh.), рябины (*Sorbus hajastana* Gabr.). Обрезку проводили ранней весной, с прореживанием кроны: укорачиванием скелетных и полускелетных ветвей и удалением 1/2 - 2/3 однолетних побегов. У контрольных деревьев проводили хозяйственную обрезку (удаление сухих, сломанных побегов, веток и ветвей).

Для выявления влияния обрезки на водный баланс, интенсивность транспирации, а также тургоресцентность листьев в разные периоды вегетации проводились анализы с одноярусными листьями.

Содержание различных форм воды определяли по Маринчик [11], интенсивность транспирации — применением метода быстрого взвешивания [11], водный дефицит - по методике, описанной Починком [9].

Результаты и обсуждение. Деревья, подвергавшиеся обрезке, интенсивно обновлялись, образуя массу боковых энергично растущих побегов.

Таблица 1. Влияние обрезки на содержание форм воды в листьях опытных растений

Растение	Вариант	Формы воды								
		общая	свободная	связанная	общая	свободная	связанная	общая	свободная	связанная
		15/VI			18/VIII			5/X		
Ясень	Контроль	63,32	39,14	24,18	60,62	34,19	26,43	55,97	26,05	29,92
	Обрезка	69,41	47,49	21,92	68,15	45,08	23,07	61,06	32,90	28,16
Рябина	Контроль	58,15	46,20	11,95	55,45	41,63	13,82	52,01	34,91	17,10
	Обрезка	63,77	51,17	12,60	59,11	42,98	17,13	56,92	38,87	17,05
Граб	Контроль	61,10	33,98	27,12	60,06	31,36	28,70	56,24	25,02	31,22
	Обрезка	64,84	40,39	24,45	62,92	36,80	26,12	60,49	29,64	30,85

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что в начале вегетационного периода активный рост побегов сочетается с высоким содержанием воды в листьях как у контрольных, так и у обрезанных деревьев. Но у обрезанных деревьев содержание воды значительно выше. В ходе вегетации и по мере затухания ростовых процессов наблюдается снижение содержания воды в листьях, но разница между вариантами по-прежнему сохраняется. Эти различия более наглядно проявляются у ясеня. Так, разница в содержании воды между вариантами у граба составляла 3,74; 2,86; 4,25 %, тогда как у ясеня - 6,09; 7,53; 5,09 % (в начале, середине и в конце вегетации соответственно).

Интересные данные получены в отношении влияния обрезки на количественные изменения различных форм воды в листьях. Известно, что для нормального протекания физиологических процессов в растениях большое значение имеют степень гидратации коллоидов протоплазмы, достаточное содержание в ней свободной воды и благоприятное соотношение между свободной и связанной водой [2]. Из приведенных в табл. 1 данных видно, что в соотношении содержания связанной и свободной воды между контрольными и обрезанными деревьями имеются значительные различия. В результате обрезки сильно увеличивается количество свободной воды, тогда как содержание связанной воды в среднем немного уменьшается. Дело в том, что высокое содержание свободной воды способствует повышению синтетических процессов в растении. Соотношение свободной и связанной воды у контрольных деревьев ясеня в разные периоды вегетации составляло 1,62; 1,29; 0,87, тогда как у обрезанных - 2,17; 1,95; 1,17. У рябины влияние обрезки на это соотношение выражено относительно слабо. Повышенное соотношение свободной и связанной фракций воды в большей степени определяет интенсивность других показателей водного режима, например, транспирации [2]. Обильное поступление воды в листья обрезанных деревьев, а также улучшение освещенности внутри кроны существенно усиливает интенсивность транспирации [1,13]. Это установлено и в нашем опыте (табл. 2): видно, что листья обрезанных деревьев проявляют повышенную транспирационную активность. У обрезанных растений граба, по сравнению с контролем, интенсивность транспирации увеличивалась в 1,25 раза, у рябины - в 1,30, у ясеня - в 1,19 раза.

Таблица 2. Изменение интенсивности транспирации листьев контрольных и обрезанных растений

Растение	Вариант	Потеря воды со 100 см ² поверхности листа				Потеря воды за 4 мин, мг/100см ²
		2 мин	3 мин	4 мин	5 мин	
Ясень	Контроль	18,66	17,20	19,30	21,24	76,40
	Обрезка	24,51	23,52	22,46	20,15	90,64
Рябина	Контроль	17,46	15,39	16,53	14,81	64,19
	Обрезка	18,87	22,79	22,02	19,62	83,30
Граб	Контроль	8,48	7,57	6,33	6,07	28,45
	Обрезка	11,38	8,30	7,19	8,60	35,47

Мы изучали также влияние обрезки на дефицит насыщения листьев водой. Известно, что тургоресцентность листьев возрастает с повышением влажности почвы. Из данных табл. 3 следует, что в начале вегетационного периода листья опытных деревьев были сравнительно лучше оводнены и в связи с этим имело место повышение относительной тургоресцентности. Во второй половине вегетационного периода дефицит насыщения клеток водой возрастает.

Таблица 3. Влияние обрезки на дефицит насыщения и относительную тургоресцентность листьев опытных растений

Растение	Вариант	Водный дефицит	Относительная тургоресцентность	Водный дефицит	Относительная тургоресцентность	Водный дефицит	Относительная тургоресцентность
		20/VI		21/VIII		4/X	
Ясень	Контроль	9,73	90,27	10,44	89,56	11,90	88,10
	Обрезка	6,91	93,09	8,05	91,95	12,10	87,90
Рябина	Контроль	12,02	87,98	15,77	84,27	16,62	83,38
	Обрезка	8,60	91,40	14,01	85,99	14,56	85,44
Граб	Контроль	11,37	88,63	10,40	89,60	14,22	85,78
	Обрезка	11,43	88,57	9,02	90,98	12,03	87,97

Вследствие обрезки водный дефицит у деревьев ясеня и рябины значительно снижается, у граба эти изменения не заметны.

Таким образом, результаты проведенных опытов подтверждают, что повышенная корнеобеспеченность листьев обрезанных деревьев приводит к улучшению водного баланса и, следовательно, оказывает положительное влияние и на другие процессы жизнедеятельности растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Казарян В.О. Старение высших растений. М., Наука, 1969.
2. Казарян В.О., Авакян Г.С., Давтян В.А., Кулинджян А.А. Тр. ин-та бот. АН Арм. ССР, 21, 94-101, 1986.
3. Казарян В.О. Физиологические аспекты эволюции от древесных к травам. Л., Наука, 1990.
4. Кияшко П.И. Сад и огород, 10, 1951.
5. Коломиец И.А., Романова А.Т. Научн. труды Укр. науч.-исслед. ин-та садоводства, 40, 173-190, 1962.
6. Копылов Н.И., Тимошенко С.Е. Садоводств., виноград. и виноделие Молдавии, 12, 8-12, 1971.
7. Назарова А.Н. Научн. труды Укр. науч.-исслед. ин-та садоводства, 40, 257-275, 1962.
8. Пильщикова Н.В., Пильщиков Ф.Н. Мат. Всесоюзн. симпоз., Киев, Наукова думка, 1984.
9. Починок Х.Н. Методы биохимического анализа растений. Киев, 1976.
10. Резванцева Л.В. Мол. ученые-садов. России. Тез. докл. Всерос. совещ., 174-177, М., 1995.
11. Сказкин Ф.Д., Ловчиновская Е.И., Миллер М.С., Аникиев В.В. Практикум по физиологии растений. М., 1958.
12. Щербатко Д.М. Садоводство, 2, 124-135, 1965.
13. Marini R., Borden J. J. Amer. Soc. Hortic. Sci, 107, 1, 170-174, 1982.

Поступила 17.XI.1998

ВЛИЯНИЕ ПОРОСЛЕВОЙ НАГРУЗКИ НА РАЗВИТИЕ ЛИСТОВОЙ ПОВЕРХНОСТИ И НА ВОДНЫЙ РЕЖИМ СРУБЛЕННЫХ ДЕРЕВЬЕВ В УСЛОВИЯХ ЗЕЛЕННОГО КОЛЬЦА Г.ЕРЕВАНА

К.Ш. САРКИСЯН

Армянская сельскохозяйственная академия, 375009, Ереван

Изучены развитие листовой поверхности и некоторые показатели водного режима порослевых побегов 21-40-летних срубленных деревьев ксерофитной робинии лжеакации и мезофитной липы кавказской в зависимости от их порослевой нагрузки. Выявлен ряд особенностей в зависимости от экологического типа деревьев. Наиболее высокие показатели развития поверхности листьев и их физиологической активности у робинии лжеакации отмечаются у пней 31-летних деревьев, а у липы кавказской - у пней 40-летних.

Ուսումնասիրվել են որինիա կեղծ ակացիայի և կովկասյան լորենու 21-40 տարեկան հալված ծառերի կոճղաշվերի տերևային մակերեսի զարգացումը և ջրային ռեժիմի մի շարք ցուցանիշներ. կախված շվային ծանրաբեռնվածությունից: Բացահայտվել են նշված ցուցանիշների մի շարք առանձնահատկություններ կախված ծառերի էկոլոգիական տիպից: Կոճղաշվերի տերևային մակերեսի զարգացման և նրանց ֆիզիոլոգիական ակտիվության առավել բարձր ցուցանիշներ նկատվում են որինիա կեղծ ակացիայի համար 31 տարեկան ծառերի, իսկ կովկասյան լորենու համար 40 տարեկան ծառերի կոճղերի մոտ:

The development of leaf litter and some indices of water regime of verdure sprouts of 21-40 year cut xerofit pseudoacacia and Caucasian mesofit lime were studied depending on their verdure litter. A number of peculiarities is found out depending on the ecological type of trees. The highest shourings of the development of leaf litter and their physical activity are noted among the stumps of 31 years pseudoacacia and 40 years Caucasian lime.

Зеленое кольцо Еревана - срубленные деревья - порослевая нагрузка - водный режим

Применяемые в начале 90-х годов бесконтрольные рубки насаждений нанесли огромный ущерб зеленому кольцу г.Еревана.

Для сохранения особей и восстановления порубленных лесонасаждений следует выявить физиологические особенности порослевых побегов. Необходимость таких исследований диктуется тем, что порослевое возобновление лесонасаждений приводит не только к быстрому росту порослевого поколения, но и к раннему старению [2, 4]. Особенно важно изучение водного режима листьев порослевых побегов в зеленом кольце Еревана с его резко выраженным континентальным климатом, жарким продолжительным летом и суровой зимой.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения развития листовой поверхности, а также ряда показателей водного режима листьев порослевых побегов, образовавшихся на пнях разновозрастных деревьев.

Материал и методика. Объектом исследований явились 21-40-летние деревья робинии лжеакации (*Robinia pseudoacacia* L.) и липы кавказской (*Tilia caucasica* Rupr), отличающиеся по степени засухоустойчивости и произрастающие в зеленом кольце г. Еревана на территории, прилегающей к парку "Победа". В качестве модельных выбирались пни срубленных деревьев диаметром 11-20, 21-30 и 31-40 см, т.е. соответственно 21-, 31-, 41-летних деревьев. На

каждом пне оставлялись 1,3 и 5 порослей (в каждом варианте по пять модельных срубленных деревьев, для которых применялись одни и те же агротехнические мероприятия).

Поверхность листьев определяли методом высечек [5], содержание форм воды - по Маринчик [8], водный дефицит листьев - разницей между их начальным весом и весом после выдержки в воде в течение шести часов [7], интенсивность транспирации - весовым методом [8]. Повторность определений - четырехкратная.

Результаты и обсуждение. Данные (табл.1) показывают, что независимо от степени засухоустойчивости исследуемых пород с увеличением числа порослей на пне общее количество и поверхность листьев увеличиваются, однако в расчете на один порослевой побег они убывают. При этом наибольшая листовая поверхность отмечалась на пнях диаметром 21-30 см.

Таблица 1. Количество и поверхность листьев порослевых побегов робинии лжеакации и липы кавказской

Возраст дерева Диаметр пня, см	Число порослей, шт.	Листья					
		общее количество, шт.		площадь одного листа, см ²		общая поверхность, дм ²	
		робинии	липы	робинии	липы	робинии	липы
21	1	320	441	71,61	15,20	229,1	67,0
	3	930	1185	56,70	14,57	527,3	172,7
11-20	5	1500	1900	56,87	13,15	853,0	249,9
31	1	350	520	177,10	28,60	619,9	148,7
	3	1008	1395	185,40	26,10	1868,8	364,1
21-30	5	1660	2150	160,20	24,48	2659,3	526,3
40	1	270	385	70,16	16,36	189,4	63,0
	3	735	1044	78,40	15,84	576,2	165,4
31-40	5	1140	1820	61,29	14,56	698,7	265,0

Интересно, что у пней 40-летних деревьев указанные показатели падают даже ниже, чем у 21-летних особей. Вероятно, в этом возрасте возникает несоответствие массы активных корней и листовой поверхности, что отмечено при изучении причин раннего затухания роста порослевых побегов [3, 4].

При сравнении полученных данных выяснилось, что по мере увеличения порослевой нагрузки до 30-летнего возраста количество и поверхность листьев у пней ксерофитной породы робинии лжеакации убывают сравнительно низкими темпами, нежели у мезофитной липы кавказской. По-видимому, в этот период жизни первая лучше приспособлена к данным условиям произрастания (и корневая система развита лучше), в связи с чем порослевая нагрузка не так отрицательно влияет на формирование и рост ассимиляционного аппарата.

В 40-летнем возрасте прослеживается обратная закономерность в пользу липы кавказской. Мы объясняем это ускоренным темпом возрастания числа и поверхности листьев, что может способствовать коррелятивному развитию ее активных корней при увеличении порослевой нагрузки [3].

Возраст и порослевая нагрузка вызывают характерные изменения в общей оводненности листьев исследуемых объектов (табл.2). Оказалось,

что содержание общей воды в листьях робинии лжеакалии, за редким исключением, значительно выше, чем у липы кавказской. Причем у первой с увеличением возраста деревьев с 20 до 30 лет и диаметра пня содержание общей воды возрастает с последующим спадом в возрасте 40 лет. У липы же увеличение возраста является фактором снижения общей оводненности листьев. Весьма интересными оказались данные о содержании общей воды при увеличении порослевой нагрузки. Как правило, последнее отрицательно сказывается на этом показателе, что более рельефно проявляется у робинии лжеакалии. Вместе с тем у всех исследуемых возрастных групп этой породы увеличение числа порослей отрицательнее сказывается на оводненности листьев, чем у липы кавказской. Это говорит в пользу того, что в одних и тех же условиях произрастания у робинии лжеакалии при увеличении числа порослей ксерофитные признаки проявляются сильнее, чем у липы кавказской, что можно отнести к видовым особенностям пород и их экологическим типам.

Таблица 2. Некоторые показатели порослевых побегов водного режима робинии лжеакалии и липы кавказской

Возраст дерева	Число порос- лей, шт.	Содержание форм воды, % на сырой вес						Водный дефицит, % на сырой вес		Интенсив- ность транс- пирации, мг/ сыр. вес. ч.	
Диаметр		общей		свободной		связанной					
пня, см		робинии	липы	робинии	липы	робинии	липы	робинии	липы	робинии	липы
21	1	76,0	66,6	42,0	35,4	34,0	31,2	3,2	9,3	1482	210
	3	65,0	64,5	34,3	31,8	30,7	32,7	7,4	9,9	1538	328
11-20	5	59,5	64,3	32,0	31,7	27,5	32,6	7,8	10,7	2410	437
31	1	76,5	65,7	41,7	34,2	34,8	31,5	3,2	10,8	2041	369
	3	74,2	64,0	39,4	32,7	34,8	31,3	4,3	11,4	2143	408
21-30	5	69,2	60,5	35,6	30,7	33,6	29,8	5,6	12,5	2414	549
40	1	69,2	62,1	43,0	30,5	26,2	31,6	3,9	8,1	1678	178
	3	64,9	61,2	40,1	29,9	24,8	31,2	4,2	8,6	2195	217
31-40	5	63,2	61,1	36,3	30,0	26,9	31,1	6,1	9,8	3056	342

Более точное представление о содержании воды в растении дает изучение ее фракционного состава. Содержание свободной воды в листьях робинии лжеакалии было больше, чем у липы кавказской. Эта закономерность сохранялась независимо от возраста деревьев; увеличение числа порослевых побегов приводит к значительному уменьшению содержания свободной воды. И в этом случае у ксерофитной робинии лжеакалии количественное уменьшение этой формы воды больше выражено, чем у липы кавказской, у которой в 40-летнем возрасте этого спада практически не наблюдается. На основании данных о фракционном составе воды в листьях порослевых побегов пней 40-летних деревьев можно предположить, что у робинии лжеакалии в этот период жизни явно выражено корне-лиственное несоответствие, тогда как липа кавказская в этом отношении находится в более удовлетворительном состоянии.

Что касается количественного изменения связанной воды, то здесь получена весьма пестрая картина. У однопорослевых побегов пней 21-летних деревьев содержание связанной воды было выше у робинии лжеакации. Эта закономерность сохранялась и у 31-летних особей при всех порослевых нагрузках, тогда как в остальных вариантах опыта содержание связанной воды превалировало у липы кавказской, у которой, как и в случае свободной воды, при всех нагрузках выявлено одинаковое количество связанной воды. Это обстоятельство можно объяснить тем, что при высокой интенсивности фотосинтеза часть воды переходит в связанную форму, что свидетельствует о более активной ассимиляционной деятельности листьев [1]. Следовательно, можно полагать, что при увеличении порослевой нагрузки в сочетании с нарастанием общей листовой поверхности интенсивность содержания CO_2 несомненно падает, что влечет за собой уменьшение связанной воды.

Иная картина наблюдается у липы кавказской. В 21-летнем возрасте количество связанной воды возрастает, в 31-летнем — убывает, а в 40-летнем выравнивается независимо от числа порослей.

Полученные данные еще не отражают внутренней природы водного режима подопытных растений. Более полное представление о ней можно получить при изучении соотношения свободной и связанной воды в листьях, в определенной мере обуславливающего активность физиологических процессов [6]. Расчеты показали, что это соотношение выше у робинии лжеакации, в 40-летнем возрасте оно возрастает, тогда как у липы наблюдается обратная закономерность. Увеличение порослевой нагрузки в этом возрасте сопровождается резким снижением соотношения свободной и связанной воды в листьях робинии лжеакации, у липы кавказской указанный показатель не меняется, вероятно, вследствие одинакового содержания свободной и связанной воды в листьях порослей независимо от их числа на пне. По-видимому, в 40-летнем возрасте корнеобеспеченность в расчете на один порослевой побег одинаковая.

Данные о содержании различных форм воды в листьях приводят к выводу, что в наилучшем физиологическом состоянии робиния лжеакация находится в 31-летнем возрасте, а липа кавказская — в 40-летнем.

Экологический тип растений оставляет свой отпечаток на водном дефиците листьев. У ксерофитной породы робинии лжеакации последний в 1,5-3 раза меньше по сравнению с мезофитной липой кавказской. Что касается возрастной зависимости этого показателя, то она неодинакова у указанных пород. У робинии лжеакации водный дефицит уменьшается в 31-летнем возрасте, а в 40-летнем он увеличивается, тогда как у липы кавказской наблюдается обратная закономерность.

Таким образом, можно предположить, что существует прямая связь между соотношением свободной и связанной воды и водным дефицитом. Параллельно увеличению числа порослей водный дефицит листьев робинии лжеакации в 40-летнем возрасте повышается более высокими темпами. У липы же в этот период жизни разница в водном дефиците подопытных

растений в зависимости от порослевой нагрузки уменьшается.

Одной из характерных особенностей водного режима является интенсивность транспирации листьев. Она несравненно выше у робинии лжеакалии, что объясняется ксерофитностью данной породы. В возрастном аспекте величина интенсивности транспирации зависела от числа порослей на пне. Однопорослевые побеги робинии лжеакалии наиболее интенсивно транспирируют в 31-летнем возрасте, три- и пятипорослевые побеги — в 40-летнем, у липы же интенсивность транспирации выше в 31-летнем возрасте независимо от числа порослей на пне по сравнению с пнями 21- и 40-летних деревьев.

Анализ полученных данных показал, что существует некоторая связь между интенсивностью транспирации и водным дефицитом, в частности повышение первой усиливает второй, и наоборот.

Таким образом, в одинаковых условиях зеленого кольца г.Еревана порослевые побеги древесных различных экологических групп формируют неодинаковую листовую массу, независимо от порослевой нагрузки и возраста этот показатель выше у липы кавказской.

Данные о водном режиме пней указанных пород приводят к выводу, что при порослевом возобновлении у робинии лжеакалии высокая физиологическая активность листьев проявляется в 31-летнем возрасте, а у липы кавказской - в 40-летнем. Вероятно, у каждой из этих пород в определенном возрасте имеет место наибольшее соответствие корневой системы листовой массе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гусев А.Н. Состояние воды в растении. 134, М., Наука, 1974.
2. Казарян В.О., Махатадзе Л.Б. Научн. тр. (Ер.гос.ун.) Сер. биол. наук, 49, 5, 1955б.
3. Казарян В.О. Старение высших растений. 314, М., Наука, 1969.
4. Казарян В.О., Хуршудян П.А., Габриелян В.Г. О физиологической природе раннего затухания роста и старения порослевых древостоев. 154-171, Изд. Мецниереба, Тбилиси, 1974.
5. Ничипорович А.А., Строганова Л.Е., Чмора С.Н., Власова М.П. Фотосинтетическая деятельность растений в посевах. 136, Изд.АН СССР, М., 1961.
6. Петин Н.С. Физиология орошаемой пшеницы. М., Изд-во АН СССР, 1959.
7. Пильщикова Н.В. В кн: Практикум по физиологии растений, 35-52, М., Колос, 1972.
8. Сказкин Г.Д., Ловчинская Е.И., Миллер М.С., Аникиев В.В. Практикум по физиологии растений. 338, М., Советская наука, 1958.

КОНТАКТНАЯ СТИМУЛЯЦИЯ РАЗМНОЖЕНИЯ ГОМОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК В КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Г.Г. ГАСПАРЯН*, Р.М. ГРИГОРЯН*, Н.К. САРКИСЯН*, А.В. САЯДЯН*,
Э.Ю. ДАБАГЯН**, В.Т. МОВСЕСЯН**

*Институт зоологии НАН Армении, **НИИ биотехнологии, 375014, Ереван

Исследовано описанное нами ранее явление контактной стимуляции клеточного размножения в культурах эмбриональных клеток крысы и человека. Показано, что добавление гомологичных клеток, живых или фиксированных, активирует пролиферацию клеток в сложившихся культурах. Предполагается, что регуляция размножения клеток путем их контактного взаимодействия относится к универсальным и консервативным в эволюционном отношении явлениям.

Լստմանսիրվել է մախկինում մեր կողմից նկարագրված բջջային բազմացման կոնտակտային խթանման երևույթը անենտի և մարդու սաղմնային բջջերի կուլտուրայում: Բացահայտվել է, որ կենդանի կամ ֆիքսված հոմոլոգ բջջերի ավելացումը ակտիվացնում է բջջերի պրոլիֆերացիան ծավալորված կուլտուրայում: Ենթադրվում է, որ բջջերի բազմացման կարգավորումը կոնտակտային փոխազդեցության ճանապարհով վերաբերում է էվոլյուցիոն տեսակետից ունիվերսալ և կոնսերվատիվ երևույթներին:

The phenomenon of contact stimulation of cell proliferation described earlier was studied in cultures of rat and human embryo cells. Adding of living or fixed cells were shown to activate the cell growth in built-up cultures. It is proposed that the cell growth regulation mediated by cell contact interactions is one of universal and evolutionary conservative phenomena.

Культуры клеток млекопитающих - стимуляция размножения - межклеточные контакты

В исследованиях, выполненных на культуре клеток куриного эмбриона, нами было обнаружено не описанное ранее явление контактной стимуляции пролиферации гомологичных клеток. Было показано, что добавление живых или инактивированных гомологичных клеток ускоряет размножение клеток в субконфлуентных культурах [1], а в культурах низкой плотности способствует выживанию и формированию клеточных колоний [3, 10]. Была выявлена контактная природа митогенных взаимодействий между добавленными и резидентными клетками [9] и высказано предположение о возможном пути передачи митогенного сигнала от клетки к клетке при их непосредственном физическом контакте [2].

В то же время оставался без ответа вопрос о видоспецифичности обнаруженного феномена. Иначе говоря, было неясно, осуществляется ли он только в популяциях клеток птиц или же характерен также для клеток других организмов. Для ответа на поставленный вопрос мы проследили кинетику клеточной пролиферации в культурах эмбриональных клеток крысы и человека. Клетки содержали в тех же условиях, в которых осуществлялась контактная стимуляция клеточного размножения в культуре клеток куриного эмбриона [9].

Материал и методика. Первичную культуру клеток 18-19-дневных крысиных эмбрионов содержали в среде DMEM (Gibco) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Serva). Клетки пересеивали в пенициллиновые флаконы с кусочком покровного стекла на дне и в стеклянные культуральные матрасы в концентрации $0,2 \times 10^6$ кл/мл. Через 4 сут после начала эксперимента (0 ч) в трети флаконов меняли старую питательную среду на свежую, в другую треть флаконов выносили по $0,15 \times 10^6$ гомологичных живых клеток из матраса в минимальном объеме среды без сыворотки, а в оставшиеся флаконы добавляли такое же число клеток, фиксированных 96%-ным этанолом. Фиксацию проводили в течение 20 мин с последующей трехкратной отмывкой клеток средой, механическим соскабливанием их с субстрата и ресуспендированием в среде без сыворотки. Скорость клеточной пролиферации оценивали по включению радиоактивного предшественника ДНК в клетки, для чего начиная с 12 и до 24 ч каждые 4 ч культуры инкубировали с ^3H -тимидином в конечной концентрации 0,2 мКи/мл. Покровные стекла с культурами фиксировали смесью этанол: уксусная кислота (3:1), покрывали ядерной эмульсией Ilford-L4 и готовили радиоавтографические препараты по общепринятой методике [5]. Подсчитывали индекс меченых клеток в процентах из 1000 клеток в 4-5 культурах на каждый срок.

Клетки эмбриона человека штамма М-22 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов МЗ РФ, Москва) на 20-м пассаже культивировали в среде BME (Sigma) с 10% бычьей сыворотки в пластиковых культуральных платах с кусочком покровного стекла на дне либо в матрасах. Клетки высевали в концентрации $0,1 \times 10^6$ кл/мл (по 2 мл на лунку) и культивировали 3 суток. К этому времени (0 ч) в часть лунок дополнительно вносили по $0,2 \times 10^6$ гомологичных клеток. С 12 по 36 ч каждые 4 ч повторно инокулированные и интактные (контроль) культуры инкубировали с ^3H -тимидином. Остальные процедуры были аналогичны описанным выше.

Результаты и обсуждение. В культуре клеток крысиного эмбриона смена питательной среды стимулировала размножение клеток (рис.1 А). Такое же действие оказывало добавление живых (рис.1 Б) и фиксированных этанолом (рис.1 В) клеток. Различия между значениями индекса меченых клеток в интактной культуре и в стимулированных культурах через 20 ч были достоверными во всех вариантах опыта ($p < 0,05$). Кинетика стимулированной клеточной пролиферации не зависела от способа митогенного воздействия: во всех случаях возрастание числа ДНК-синтезирующих клеток начиналось с 16 ч и достигало максимума к 20 ч, после чего индекс меченых клеток снижался. Такая хронология событий, судя по литературным данным, характерна для стимуляции синтеза ДНК в культурах фибробластоподобных клеток крысы (см., напр., [14])

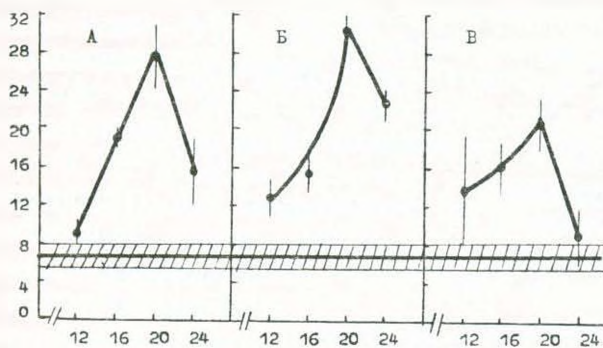


Рис. 1. Скорость клеточной пролиферации в культуре клеток эмбриона крысы после смены питательной среды (А), добавления живых (Б) и фиксированных этанолом (В) клеток.

По оси абсцисс - время после начала эксперимента ч, по оси ординат - индекс меченых клеток, %.

В интактной культуре клеток М-22 за время наблюдений происходило постепенное уменьшение пролиферативной активности клеток (рис.2), что свидетельствует о переходе культуры из логарифмической в стационарную фазу роста. Добавление экзогенных гомологичных клеток временно ускоряло

клеточное размножение: число меченых клеток возрастало с 12 до 28 ч, а затем снижалось. Известно, что длительность пререпликативного периода (временной интервал от начала стимуляции до увеличения числа ДНК-синтезирующих клеток) в культуре клеток эмбриона человека составляет 10-12 ч, а пик стимулированного синтеза ДНК приходится на 22-26 ч [4, 8], что близко к полученным результатам.

Отметим, что в последнем опыте, как и в одном из вариантов описанного выше эксперимента (рис.1 Б), ускорение роста клеток происходило одновременно с повышением плотности клеточной популяции, так как известно, что значительная часть добавляемых к сформированной культуре живых клеток прикрепляется к свободному субстрату и поверхности резидентных клеток [7, 9].

Изложенные результаты говорят о том, что инокуляция гомологичных клеток, как живых, так и фиксированных этанолом, в сформированные культуры клеток млекопитающих (крысы и человека) стимулирует клеточную пролиферацию.

Согласно широко распространенным представлениям, гуморальные (растворимые) продукты клеточного метаболизма могут быть как стимуляторами, так и ингибиторами размножения клеток, тогда как за межклеточными контактами признается роль только негативного регулятора, блокирующего клеточную пролиферацию [11]. Следует отметить, что недавние исследования, выявившие феномен так называемой юкстакринной (juxtacrine) стимуляции роста клеток [6] и сигнально-рецепторные свойства молекул межклеточной адгезии [16], не поддерживают последнее утверждение и свидетельствуют о возможности эффективной передачи от клетки к клетке митогенных сигналов посредством нерастворимых молекул, иммобилизованных на клеточной поверхности. О том же говорят результаты цитированных выше наших работ - прямое свидетельство ростстимулирующих контактных взаимодействий между соседними клетками.

Итак, показано, что контактная стимуляция размножения гомологичных клеток не является видоспецифичным феноменом, она осуществляется в культурах клеток не только птиц, но и млекопитающих.

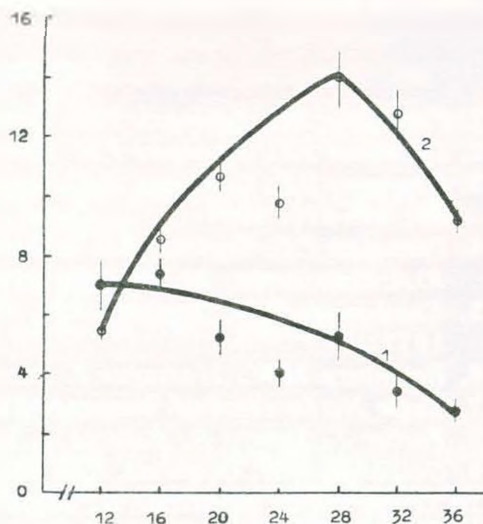


Рис.2. Скорость клеточной пролиферации в интактной культуре клеток эмбриона человека (кр.1) и после добавления в культуру гомологичных клеток (кр.2).

Обозначения по осям те же, что на рис.1.

Возможно, что механизм ускорения роста клеток с участием межклеточных контактных взаимодействий относится к таким универсальным и консервативным в эволюционном отношении явлениям, как известные пути межклеточной коммуникации [12] и сигнальные системы контроля клеточной пролиферации [13], выживания и гибели клеток [15]. Дальнейшие исследования с использованием широкого круга биологических объектов позволят проверить высказанное предположение.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаспарян Г.Г., Григорян Р.М. Цитология, 31, 97-600, 1990.
2. Гаспарян Г.Г., Григорян Р.М. Цитология, 35, 65-69, 1993.
3. Гаспарян Г.Г., Саркисян Н.К., Саядян А.В., Григорян Р.М. Цитология, 39, 566-570, 1997.
4. Гаспарян Г.Г., Терских В.В., Зосимовская А.М., Закарян Г.Г., Магакян Ю.А. Цитология, 22, 684-688, 1980.
5. Енифанова О.И., Терских В.В., Захаров А.Ф. Радиоавтография. М., 1977.
6. Rosenberg M.W., Massague J. Curr.Opin.Cell Biol., 5, 832-838, 1993.
7. Eagle H., Levine E.M. Nature, 123, 1102-1106, 1967.
8. Farber J., Rovera S., Baserga R. Biochem.J., 122, 189-195, 1971.
9. Gasparian G.H., Grigorian R.M. Acta Biol.Hung., 41, 373-385, 1990.
10. Gasparian G., Sarkissian N., Sayadian A., Grigorian R. Cell Biol.Int., 22, 51-53, 1998.
11. Gradl G., Faust D., Oesch F., Wieser R.J. Curr.Biol., 5, 526-535, 1995.
12. Le Roith D., Shiloach J., Berelowitz M., Frohman L.A., Liotta A.S. Krieger D.T., Roth J. Fed.Proc., 42, 2602-2607, 1983.
13. Nurse P. Nature, 344, 503-508, 1990.
14. Okuda A., Kimura G. J. Cell Physiol., 110, 267-270, 1982.
15. Raff M.S. Nature., 356, 397-400, 1992.
16. Ruoslahti E., Obrink B. Exper.Cell Res., 227, 1-11, 1997.

Поступила 13.II.1998

Համառոտ հաղորդումներ • Краткие сообщения • Short communications

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 579.22/23:631.461.5

ԱՁՈՏՖԻՔՍՈՂ ՆՈՐ ԲԱՑԻԼՆԵՐ ՀԱՅԱՋԳԻՆԵՐԻ ԱՐՄԱՏԱՅԻՆ
ՀԱՍՏԱԿԱՐԳՈՒՄ

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ

77 ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք.Արմվյան

Բացիլներ - ռիզոսֆերա - ռիզոպլան - ցորեն - գարի

Նախկինում մեր կողմից ներկայացվել էր Հայաստանի պայմաններում մշակվող ցորենի և գարու արմատային համակարգում և հողերում զարգացող մի շարք ազոտֆիքսող նոր բացիլների տեսակային կազմը [4]: Սակայն հացազգիների արմատային համակարգից մեկուսացված տարբեր դիազոտրոֆների խառը կուլտուրաներից հետազայում մեզ հաջողվեց մեկուսացնել կապսուլա առաջացնող ազոտֆիքսող բացիլների ևս չորս կուլտուրաներ, որոնք իրենց մորֆո-ֆիզիոլոգիական որոշ հատկանիշներով զգալիորեն տարբերվել են մինչ այժմ հայտնի ազոտֆիքսող բացիլներից [2, 6, 9]: Առանձնապես կարևոր է նշել, որ ներկայացված բացիլների խառը կուլտուրաների ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությունը լաբորատոր պայմաններում 5-6 տարի պահպանման ընթացքում մնացել է հաստատուն: Տարբեր բացիլների խառը կուլտուրաների ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվության վերաբերյալ տեղեկություններ վերջերս բերվել են նաև մի շարք այլ հեղինակների կողմից [1, 5]:

Ներկա աշխատանքում բերված են մեր կողմից մեկուսացված վերոհիշյալ կուլտուրաների մորֆո-ֆիզիոլոգիական և քիմիական հիմնական առանձնահատկությունները:

Նյութ և մեթոդ: Աշխատանքում օգտագործվել են Հայաստանի նախալեռնային (Արմվյան, Աշտարակ) շրջաններում մշակվող գարու ռիզոսֆերայից նախկինում մեր կողմից մեկուսացված *Bacillus* A42B-1, A42B-2 ու ցորենի ռիզոպլանում զարգացող *Bacillus* A66B-2 և A66B-3 կուլտուրաները: Ներկայացված բակտերիաները համղեւ են եկել բույսերի արմատային համակարգի ազոտֆիքսող մանրէների բարդ համակենցությունների կազմում: Ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ օժտված են նաև նրանց լաբորատոր պայմաններում 5-6 տարի պահպանված մաքուր կուլտուրաները: Անագոտ ազարային սննդամիջավայրերում զարգանալիս իրենց կապսուլա առաջացնելու հատկությամբ ուսումնասիրված ազոտֆիքսող բացիլները հեշտությամբ տարբերվում են այլ մանրէներից:

Կուլտուրաների իդենտիֆիկացիայի համար Բերգեի [6] որոշիչից բացի օգտագործվել են նաև այլ հեղինակների աշխատանքները [7-9]: Ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը էջի-ի և Վինոգրադսկու միջավայրերում որոշվել է ացետիլենային եղանակով, որի մեթոդական մասը մեր կողմից ներկայացվել

է նախկինում [3]: Փորձերի ընթացքում վերոհիշյալ կուլտուրաներից բացի օգտագործվել է *Azotobacter chroococcum* B-6111 շտամը (Մանրէների Ավանդադրման Հանրապետական Կենտրոն):

Արդյունքներ և քննարկում: Փորձերը ցույց տվեցին, որ ցորենի ու գարու արմատային համակարգից մեկուսացված վերոհիշյալ չորս ազոտֆիքսող բացիլները (բնորոշ կուլտուրան - *Bacillus sp.* A66B-3) ֆակուլտատիվ անաէրոբներ են, առաջացնում են կապսուլա, սպիտակուցային սննդամիջավայրերում չեն զարգանում, կաթը փոփոխության չեն ենթարկում, օգտագործում են հանքային ազոտը: Անագոտ էլեկտիվ սննդավայրերում միմիմալ և մաքսիմալ աճը տատանվում է 8-15 և 36-40°-ի սահմաններում:

Ինչպես *Bacillus sp.* A66B-3-ը, այնպես էլ մնացած երեք կուլտուրաները մթնոլորտի ազոտը ֆիքսում են թե աէրոբ, և թե միկրոաէրոֆիլ պայմաններում: Իրենց այդ հատկությամբ ուսումնասիրված կուլտուրաները հիմնովին տարբերվել են տաքսոնոմիական հատկանիշներով համեմատաբար մոտ գտնվող *B.polymyxa*, *B.macerans* և Սելդինի նկարագրած *B.azotofixans* [9] տեսակներից, որոնք ազոտ են ֆիքսում միայն անաէրոբ պայմաններում: Բերվածից բացի նկարագրված կուլտուրաները հայտնի ազոտֆիքսող բացիլներից տարբերվել են նաև ոչ պակաս երեք այլ հատկանիշներով (աղ. 1):

Աղյուսակ 1. Ազոտֆիքսող բացիլների հիմնական տարբերակիչ հատկանիշները

Հատկանիշներ		<i>Bacillus sp.</i> A66B-3	<i>Bacillus</i> <i>azotofixans</i>	<i>Bacillus</i> <i>polymyxa</i>	<i>Bacillus</i> <i>macerans</i>
Ազոտը ֆիքսում են	անաէրոբ և միկրոաէրոֆիլ պայմաններում	+	+	+	+
	աէրոբ պայմաններում	+	-	-	-
Սպորի առաջացումը		T (CT)	II-CT	II-T	CT-T
Զարգացումը pH 5-ում		+	0	+	-
Թթվի առաջացումը	արևաքինոզից	+	-	+	+
	գլյուկոզից	+	-	+	+
Ցիտրատի օգտագործումը		-	0	-	x
Ֆոզես-Պրոսկաուերի ռեակցիան		-	+	+	-
Նիտրատների վերականգնումը		-	-	+	+
Օսլայի հիդրոլիզը		+	OC	+	+
Կազեինի տարալուծումը		-	-	+	-
Ժելատինի տարալուծումը		-	-	+	-
Դիհիդրոքսիացետոնի առաջացումը		-	-	+	-
Աճը	45°-ում	-	-	-	+
	2% NaCl-ում	-	BP	BP	BP

Ճանաչություն: II - կենտրոնում, T - տերմինալ, CT - սուբտերմինալ, x - ոչ բոլոր շտամները, OC - շատ բույլ, BP - փոփոխական, 0 - տվյալներ չկան:

Bacillus sp. A66B-3-ի բջիջները յուրահատուկ չարժվող (մասամբ *Azospirillum*-ը հիշեցնող) 2,5-55 x 0,6-0,7 μ մեծության ծողեր են, սպորները - 1,2-2 x 0,8-1,1 μ , սպորանգիոն զգալիորեն հաստացնում է բջիջը: Զարգացման ընթացքում հաճախ առաջացնում է ցայտուն ձևով արտահայտված կապսուլայի հաստ շերտ, որով մասամբ նմանվում է *B.polymyxa* և *B.azotofixans*

տեսակներին [6, 9]:

Էջրի-ի ազարային սննդամիջավայրում առաջացնում է 3-5 մմ մեծության կլոր, ուռուցիկ, հարթ նակերեսով ու եզրերով, սպիտակավուն, փայլուն գաղութներ, որոնք հաճախ գաղութի տրամագծի չափով տարալուծում են կավիճը: GB սննդավայրում [8] գաղութները 1-3 մմ մեծության են, կլորավուն կամ քիչ ալիքավոր եզրերով, թափանցիկ, փայլուն, ակտիվորեն տարալուծում են կավիճը:

Հետագա ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ փորձարկված ազոտֆիքսող բացիլների չորս կուլտուրաները, անագոտ տարբեր սննդամիջավայրերում զարգանալիս, աերոբ պայմաններում միկրոաերոֆիլ պայմանների համեմատ ավելի շատ ազոտ են ֆիքսել (աղ. 2): Բացի այդ, նրանք երբեմն շատ ազոտ են ֆիքսել նույնիսկ *Azotobacter*-ի համեմատ, միկրոաերոֆիլ պայմաններում զարգանալիս:

Աղյուսակ 2. Ազոտֆիքսող բացիլների ազոտֆիքսացիան տարբեր սննդամիջավայրերում

Կուլտուրաներ	Սննդամիջավայրեր		Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը, մգ/4 օրում
<i>Bacillus sp.</i> A42B-1	Էջրի	ազարային	0,10
		հեղուկ	0,06
<i>Bacillus sp.</i> A42B-2		ազարային	0,08
		հեղուկ	0,04
<i>Bacillus sp.</i> A66B-2		ազարային	0,07
		հեղուկ	0,05
<i>Bacillus sp.</i> A66B-3		ազարային	0,10
		հեղուկ	0,08
<i>Azotobacter chroococcum</i> -6111	Վինո-գրադսկու	ազարային	0,20
		հեղուկ	0,06
<i>Bacillus sp.</i> A42B-1		ազարային	0,12
		հեղուկ	0,10
<i>Bacillus sp.</i> A42B-2		ազարային	0,10
		հեղուկ	0,06
<i>Bacillus sp.</i> A66B-2		ազարային	0,11
		հեղուկ	0,11
<i>Bacillus sp.</i> A66B-3		ազարային	0,14
		հեղուկ	0,12
<i>Azotobacter chroococcum</i> -6111		ազարային	0,70
		հեղուկ	0,10

Կատարված ուսումնասիրություններից կարելի է հետևեցնել, որ կապսուլա առաջացնող փորձարկված ազոտֆիքսող բացիլները ֆիզիոլոգա-կենսաքիմիական մի շարք առանձնահատկություններով և հատկապես աերոբ պայմաններում ազոտի ֆիքսման ունակությամբ մինչ այժմ հայտնի ազոտֆիքսող բացիլների մեջ իրենց համանմանը չունեն: Փորձարկված կուլտուրաները նկարագրվել են որպես ցորենի ու գարու արմատային համակարգում զարգացող նոր տեսակի ազոտֆիքսող բացիլների

ներկայացուցիչներ:

Արդյունք և միկրոօրգանիզմի պայմաններում ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվության շնորհիվ, նկարագրված բացիլները հանդես գալով ազոտֆիքսող մանրէների բարդ համակեցությունների կազմում, հավանաբար մեծ չափով նպաստում են բույսերի ազոտի սննդառությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Глаголева О.Б., Умаров М.М., Злотников А.К. Микробиология, 63, 2, 221-227, 1994.
2. Мишустин Е.М., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота, М., 1968.
3. Никогосян В.Г. Биол. журн. Армении, 34, 3, 269-274, 1981.
4. Никогосян В.Г. Биол. журн. Армении, 43, 3-4, 74-75, 1995.
5. Умаров М.М., Шабиев В.П., Смолин В.Ю., Мамедов Н.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co, Baltimore, London, Los-Angeles, Sydney, 2, 1986.
7. Larson R., Neal J. Soil Biol. Biochem. 8, 151-155, 1976.
8. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. Plant and Soil, 70, 2, 243-255, 1983.
9. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 4, 451-456, 1984.

Поступила 24.XI.1999

Биол. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 579.64:58.071

ՏԱՐԲԵՐ ՂԻԱԶՈՏՐՈՑՆԵՐԻ ՓՈԽՅԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅԱՆ ՈՒ ԱԶՈՏԻ ՖԻՔՍՄԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Վ.Գ. ՆԻԿՈԴՈՍՅԱՆ, Ս.Ե. ԲԱԴԴԱՍԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱՄ Սիկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 376510, ք. Արմավիր

Ազոտֆիքսացիա - դիազոտրոֆներ - Azotobacter - Bacillus - Klebsiella

Վերջին տարիներս շատ հետազոտողների ուշադրությանն են արժանացել տարբեր դիազոտրոֆների խառը կուլտուրաները, որոնք մեծ դեր են խաղում բնական էկոսիստեմների ազոտի բալանսում և ոչ թիքեռնածաղկավոր բույսերի ազոտային սննդառության գործում: Ցույց է տրված, որ բույսերի աճեցողության վրա առավել էֆեկտիվ են ներգործում ինչպես տարբեր դիազոտրոֆների արհեստական խառնուրդները [1,14], այնպես էլ, բնական պայմաններում զարգացող ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունները [9,10]:

ներկայացուցիչներ:

Արդյունք և միկրոօրգանիզմի պայմաններում ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվության շնորհիվ, նկարագրված բացիլները հանդես գալով ազոտֆիքսող մանրէների բարդ համակեցությունների կազմում, հավանաբար մեծ չափով նպաստում են բույսերի ազոտի սննդառությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Глаголева О.Б., Умаров М.М., Злотников А.К. Микробиология, 63, 2, 221-227, 1994.
2. Мишустин Е.М., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота, М., 1968.
3. Никогосян В.Г. Биол. журн. Армении, 34, 3, 269-274, 1981.
4. Никогосян В.Г. Биол. журн. Армении, 43, 3-4, 74-75, 1995.
5. Умаров М.М., Шабиев В.П., Смолин В.Ю., Мамедов Н.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
6. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Co, Baltimore, London, Los-Angeles, Sydney, 2, 1986.
7. Larson R., Neal J. Soil Biol. Biochem. 8, 151-155, 1976.
8. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. Plant and Soil, 70, 2, 243-255, 1983.
9. Seldin L., Van Elsas J.D., Penido Elisa G.G. International Journal of Systematic Bacteriology, 34, 4, 451-456, 1984.

Поступила 24.XI.1999

Биол. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 579.64:58.071

ՏԱՐԲԵՐ ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐԻ ՓՈԽՅԱՐԱԲԵՐՈՒԹՅԱՆ ՈՒ ԱԶՈՏԻ ՖԻՔՍՄԱՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՄԱՍԻՆ

Վ.Գ. ՆԻԿՈԴՈՍՅԱՆ, Ի.Ե. ԲԱԴԴԱՍԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱՄ Սիկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 376510, ք. Արմավիր

Ազոտֆիքսացիա - դիազոտրոֆներ - Azotobacter - Bacillus - Klebsiella

Վերջին տարիներս շատ հետազոտողների ուշադրությանն են արժանացել տարբեր դիազոտրոֆների խառը կուլտուրաները, որոնք մեծ դեր են խաղում բնական էկոսիստեմների ազոտի բալանսում և ոչ թիթեռնածաղկավոր բույսերի ազոտային սննդառության գործում: Ցույց է տրված, որ բույսերի աճեցողության վրա առավել էֆեկտիվ են ներգործում ինչպես տարբեր դիազոտրոֆների արհեստական խառնուրդները [1,14], այնպես էլ, բնական պայմաններում զարգացող ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունները [9,10]:

Ոչ բիոբեռնաձաղկավոր բույսերի ազոտային սննդառության պրոբլեմի արդյունավետ լուծման համար, մեր կարծիքով առաջին հերթին անհրաժեշտ է խորությամբ ուսումնասիրել և ճանաչել արմատային զոնայում զարգացող ազոտֆիքսող մանրէներն ու նրանց բարդ համակեցությունները, որոնք, ինչպես հաստատվել է նաև այլ հեղինակների կողմից [3,9], շատ քիչ են ուսումնասիրված:

Սույն հաղորդումը նվիրված է տարբեր դիազոտրոֆների փոխհարաբերության, ազոտի ֆիքսման ակտիվության, ինչպես նաև գարու արմատային զոնայում զարգացող ազոտֆիքսող մանրէների մի համակեցության ուսումնասիրմանը:

Նյութ և մեթոդ. Փորձարկվել են տարբեր ջրերից ու հողերից մեր կողմից նախկինում մեկուսացված և տեսակավորված դիազոտրոֆներն ու *Azotobacter chroococcum*-ի ստրեպտոմիցինադիմացկուն (C6) և տետրացիկլինադիմացկուն (T25) մուտանտները: Ուսումնասիրվել է նաև գարու ռիզոսֆերայից 1989 թ. մեկուսացված A42 ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունը (ՍՄ3), որը մեկուսացման առաջին տարին օժտված է եղել ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ և նպաստել է ցորենի սերմերի աճեցողությանը: Փորձերի ընթացքում վերոհիշյալից բացի օգտագործվել է *A.chroococcum*-ն ՍԽԱ B-6111 (ՄԱՅԿ, Հայաստանի Հանրապետություն) շտամը:

ՍՄ3-ում զարգացող դիազոտրոֆների և նրանց ուղեկցող մանրէների հայտնաբերման համար փորձարկվել են էշբի-ի, Չապեկ-ի և ՄՊԱ սննդամիջավայրերը, իսկ ազոտֆիքսող բացիլների տաքսոնոմիական պատկանելիության որոշման նպատակով օգտագործվել է նաև GB սննդամիջավայրը [15]:

Մանրէների փոխհարաբերության բնույթն ուսումնասիրվել է Կինոգրադսկու [5] հեղուկ սննդամիջավայրում կուլտուրաների համատեղ զարգացման պայմաններում: Այդ նպատակով 3 մլ սննդամիջավայր պարունակող, 15 մլ տարողության պենիցիլինի սրվակները վարակվել են ՍՄ3-ում զարգացող 1-5 տարբեր մանրէներով և զարգացման ընթացքում պարբերաբար որոշվել են նրանց ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը:

Կուլտուրաների իդենտիֆիկացիայի համար օգտագործվել են Բերգեի [11,12] որոշիչները: Ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը որոշվել է ագետիլենային եղանակով, որի մեթոդական մասը մեր կողմից ներկայացվել է նախկինում [4]: Ստացված տվյալները ենթարկվել են վիճակագրական մշակման [8]:

Արդյունքներ և քննարկում: Ուսումնասիրությունների սկզբնական շրջանում մեզ հետաքրքրել է պարզել ոչ սիմբիոտիկ տարբեր ազոտֆիքսատորների փոխհարաբերության բնույթն ու ազոտֆիքսացիան համատեղ զարգացման պայմաններում: Այդ նպատակով ստացվել են կարգաբանական տարբեր խմբերի, ցեղերի ու տեսակների պատկանող դիազոտրոֆների բազմազան արհեստական խառնուրդներ և փորձարկվել նրանց զարգացումն ու ազոտֆիքսացիան առանձին և համատեղ զարգացման պայմաններում: Փորձերից պարզվել է, որ ուսումնասիրված շուրջ 30 արհեստական խառնուրդներից փոխադարձ զարգացման որոշակի խթանում և ազոտի ֆիքսման բարձր ակտիվություն ցուցաբերել են *A.chroococcum* B-6111, *Bacillus* sp. 8 և *Klebsiella* sp. 56 կուլտուրաները համատեղ զարգացման պայմաններում (աղ. 1): Այդ օրինաչափությունը պահպանվել է նաև *A.chroococcum*-ի անտիբիոտիկադիմացկուն մուտանտների փորձարկման դեպքում:

Հետագա ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ գարու ռիզոսֆերայից նախկինում մեկուսացված A42 ՍՄ3-ն ևս բաղկացած է *Azotobacter*, *Bacillus* և *Klebsiella* ցեղերին պատկանող երեք դիազոտրոֆներից, ինչպես նաև նրանց ուղեկցող երկու այլ բակտերիաներից: Համակեցությունում

Աղյուսակ 1. Տարբեր դիագնոստիկայի մաքուր և խառը կուլտուրաների ազոտֆիքսացիան (արհեստական խառնուրդներ)

Փորձի տարբերակները	Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը մգ/9 օրում
<i>Azotobacter chroococcum</i> B-6111	0,42±0,01
<i>Bacillus</i> sp. 8a	0,15±0,00
<i>Klebsiella</i> sp. 56b	0,30±0,02
<i>A. chroococcum</i> B-6111+ <i>Bacillus</i> sp. 8	0,58±0,01
<i>A. chroococcum</i> B-6111+ <i>Bacillus</i> sp. 56	0,47±0,00
<i>A. chroococcum</i> B-6111+ <i>Bacillus</i> sp. 8+ <i>Klebsiella</i> sp. 56	0,72±0,02
<i>A. chroococcum</i> C6	0,36±0,01
<i>A. chroococcum</i> C6+ <i>Bacillus</i> sp. 8	0,28±0,00
<i>A. chroococcum</i> C6+ <i>Klebsiella</i> sp. 56	0,42±0,01
<i>A. chroococcum</i> C6+ <i>Bacillus</i> sp. 8+ <i>Klebsiella</i> sp. 56	0,42±0,01
<i>A. chroococcum</i> T25	0,28±0,02
<i>A. chroococcum</i> T25+ <i>Bacillus</i> sp. 8	0,56±0,03
<i>A. chroococcum</i> T25+ <i>Klebsiella</i> sp. 56	0,46±0,02
<i>A. chroococcum</i> T25+ <i>Bacillus</i> sp. 8+ <i>Klebsiella</i> sp. 56	0,42±0,01

Օանոթաբյուր: a - մեկուսացվել է հողից, b - մեկուսացվել է ջրից:

զարգացող *Azotobacter*-ը իր մորֆոլոգիական ու ֆիզիոլոգա-բիոքիմիական առանձնահատկություններով մոտ է Բերգեի [11] որոշիչում նկարագրված *A. armeniacus* տեսակին, իսկ մյուս երկու դիագնոստիկայի զգալիորեն տարբերվել են այդ ցեղերին պատկանող մինչ այժմ հայտնի տեսակներից (աղ. 2):

Աղյուսակ 2. A42 ԱՄՅ-ն մաքուր և խառը կուլտուրաների ազոտֆիքսացիան

Փորձի տարբերակները	Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը մլ/15 օրում
<i>Azotobacter armeniacus</i>	0,43±0,01
<i>Bacillus</i> sp.	0,10±0,03
<i>Klebsiella</i> sp.	0,28±0,02
A42-10	0
A42-KM1	0
<i>A. armeniacus</i> + <i>Bacillus</i> sp.	0,51±0,01
<i>A. armeniacus</i> + <i>Klebsiella</i> sp.	0,47±0,03
<i>Bacillus</i> sp. + <i>Klebsiella</i> sp	0,38±0,02
<i>A. armeniacus</i> + <i>Bacillus</i> sp+ <i>Klebsiella</i> sp.	0,52±0,01
<i>A. armeniacus</i> + <i>Bacillus</i> sp+ <i>Klebsiella</i> sp+A42-10	0,62±0,02
<i>A. armeniacus</i> + <i>Bacillus</i> sp+ <i>Klebsiella</i> sp+A42-KM1	0,62±0,00
<i>A. armeniacus</i> +A42-10	0,52±0,01
<i>Bacillus</i> sp +A42-10	0,32±0,03
<i>Klebsiella</i> sp. +A42-10	0,32±0,02
<i>A. armeniacus</i> +A42-KM1	0,43±0,01
<i>Bacillus</i> sp. +A42-KM1	0,30±0,00
<i>Klebsiella</i> sp. +A42-KM1	0,32±0,01
<i>A. armeniacus</i> +A42-10+A42-KM1	0,50±0,02
<i>Bacillus</i> sp. +A42-10+A42-KM1	0,39±0,00
<i>Klebsiella</i> sp. +A42-10+A42-KM1	0,44±0,01

Հացազգիների արմատային համակարգում զարգացող *Azotobacter*-ի, *Bacillus*-ի և *Klebsiella*-ի առկայությունը հայտնի է տարբեր հեղինակների աշխատանքներից [2, 7, 13], սակայն պետք է նշել, որ այդ երեք

դիագնոստիկայից բաղկացած ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունների վերաբերյալ տվյալներ գրականության մեջ չեն հանդիպել:

Առանձնապես ուշագրավ է այն փաստը, որ այս փորձերում ևս համակեցությունում առկա վերոհիշյալ դիագնոստիկայի նիտրոգենազային ակտիվությունը համատեղ զարգացման պայմաններում ավելի բարձր է, քան առանձին զարգանալիս, մի երևույթ, որը նկատվել էր մեր սկզբնական ուսումնասիրություններում (աղ. 1): Ինչպես ցույց են տալիս աղ. 2-ում բերված տվյալները, առավել բարձր ակտիվություն նկատվել է համակեցության բոլոր դիագնոստիկայի և A42-10 կամ A42-KM1 ուղեկցող մանրէների համատեղ զարգացման դեպքերում: Հետևաբար դիագնոստիկայի ազոտֆիքսացիային նպաստել են նաև համակեցությունում զարգացող ուղեկցող մանրէները, որոնք ազոտ ֆիքսելու ունակ չեն:

Հայտնի է, որ ինչպես բոլոր էկոսիստեմները, այնպես էլ միկրոբային ցենոզներն ու այնտեղ առկա առանձին մանրէները, էվոլյուցիոն զարգացման ընթացքում ձևավորվել են բնական ընտրության ճանապարհով և անընդհատ փոփոխվում են: Նման ցենոզներում, որտեղ սովորաբար առկա են մեկ կամ մի քանի դոմինանտ տեսակներ, գործում են մանրէների յուրահատուկ փոխհարաբերության մեխանիզմներ [6]: A42 ԱՄՀ-ն վերոհիշյալ ուսումնասիրությունները փաստորեն հաստատում են այդ օրինաչափությունը, որտեղ զարգացող երեք դիագնոստիկայի և նրանց ուղեկցող երկու մանրէների փոխհարաբերությունն իր բնույթով հիշեցնում է պրոտոկոոպերացիա-կոմենսալիզմ տիպի փոխհարաբերությանը: Փորձերից պարզվել է նաև, որ լաբորատոր պայմաններում պահպանման վեց տարիների ընթացքում կատարված բազմակի վերացանքներից հետո փորձարկված A42 ԱՄՀ-ն տաքսոնոմիական կազմն ու ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը մնացել է անփոփոխ: Կարելի է հետևեցնել, որ զարգանալով գարու արմատային զոնայում ազոտֆիքսող մանրէների այդ համակեցությունը, շնորհիվ իր կայուն կազմի, դիմացկունության և ազոտի ֆիքսման մեծ ակտիվության կարող է զգալիորեն նպաստել բույսի աճեցողությանը:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Белимов А.А., Кожемяков А.П. Бюллетень ВНИИ с/х микробиологии, 51, 26-30, 1988.
2. Берестецкий О.А., Васюк Л.Т., Элисашвили Т.А. Микроорганизмы как компонент биогеоценоза. Материалы Всес. симпоз., 27-29 сент. 1982. Алма-Ата, 186-187, 1982.
3. Звягинцев Д.Г. Бюллетень ВНИИ с/х микробиологии, 42, 3-5, 1985.
4. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 3, 269-274, 1981.
5. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 27, 10, 886-888, 1984.
6. Одум Ю. Основы экологии, М., 1975.
7. Петренко Г.Я. В кн.: IX Междунар. микробиол. конгресс, Тезисы докл. М., 301, 1966.
8. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии, М., Изд. МГУ, 1233, 1986.
9. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация, М., Изд. Московск. ун-та, 132, 1986.

10. Умаров М.М., Шабает В.П., Смолин В.Ю., Мамедов Н.М. Почвоведение, 9, 70-75, 1993.
11. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, 964 p., 1984.
12. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2, 1579 p., 1986.
13. Cakmakci m. Luttu, Evans H.J. Setdler R.J. Plant and Soil. 61, 53-63, 1981.
14. Kyndu B.C. Madras agr. j., 70, 12, 835-836, 1983.
15. Seldin L., Van Elsas J.D. Penido Elisa G.G. Plant and Soil, 70, 249-255, 1983.

Unwqqlt t 11.III.1999

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 577.5:579.253.4

СУПРЕССИЯ СВЕРХСИНТЕЗА КАПСУЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ИНДУКЦИИ ПРОФАГА λ У *lon*-ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* K-12

Г.Г. ОГАНЕСЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Капсульные полисахариды - профаг λ - супрессия - УФ-индукция

Lon мутанты *Escherichia coli* K-12 отличаются слизистым фенотипом колоний, повышенной чувствительностью к УФ-лучам и другим ингибиторам биосинтеза ДНК, образованием филаментов после УФ-облучения, пониженной способностью наследования плазмид и возможностью быть лизогенизированными умеренными фагами [3, 4, 7, 8]. Все указанные свойства обусловлены мутацией в гене, кодирующем АТФ-зависимую протеазу, ответственную за деградацию чужеродных, дефектных и нескрученных белков, а также специфических субстратов, к числу которых относятся *SulA* ингибитор клеточного деления, *RcsA*-позитивный регулятор биосинтеза капсульных полисахаридов (КПС), N-белок профага λ и другие [5, 8]. В разное время разными авторами описаны супрессорные мутации, подавляющие УФ-чувствительность [7, 12], сверхсинтез КПС [9]. Указанные супрессоры были локализованы в разных областях хромосомы. Мутации, подавляющие сверхсинтез КПС, локализовывались главным образом на 45-50 мин генетической карты *E. coli* [9].

В настоящей работе описывается новый тип супрессора *lon* мутаций, способного подавлять одновременно сверхсинтез КПС и УФ-индукцию профага λ .

Материал и методика. Бактериальные штаммы: *AB1899 F⁺ thr leu proA his argG lon: str-r⁺ λ⁻* получен из музея ВКПМ, *AB1899 λ⁻* получен нами, *CA154 Hfr-H lacZ λ⁻ thi* получен от Бреннер (США), *lon* мутант *Muc154-2* и его неслизистые ревертанты получены нами. Бактериофаги λ и P1vir получены от Сновронской (Москва), M59 от Стирма (Stirm) ФРГ.

Питательные среды. Натуральный бульон стандарт II (Serva, ФРГ), триптоз агар (Ferak, Berlin), L-бульон и L-агар для трансдукции (1), минимальная среда M9 (1), фосфатный буфер pH6,8.

УФ-облучение культур проводилось как описано ранее [4]. Для обнаружения индукции профага λ облученные культуры разводили в свежем бульоне в соотношении 1:4, помещали в водяную баню с качалкой и периодически каждые 20 мин измеряли ОП при 660 нм. Конъюгационное и трансдукционное картирование мутации производили по обычной методике [1].

Результаты и обсуждение. Ранее нами была описана большая группа неслизистых ревертантов (NM) *lon* мутанта *Muc154-2*, полученных с помощью вирулентного бактериофага M59, специфически лизирующего капсулированные клетки *E. coli* [3]. Ниже приводятся данные по УФ-индукции профага λ у этих ревертантов.

Как видно из рис. 1, в отличие от дикого штамма *CA154(λ)* и его *lon* мутанта *Muc154-2*, у некоторых NM ревертантов индукция профага λ не происходит. Отсутствие индукции профага λ могло быть следствием или исцеления этих штаммов от профага, или ингибирования их индукции. Для проверки первого предположения мы проверяли у NM ревертантов характерный для лизогенных штаммов иммунитет к экзогенному профагу λ. Оказалось, что все они сохраняли иммунитет к суперинфекции внешних фагов.

Было проведено конъюгационное картирование супрессорной мутации с одновременным контролем за зиготной индукцией профага λ, при скрещивании с лизогенным и нелизогенным вариантами реципиентного *lon⁻* штамма *AB1899*.

Таблица 1. Выход неслизистых рекомбинантов и зиготная индукция профага λ при конъюгационном скрещивании *NM150* с лизогенным и немутагенным вариантами *AB1899*.

Реципиент	Количество прототрофных рекомбинантов							
	T ⁺ L ⁺		ProA ⁺		His ⁺		ArgG ⁺	
	Всего	слизист	Всего	слизист.	Всего	слизист.	Всего	слизист.
AB1899 λ	16000	82	3100	356	35	30	9	8
AB1899 λ ⁺	36000	126	7400	1300	194	91	26	25

Примечание: конъюгация продолжалась 2 часа.

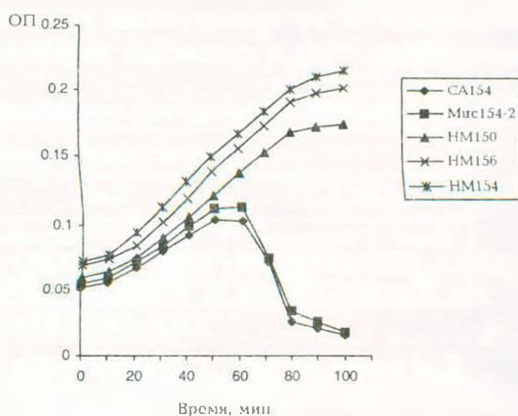


Рис. 1. УФ-индукция профага λ у неслизистых ревертантов *lon* мутанта *Muc154-2*.

Как видно из табл. 1, при скрещивании NM150 с лизогенным реципиентом у T^+L^+ рекомбинантов всего 0,3% сохраняли слизистый фенотип реципиентного штамма. Чем дальше от точки начала передачи донорной хромосомы, тем больше выход слизистых рекомбинантов. Так, среди $ProA^+$ 18% слизистых, His^+ 50%, а среди $ArgG$ более 99% слизистых рекомбинантов. Такой результат свидетельствует о тесном сцеплении супрессорной мутации, подавляющей слизистый фенотип с треониновым и лейциновым маркерами, находящимися на 1-3 мин генетической карты *E. coli*. Низкий выход рекомбинантов у нелизогенного реципиентного штамма является следствием зиготной индукции профага λ .

Устойчивость к суперинфекции и зиготная индукция при конъюгации свидетельствуют о наличии у неслизистых ревертантов профага λ .

Изучение T^+L^+ эксконъюгантов, полученных при скрещивании NM мутантов с лизогенным реципиентом, показало, что вместе со слизистым фенотипом у них подавлена также УФ-индукция профага λ .

Для более точной локализации супрессорных мутаций были проведены эксперименты по трансдукции супрессорной мутации при помощи бактериофага Plvir в слизистый реципиентный штамм AB1899 λ^+ .

Таблица 2. Частота котрансдукции супрессорной мутации с Thr^+ и Leu^+ маркерами.

Количество трансдуктантов					
Thr^+		Leu^+		Thr^+Leu^+	
Всего	неслизист.	Всего	неслизист.	Всего	неслизист.
529	299	208	0	38	0

Как видно из табл. 2, супрессорная мутация тесно (56,5%) сцеплена с треониновым маркером. Отсутствие неслизистых Leu^+ и Thr^+Leu^+ рекомбинантов говорит о том, что супрессорная мутация расположена левее треонинового маркера, примерно на 0,3-й минуте генетической карты *E. coli*.

В указанной области находятся гены, кодирующие DnaK и DnaJ шапероны [6], участвующие в формировании реплицирующего комплекса профага λ и *grpA*, *grpB* гены, участвующие в его развитии [2]. До настоящего времени ничего не было известно об участии этих шаперонов в регуляции биосинтеза КПС. Однако недавно было показано, что мутации в *djlA* (*dnaJ* like) гене, локализующегося на 1,2 мин, могут приводить к индукции сверхсинтеза КПС у *E. coli* K-12 [11]. Участие этого гена в УФ-индукции профага λ не изучено.

С учетом того факта, что позитивный регулятор, индуцирующий биосинтез КПС, представляет собой комплекс, состоящий по крайней мере из двух RcsA и RcsB белков, не исключается участие шаперонов в их взаимоузнавании и присоединении.

ЛИТЕРАТУРА

1. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. - М. Мир., 436, 1976.
2. Одоевская Е.Р., Синеокий. Генетика, 23, 4, 643-653, 1987.
3. Оганесян Г.Г. Биолог. журн. Армении, 48, 55-58, 1995.
4. Оганесян Г.Г., Барсегян А.А., Оганесян М.Г. Биолог. журн. Армении, 37, 5, 398-404, 1984.
5. Рыбчин В.Н. Генетика, 15, 3, 391-409, 1979.
6. Berlyn M.B. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 62, 3, 814-984, 1998.
7. George J., Castellazzi M., Butin. Mol. Gen. Genet., 140, 309-332, 1975.
8. Gottesman S. Ann. Rev. Genet., 30, 465-506, 1996.
9. Gottesman S., Stout V. Mol. Microbiol., 5, 1599-1606, 1991.
10. Jubete Y., Maurizi M.R., Gottesman S. J. Biol. Chem., 271, 48 30798-30803, 1996.
11. Kelley W.L., Georgopoulos C. J. Mol. Microbiol., 25, 5, 913-931, 1997.
12. Ogannessian M.G., Ogannessian H.G. Genetics, 1973.

Поступила 23.1.2000

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 547.963.32

ОСОБЕННОСТИ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННОЙ У ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ И ЕЕ ВЛИЯНИЕ НА ОПУХОЛЕВУЮ ДНК

Д.В. ГАРИБЯН, И.В. ХУДАВЕРДЯН, И.С. ДАНИЕЛЯН, А.С. АГАРОНЯН,
О.Г. КАРАПЕТЯН

Институт тонкой органической химии НАН Армении, 375014, Ереван

5-метилцитозин - метилирование - саркома 45

При выяснении молекулярных механизмов злокачественной трансформации и дифференцировки клеток сделано заключение о корреляции уровня метилирования ДНК с функциональной активностью клеток. Выявлено, что одним из признаков злокачественного развития является нарушение уровня метилирования ДНК, поскольку энзиматическое метилирование ДНК является одним из мощных источников мутации в клетке и может дестабилизировать структуру генов [1, 4]. Кроме того, существует внутриклеточный механизм регуляции экспрессии генов [9], где активация экспрессии клеточных генов, как правило, сопровождается уменьшением уровня метилирования, что может привести к изменению характера дифференцировки клеток [11, 10]. Уникальность процесса метилирования ДНК заключается в том, что это единственный тип модификации первичной структуры ДНК эукариотической клетки.

контролируемой ее геном. Показано гиперметилирование ДНК опухолевых клеток различного генеза [2, 3, 5, 8, 13]. Действие многих активных противоопухолевых веществ направлено непосредственно на ДНК, как главную мишень опухолевой клетки, поскольку повреждения структуры ДНК, вызываемые этими веществами, приводят к их гибели.

Исходя из этого, чтобы показать обладает ли бактериальная культура, выделенная от здоровых людей (3 штамма кишечной палочки, зарегистрированных в ГОС Научно-исследовательском институте стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Л.А. Тарасевича, паспорт N 01-07/89), цитостатическим воздействием на опухоль, были исследованы структурные особенности ДНК опухоли саркомы 45 до и после воздействия на нее бактериальной культурой *in vitro*. Кроме того, в этом же плане изучалась и сама бактериальная культура.

Материал и методика. 10г опухолевой ткани (саркома 45) гомогенизировали в 0,15 Н растворе NaCl, добавляли 18 мл бактериальной культуры, выделенной от здоровых лиц, в одну колбу, во вторую колбу в тех же условиях добавляли бактериальную культуру, выделенную от онкобольных, в третью - от онкобольных, получавших в течение 3-х месяцев бактериальную культуру, выделенную у практически здоровых лиц. Контроль - 10 г опухолевой ткани гомогенизировали в 0,15 Н растворе NaCl. Гомогенаты инкубировали в термостате при 37° 24 ч. В работе использовали метод экстракции ДНК, разработанный Ванюшиным [12] на основе фенольно-хлороформного метода экстрагирования ДНК в присутствии 1,5%-ной SDS.

Гидролиз до оснований производили в запаянных стеклянных ампулах в 85%-ной муравьиной кислоте при 175° в течение одного часа (0,1 мл кислоты на 1 мг ДНК). Разделение оснований производили с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на ДЭАЭ-целлюлозе в растворителе н-бутанол-вода-амиак (60:10:0,1). Спектрофотометрию элюатов всех оснований ДНК (А Т М Ц Г Ц) производили против элюатов из соответствующих участков хроматограмм.

Экстракцию ДНК из бактериальной культуры здоровых людей, онкологических больных и исследование ее нуклеотидного состава проводили по той же методике.

Результаты и обсуждение. Полученные данные показали, что бактериальная культура, полученная от здоровых людей, ингибирует метилирование ДНК в опухолевой ткани (табл. 1). По всей вероятности, бактериальная культура *E. coli*, полученная от здоровых людей, может выступать в роли генного индуктора, изменяя первичную структуру ДНК опухоли, деметилируя ее путем эксцизии 5-метилцитозина (5МЦ), активизации нуклеаз (деметираз), что может вызвать повреждения опухолевой ДНК и привести к утрате клетками своих функций, нарушая механизмы, связанные с ростом клеток, что в свою очередь может привести к гибели (некрозу) клеток. При воздействии бактериальной культуры онкобольных на опухолевые клетки (саркома 45) не только не наблюдается снижения уровня метилирования ДНК, но, наоборот, имеется тенденция к повышению содержания 5МЦ, что говорит в данном случае о функциональной активности клеток, поскольку метилирование ДНК коррелирует с функциональной активностью и дифференцировкой клеток.

Как видно из табл. 1, резко подавлен уровень метилирования ДНК в самой бактериальной культуре онкологических больных, что свидетельствует о том, что для экспрессии многих генов необходимо,

чтобы они были полностью или хотя бы частично неметилированы [7]. У онкобольных, получавших в течение 3 месяцев бактериальную культуру, выделенную от здоровых людей, кишечная флора при инкубации с опухолевыми клетками также уменьшает содержание 5МЦ в ДНК, но в меньшей степени, чем бактериальная культура, выделенная от здоровых лиц. Не исключено, что ингибирование метилирования ДНК в этих случаях в какой-то мере может быть ответственным и за начало реперационных процессов в ДНК опухоли, поскольку деметилирование ДНК приводит к экспрессии генной активности. В таблице приведены данные по содержанию известных оснований (Г, Ц, А, Т) и 5МЦ в исследуемых ДНК. Содержание основных пар оснований в изученных ДНК практически одинаково. Выделенные ДНК принадлежат АТ-типу, количество (Г+Ц+5МЦ) в них составляет 43,9 - 45,5 мол%.

Таблица 1. Нуклеотидный состав ДНК

Источник ДНК	Содержание оснований в ДНК, мол%					
	Г	Ц	МЦ($\bar{X} \pm \sigma$)	А	Т	Г+Ц+МЦ
Бак. культура здоровых людей	21,8	20,9	1,12 $\pm$ 0,02	28,1	28,1	43,8
Бак. культура онкобольных	21,6	20,9	0,73 $\pm$ 0,02	28,4	28,4	43,2
Опухоль (саркома 45)	21,3	20,7	1,57 $\pm$ 0,03	28,3	28,2	45,5
Саркома 45 + бак. культура здоровых людей	21,9	20,9	0,61 $\pm$ 0,02	28,3	28,3	43,4
Саркома 45+ бак. культура онкобольных, получавших в течение 3-х месяцев бак. культ. здоровых людей	21,8	20,7	1,17 $\pm$ 0,02	28,2	28,2	43,6
Саркома 45 + бак. культура онкобольных	21,5	20,7	1,74 $\pm$ 0,02	28,0	28,1	43,39

Нуклеотидный состав ДНК соответствует правилам Чаргаффа. Четко выделяется разница в уровне метилирования между образцами ДНК.

Результаты наших исследований коррелируют с высоким канцеролитическим свойством исследуемых штаммов бактерий *E. coli*, где индекс некроза опухолевых клеток (ИНОК)-способность кишечных палочек, полученных от здоровых лиц, подвергать некрозу опухолевые клетки - очень высок - 86%. ИНОК штаммов бактерий *E. coli*, высеянных от пациентов, в организме которых имеется злокачественный процесс, низкий - 29% [6].

Таким образом, развитие и прогрессия неопластического состояния, по-видимому, тесно связаны с изменением генетического материала, и здесь речь может идти и об энзиматическом метилировании опухолевой ДНК. Изменения характера и уровня метилирования ДНК опухоли при воздействии на нее бактериальной культурой, выделенной от практически здоровых людей, свидетельствуют об изменении первичной структуры ДНК опухоли, которая связана с активацией нуклеаз (деметираз) путем эксцизии 5МЦ, а это может вызвать соответствующие повреждения ДНК и привести к некрозу опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белохвостов А.С., Осипович В.К. и др. Радиационная биол., 35, 356-363, 1995.
2. Жижилина Г.П., Когарко И.Н., Троцкая Т.П., Виноградова Ю.Е. Экспер. онкология, 11, 5, 54-56, 1982.
3. Кляшева Р.И. Вopr. онкологии, 36, 10, 1186-1189, 1990.
4. Мазин А.Л. Молек. биол., 26, 2, 244-263, 1992.
5. Федоров Н.А. Структура ДНК и трансформация клеток, М., Медицина, 1983.
6. Шагеламов В.А., Карапетян А.О., Карапетян О.Г. Материалы по актуальным вопросам совр. гистологии, Москва, 1988.
7. Adams R.L.P., Hanley A., Rinaldi A. FEBS Lett., 269, 1, 29-31, 1990.
8. Baruchel A., Sigaux F. Nonv. Rev. Fr. Hematol, 33 (6), 551-553, 1991.
9. Carington M.W., Solter R.D., Cress W.P., Ting Y.P.V. Immunogenetics, 22, 3, 219-229, 1985.
10. Counts J.L., Ms. Clain R.M., Yoodman J.J. Mol. Carcinog., Feb, 18 (2), 97-106, 1997.
11. Kay P.H., Spagnolo D.V., Taylor J., Ziman M. Leuk-Lymphoma, Jan., 24 (3-4), 211-220, Australia, 1997.
12. Vanjushin B.F., Masin A.L., Vasiliev V.K. e.a. Biochim. et Biophys. Acta, 229, 397, 1973.
13. Verfino P.M., Issa J.P., Pereira-Smith O.M., Baylin S.B. Cell-Growth-Differ, 5 (12), 395-1402, 1994.

Поступила 17.III.2000

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 581.4, 581.84

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОИЗРАСТАНИЯ ПО МОРФОАНАТОМИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ У ЭНДЕМИЧНОГО ВИДА ЯЧМЕНЯ

С.С. ЗАМИНЯН, Л.Г. МУРАДЯН, Р.Э. АВАЛЯН, Л.Х. АБРАМЯН

Ереванский государственный университет, кафедра генетики и цитологии, 375025

*Ячмень дикорастущий - экстремальные условия произрастания -
морфоанатомические структуры*

В настоящее время разработана концепция комплексного экологического мониторинга природной среды. Одним из важнейших его элементов являются растительные организмы как наиболее чувствительные и надежные индикаторы загрязненности окружающей среды [4, 6].

В связи с этим актуальным является поиск структур-индикаторов

влияния условий среды для максимальной реализации защитно-регуляторного потенциала растительного организма.

С этой точки зрения интересным, на наш взгляд, является вопрос возможности использования дикорастущих полевых популяций эндемичных злаков в качестве биоиндикаторов степени экстремальности условий произрастания [1, 2].

Целью наших исследований явилось изучение степени изменчивости морфоанатомических структур поверхности зерновок эндемичного вида ячменя, произрастающего в различных экстремальных условиях.

Материал и методика. В качестве объекта исследований нами были взяты зерновки эндемичного вида ячменя - *Hordeum spontaneum* C. Koch. s. str. - ячмень дикорастущий. Растения были собраны из 3 региональных зон произрастания данного вида.

Первая зона исследования расположена близ деревни Мецамор Армавирского района РА, вторая - около деревни Айгрлич того же района. Третья зона исследования, значительно удаленная от 2-х первых зон, расположена в районе выраженной зональности вблизи г.Еревана - р-он Джервеж.

Ландшафт Аракатской равнины является в основном аридным с резко нарушенным водно-тепловым балансом и дискомфортными климатическими условиями.

Зерновки исследуемого вида ячменя замачивали в растворе тройчатки (спирт-глицерин-вода 1:1:1), в котором выдерживали несколько суток. Желатин-глицериновые препараты поперечных срезов зерновок готовили по общепринятой методике [5]. Делали рисунки покровов зерновок с помощью рисовального аппарата РА-1 при увеличении микроскопа - 15X40. Проводили морфометрические измерения толщины основных слоев перикарпия - спермодермы, а также клеток алейронового слоя с помощью окуляр-микрометра (X10). Статистическая обработка материала проведена по общепринятой методике [3].

Результаты и обсуждение. Изучение морфоанатомических структур покровов зерновок ячменя из исследуемых региональных зон показало наличие 3-х основных слоев клеток, составляющих поверхность: перикарпия, спермодермы и алейронового слоя.

Верхний эпидермальный слой перикарпия зерновок ячменя из региональной зоны Мецамор представлен 1-2 слоями склерифицированных клеток с утолщенными стенками. Паренхимные клетки перикарпия изодиаметрической формы тонкостенные, относительно крупные, немного вытянутые в тангентальном направлении, представлены 2-3 слоями (рис. 1).

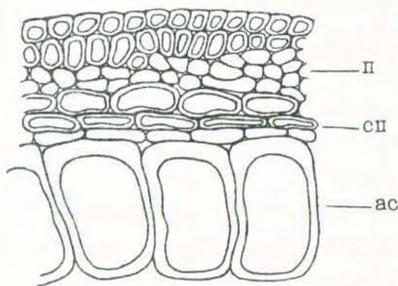


Рис. 1. Морфоанатомическое строение покровов зерновок исследуемого вида ячменя из I региональной зоны (р-он Мецамор).

п - перикарпий, сп - спермодерма, ас - алейроновый слой

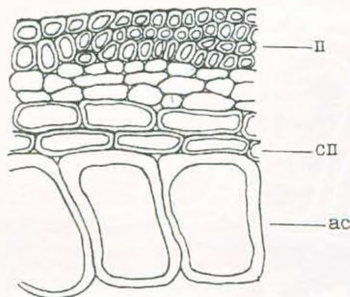


Рис. 2. Морфоанатомическое строение покровов зерновок исследуемого вида ячменя из II региональной зоны (д. Айгрлич).

п - перикарпий, сп - спермодерма, ас - алейроновый слой

Следующий за паренхимой слой внутренней эпидермы представлен поперечными клетками-гидроцитами и также состоит из довольно крупных клеток, сильно вытянутых в тангентальном направлении в виде темно-окрашенной полоски.

Клетки алеиронового слоя довольно крупные, сильно вытянутые в радиальном направлении, заполненные белковым содержимым, по размеру почти равные толщине перикарпия.

Перикарпий зерновок ячменя, произрастающего в региональной зоне близ Айгрич, представлен 5-7 слоями клеток, из которых 2-3 слоя наружных эпидермальных клеток сильно склерифицированы и имеют многоугольную форму (рис. 2). Паренхима представлена 2-3 слоями тонкостенных, крупных, удлинённых в радиальном направлении клеток.

Внутреннюю эпидерму составляет слой тонкостенных поперечных клеток - гидроцитов, вытянутых в радиальном направлении и имеющих большие полости.

Спермодерма, так же как и у растений предыдущего варианта, состоит из слоя сдавленных клеток, вытянутых в тангентальном направлении и представленных на срезе в виде окрашенной полоски.

Алейроновый слой также не отличается от предыдущего варианта и имеет крупные, удлинённые в тангентальном направлении клетки, по размеру не уступающие толщине перикарпия и заполненные белковым содержимым.

Отличительной особенностью морфоанатомического строения покровов зерновок ячменя из зоны произрастания Джервеж явились некоторые изменения структурного характера, проявляющиеся в том, что наружная эпидерма перикарпия представлена меньшим количеством клеток, имеющих овальную форму с склерифицированными стенками, чем у растений предыдущих вариантов (рис. 3).

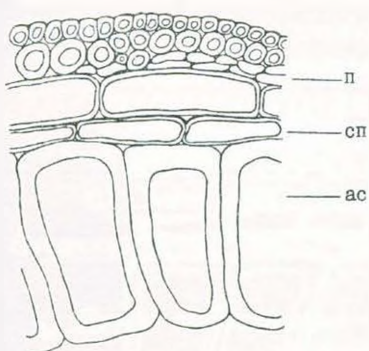


Рис. 3. Морфоанатомическое строение покровов зерновок исследуемого вида ячменя из III региональной зоны (р-он Джервеж).

п - перикарпий, сп - спермодерма, ас - алеироновый слой

Одновременно отмечено, что и сам перикарпий зерновок данного варианта почти не содержит слоя паренхимных клеток, но имеет сравнительно крупные (почти в 2 раза) поперечные клетки-гидроциты.

Алейроновый слой также представлен весьма крупными удлинёнными в радиальном направлении клетками, почти в 2 раза превосходящими по размеру клетки алеиронового слоя у зерновок ячменя других зон произрастания.

Сравнение морфоанатомических структур покровов зерновок исследуемых вариантов выявило качественный характер изменений, проявляющихся в особенностях размеров и строения клеток,

слагающих основные слои поверхности зерновок и алейроновой ткани.

При сопоставлении изучаемых особенностей в строении клеток основных слоев поверхности зерновок ячменя из зоны вблизи г.Еревана просматривались некоторые изменения структурального характера, проявляющиеся в том, что размеры клеток перикарпия и спермодермы превышали таковые у зерновок ячменя из Араратской равнины. Существенные различия обнаружены в строении клеток алейронового слоя, размеры которых почти в 2 раза превышали данный показатель у растений двух первых вариантов.

Таким образом, показано, что морфоанатомические структуры поверхности зерновки эндемичного ячменя могут быть использованы в качестве надежного индикатора экстремальных условий окружающей среды.

На основании наших многолетних исследований, а также результатов многочисленных научных работ растения дикорастущего ячменя могут быть использованы в качестве объекта не только генетических, но и экологических исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Абрамов В.И., Митин А.Н., Шевченко В.А.* Тез. докл. заседания секции генетич. аспект. проблемы "Человек и биосфера", Ереван, 1987.
2. *Заминян С.С., Авалян Р.Э.* Тезисы докл. Междунар. симпоз. "Работы по изучен. атмосферн. пограничн. слоя в городск. услов. загрязнения атмосферы", Ереван, 1988.
3. *Рокитский П.Ф.* Биологическая статистика, 320, Минск, 1973.
4. *Уильям Дж.Меннинг, Уильям А.Федер* Биомониторинг загрязнения атмосферы с помощью растений, 140, Л., Гидрометеиздат, 1985.
5. *Фурст Г.Г.* Методы анатомо-гистохимического исследования растительных тканей, М., Наука, 1979.
6. *Feder W.A. and Manning W.J.* Living plants as indicator and monitors. Air. Poll. Control. Assoc., Pittsburgh, 9-14, 1979.

Поступила 2.VI.1999

СОХРАНЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ *TRYPANOSOMA VIVAX* *ZIEMANN*, 1905 В КЛЕЩАХ

С.Р. ПОСТОЯН

Научный центр животноводства и ветеринарии АОЗТ, 375005, Ереван

Крупный рогатый скот - трипаносомоз - клещи

Трипаносомоз крупного рогатого скота, вызванный *Trypanosoma vivax*, имеет широкое распространение в Республике Куба, других латиноамериканских странах и в Африке.

В Армении, по данным Закавказской паразитологической экспедиции, возглавляемой акад. Е.Павловским, трипаносомоз (случная болезнь) был обнаружен в 1931 году у однокопытных, однако благодаря принятым мерам с 1950 г. в Республике он не регистрируется [1, 2]. Несмотря на это, наличие трипаносомоза крупного рогатого скота и его переносчиков в соседних странах, с которыми в последние годы оживились экономические связи, должно настораживать МСХ Республики в плане возможного заноса возбудителей этого тяжелого заболевания кровососущими насекомыми.

Вопрос сохранения трипаносом в организме клещей и передачи его от больных трипаносомозом животных здоровым при кровососании остается малоизученным. Это частично можно объяснить тем, что внимание большинства исследователей в настоящее время обращено на решение тех главных задач, с которыми связывают успех борьбы и профилактики с данной инвазией.

Вместе с тем известно, что те или иные эпизоотологические факторы, действуя постоянно, могут придавать эпизоотии стационарный характер. Поэтому выяснение роли клещей как вероятных агентов, способных сохранить трипаносомы в организме и передавать их восприимчивым животным, приобретает важное значение и требует дальнейших, более глубоких экспериментальных исследований, а также четких эпизоотологических наблюдений.

По нашим данным, переносчиками возбудителей трипаносомоза крупного рогатого скота на Кубе являются кровососущие комары рода *Culex*, муха-жигалка и, по-видимому, другие кровососущие насекомые [2, 3].

Литературные данные по затронутому вопросу весьма ограничены, а те сведения, которые приводятся некоторыми авторами [1, 4, 5], относятся лишь к клещам *Ixodidae* и *Aegasidae*.

В настоящем сообщении приводятся результаты изучения роли клещей *Boophilus microplus* и *Amblyomma cajennense* в сохранении возбудителей

трипаносомоза крупного рогатого скота *T.vivax* с последующей попыткой разрешить вопрос передачи трипаносом инфицированными клещами восприимчивым животным при кровососании.

Материал и методика. В неблагополучном по трипаносомозу хозяйстве Пунта-Горда провинции Орьенте Республики Куба методами раздавленной капли крови и сухих мазков периодически проводили поголовные микроскопические исследования периферической крови крупного рогатого скота с целью выявления больных трипаносомозом животных с высокой паразитемией (200-250 паразитов в 100 полях зрения микроскопа). Затем отбирали хорошо насосавшихся и наиболее активных клещей, переносили их в чашку Петри и в течение 15-20 мин обрабатывали растворами антибиотиков (по 500 ЕД пенициллина и стрептомицина в 1 мл дистиллированной воды), далее тщательно подсушивали стерильной фильтровальной бумагой и фиксировали на парафиновом столике в вертикальном положении, погрузив переднюю часть тела клеща в парафин, предварительно растопленный горячим железным предметом. Под бинокулярной лупой в условиях асептики удаляли часть заднего конца тела клеща с помощью приспособленных для этих целей ножниц и пинцета. Легким надавливанием на тело клеща собирали вытекающее кишечное содержимое, которое наносили на предметное стекло, высушивали, фиксировали метиленовым спиртом, окрашивали по методу Романовского-Гимзы и рассматривали под микроскопом с иммерсионной системой. Параллельно кишечное содержимое клещей наносили на предметное стекло с наложением покровного стекла и рассматривали под микроскопом при среднем увеличении. Живые трипаносомы обнаруживались благодаря активному движению жгутика и сокращениям тела.

Исследования гемолимфы проводили под бинокулярной лупой. В условиях асептики ножницами удаляли лапку одной из задних пар ножек. Вытекающую гемолимфу, составляющую обычно 0,015-0,020 мл, исследовали методами раздавленной капли и сухих мазков. Поврежденную ножку клеща затем прижигали.

В двух сериях опытов исследовали всего 63 половозрелых клеща: 28 *B.microplus* и 35 *A.cajennense*.

Сроки наблюдений - 1, 2, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 ч после сбора клещей с естественно больных трипаносомозом животных.

Результаты и обсуждение. Полученные данные приведены в таблице, из которой следует, что в кишечном содержимом клещей, собранных с естественно больного трипаносомозом крупного рогатого скота с высокой паразитемией, сохранившие жизнеспособность трипаносомы были обнаружены через 1, 2, 24, 48, 72 и 96 ч после сбора.

Таблица. 1. Сроки сохранения жизнеспособности трипаносом в организме клещей

Район, хоз-во	Вид клеща	К-во исслед. клещей	Исследуемый материал	Рез-ты исследования через (ч):									
				1	2	24	48	72	96	120	144	168	192
Баямо Пунта-Горда	<i>B.microplus</i>	28	кишечное содержимое гемолимфа	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Мансанильо Пальмас-Альтас	<i>A.cajennense</i>	35	кишечное содержимое гемолимфа	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
				-	-	-	-	-	-	0	0	0	0

Примечание: "+" - положительные результаты, "-" - отрицательные, "0" - исследование не проведено.

В последующие сроки исследований трипаносомы обнаруживались в деформированном и частично лизированном виде. Видно также, что из кишечника клещей трипаносомы не переходят в гемолимфу.

Таким образом, *T.vivax* сохраняет жизнеспособность в клещах

B. microplus и *A. cajennense* 96 ч после сбора с больного трипаносомозом животного.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марутян Е. Мат-лы научн. сессии по итогам исслед. работ. Изд-во "Айастан", Ереван, 1980.
2. Павловский Е. Руководство по паразитологии человека. 2, М. -Л., 1948.
3. Постоян С.Р. Докл. съезда Всесоюзн. об-ва протозоологов. Витебск, 1992.
4. Постоян С.Р. Биолог. журн. Армении, 50, 1-2, 1997.
5. Hoare С.А. The tripanosomes of mammalis. Oxford and Edinburg, 1972.

Поступила 27.VII.1999

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 616.233/24-036.12-07:616.127-577.11

НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ГЛИЦЕРОФОСФАТА И ГЛИЦЕРИНА В МИОКАРДЕ ПРИ ЛЕГОЧНО-СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

А.П. КАЗАРЯН*, П.А. КАЗАРЯН**

*Институт биохимии НАН Армении, 375014, Ереван

**Гематологический центр МЗ Армении, 375014, Ереван

Легочно-сердечная недостаточность - фосфолипиды

Как известно, хронические неспецифические заболевания легких (ХНЗЛ) сопровождаются изменением функции большинства органов и систем, в том числе и сердечно-сосудистой системы. Данные как о самих ХНЗЛ, так и вызванных ими осложнениях свидетельствуют о существовании определенной связи между инвалидностью и смертностью таких больных от сопутствующей легочно-сердечной недостаточности (ЛСН; легочное сердце) [4,5,10].

Ранее нами было показано значительное изменение количественного и качественного состава фосфолипидов (ФЛ) правого отдела сердца кроликов при ЛСН [2], установлено существенное нарушение обмена фосфатидов-глицеридов. Для выяснения конкретных участков повреждения в цепи липогенеза возникла необходимость изучения состояния биосинтеза глицеролипидов в указанной ткани. Так как глицерофосфат (ГФ) является важнейшим исходным метаболитом биосинтеза глицеролипидов, что обеспечивается функционированием глицерофосфатной системы, представляло интерес проведение углубленного исследования обмена

глицерофосфата и глицерина в правом отделе сердца при ЛСН. Функционирование глицерофосфатной системы обеспечивает перевод части углеводов с гликолитического пути их превращения через фосфотриозы на синтез глицеролипидов, взаимопревращение триацилглицеридов, фосфатидов-глицеридов и глюкозы, а также создает возможность для транспорта экстрамитохондриального водорода в митохондрии, тем самым обуславливая значительную степень энергообеспечения ткани сердца.

Важность метаболической роли ГФ послужила основанием для изучения ферментов, ответственных за обеспечение уровня как ГФ и глицерина, так и начального этапа биосинтеза фосфатидов-глицеридов в норме и при легочном сердце.

Материал и методика. Опыты проводили на 11 кроликах-самцах массой 2-3 кг. Хронический воспалительный бронхолегочный процесс и ЛСН вызывали методом Аничкова и Захарьевской в модификации Русанова и соавт. [3].

Определяли активность глицеринкиназы (ГК), глицериндегидрогеназы (ГД) и глицерофосфатдегидрогеназы (ГФД) в реакции окисления ГФ и восстановления диоксиацетонфосфата (ДАОФ), а также концентрацию свободного глицерина, ГФ и ДАОФ в миокарде кроликов.

Активность ГК (КФ 2.7.1.30), ГФД (КФ 1.1.1.8) в реакции окисления ГФ и концентрацию ГФ определяли по известным микроспектрофотометрическим методам Кеннеди [9]; активность ГФД в реакции восстановления ДАОФ - по Бейзенгеру и соавт. [6], а активность ГД - по Геслеру и Иселбахеру [7]. Содержание свободного глицерина выявляли по методике Гильмиаровой [1], а ДАОФ - по Хогорсту и соавт. [8]. Ферментативную активность и содержание метаболитов определяли в постмитохондриальной надосадочной жидкости, полученной при 17 000 g. Оптическую плотность регистрировали при 340 нм. Содержание метаболитов определяли с учетом коэффициента микромолярной экстинкции для NADH, равного 6,22 см²/мкМ.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований (рис.1) свидетельствуют о значительном (55,0%) подавлении скорости реакции восстановления ДАОФ в ГФ (прямая реакция) в ткани правого отдела сердца при ЛСН. При этом активность ГФД в обратной реакции не претерпевает существенных отклонений от нормы, что указывает на стабильность интенсивности реакции, обеспечивающей вовлечение ГФ в процессы глюконеогенеза. В этих условиях наблюдается также подавление активности ГК и ГД (на 32,0 и 35,0% соответственно) в миокарде подопытных животных.

Специфические особенности изменения активности ферментных систем, катализирующих начальные этапы фосфатидогенеза - ГК и ГФД, вызвали необходимость одновременного изучения количественных сдвигов ДАОФ, ГФ и глицерина в миокарде кроликов при ЛСН.

Результаты исследований, отраженные на рис.2, свидетельствуют о заметном (29,8 %) снижении уровня ГФ в исследуемой ткани.

При этом содержание ДАОФ, наоборот, возрастает (на 38,1%), а в концентрации свободного глицерина каких-либо заметных отклонений от нормы не наблюдается. Полученные данные свидетельствуют о метаболической связи между балансом ГФ и ферментными системами, катализирующими процесс образования ГФ. Уменьшение содержания последней в сердечной мышце обусловлено ингибированием как

глицерокиназного, так и гликолитического путей образования этого соединения. Однако, как следует из приведенных данных, наиболее выраженным (55,0%) является ингибирование активности цитоплазматической ГФД.



Рис. 1. Активность ферментов, участвующих в обмене ГФ и глицерина (в мкмольх NAD.H/г ткани) в ткани правого отдела сердца кроликов в норме и при ЛСН. 1 - ГФД (прямая реакция), 2 - ГФД (обратная реакция), 3 - ГК, 4 - ГД.



Рис. 2. Уровень некоторых метаболитов липидов и углеводов (в мкмольх NAD.H/г ткани) в ткани правого отдела сердца кроликов при ЛСН. 1 - ГФ, 2 - ДОАФ, 3 - глицерин (мкг/г).

Таким образом, полученные данные убедительно свидетельствуют о том, что подавление биосинтеза фосфатидов-глицеридов в сердечной мышце обусловлено главным образом резким (двукратным) ингибированием активности цитоплазматической ГФД, катализирующей реакцию восстановления ДОАФ в ГФ — ключевой метаболит липогенеза.

Как известно, функционирование глицерофосфатного челночного механизма создает возможность прямого окисления гликолитически генерированного NAD.H цитоплазмы дыхательной цепью митохондрий. По нашим данным, резкое подавление активности цитоплазматической ГФД сопровождается уменьшением содержания ГФ в постмитохондриальной надссадочной жидкости, что, в свою очередь, может привести к снижению активности глицерофосфатного "челнока", обеспечивающего транспорт экстрамитохондриального водорода в митохондрии.

Описанные явления, несомненно, можно рассматривать как патогенетические факторы, ведущие к нарушению процессов фосфатиногенеза в миокарде, что, наряду с другими метаболическими изменениями [2], является важнейшим фактором в механизме нарушения сократительной функции сердечной мышцы при легочном сердце.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гильмиарова Ф.Н. Канд. дисс., Куйбышев, 1964.
2. Казарян А.П., Бороян Р.Г. В кн.: Актуальные проблемы эксперим. и клин. медицины. 490-498, Ереван, 1998.

3. Русанов Г.А., Горбачев Л.И., Булатова З.В. и др. В кн.: Проблемы пульмонологии, 3, 7-12, Л., 1973.
4. Трубников Г.В., Чеганов В.Ф. Кардиология, 3, 93-95, 1989.
5. Шклярова Б.С. Канд. дисс., Курск, 1990.
6. Beisenherz G., Bucher Th., Karl-Heinz Garbade Methods in enzymology, 1, 391, 1955.
7. Haessler H.A., Isselbacher K.I. Biochim. Biophys. Acta, 73, 427-436, 1963.
8. Hohorst H.I., Kreutz T.H., Bucher Th. Biochem. Z., 332, 18, 1959.
9. Kennedy E.P. Meth. Enzymol., 5, 476, 1962.
10. Nakos G., Pneumatikos J. et al. Am. J. Respir. Crit. Care. Med., 155 (3), 945-951, 1997.

Поступила 11.11.2000

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 616.366-002+616.381-072.1+577.391

НЕКОТОРЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ХОЛЕЦИСТИТОМ

Ю.А. АРУՅՈՆՅԱՆ*, П.А. КАЗАРՅԱՆ**

*Медицинский центр Эребуни, 375047, Ереван

**Гематологический центр МЗ РА, 375014, Ереван

*Деструктивный холецистит - лимфоциты - фосфолипиды -
фосфолипаза A₂ - перекисное окисление липидов*

Как известно, острый холецистит, осложненный перитонитом, сопровождается развитием эндогенной интоксикации. В связи с этим проблема патогенеза и диагностики эндотоксикоза остается актуальной.

На современном этапе развития хирургии весьма перспективным является разработка малотравматичных методов хирургического лечения [1, 6]. Преимущества лапароскопической холецистэктомии (ЛХЭ) — малая травматичность, относительно редкое возникновение серьезных осложнений, быстрый восстановительный период и др. — позволяют выполнять операции у пациентов с тяжелой сочетанной патологией [2-4, 11, 12], в связи с чем ЛХЭ в последние годы получает все большее признание и распространение [5, 14].

Целью наших исследований явился поиск новых, более информативных критериев оценки состояния эндогенной интоксикации и эффективности лапароскопической холецистэктомии у больных деструктивным холециститом.

Материал и методика. Работа основана на анализе результатов клинического обследования и лечения 18 больных деструктивным холециститом в возрасте от 40 до 60 лет, находившихся в хирургическом отделении Медицинского центра “Эребун” МЗ РА. Женщины составляли 82% больных.

Все пациенты были подвергнуты комплексному клиническому обследованию по общепринятой схеме с использованием соответствующих лабораторных и рентгенологических методов, а также УЗИ органов брюшной полости.

Фракционирование индивидуальных фосфолипидов (ФЛ) лимфоцитов осуществляли с помощью двумерной тонкослойной хроматографии [13] на адсорбенте ЛС [8]. Активность перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по реакции малонового диальдегида (МДА) с тиобарбитуровой кислотой [7], а активность фосфолипазы A_2 - спектрофотометрическим методом [13] в модификации Казаряна [9].

Цифровой материал подвергали статистической обработке с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что деструктивный холецистит характеризуется существенным нарушением метаболизма мембранных фосфолипидов (ФЛ) лимфоцитов крови (рис. 1). В этих условиях резко ($p < 0.01$) возрастает концентрация лизофатидил холинов (ЛФХ) - цитотоксичных продуктов расщепления фосфатидов-глицеридов, что, по-видимому, обусловлено усилением деятельности фосфолипазы A_2 . Одновременно наблюдается более чем двукратное уменьшение уровня фосфатидилхолинов (ФХ) и, наоборот, статистически достоверное увеличение содержания фосфатидных кислот (ФК) - промежуточных продуктов биосинтеза ФЛ.

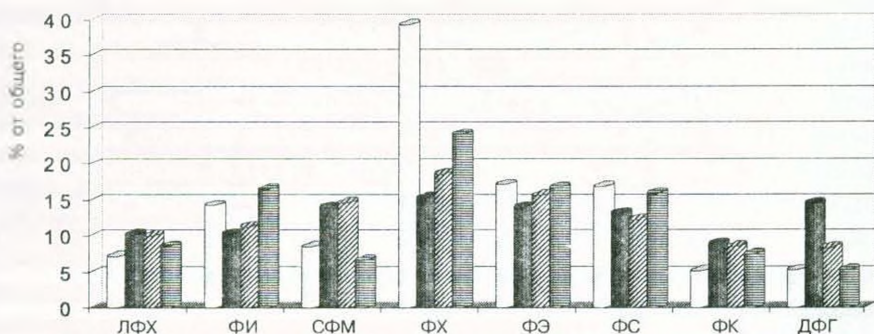


Рис. 1. Изменение количественного и качественного состава фосфолипидов лимфоцитов крови при остром холецистите, осложненном перитонитом после открытой операции и лапароскопической холецистэктомии (в % от общего).

□ - здоровые

▨ - деструктивный холецистит

▤ - после открытой операции

▥ - после лапароскопической холецистэктомии

Примечание: ЛФХ - лизофатидилхолины; ФИ - фосфатидилинозиты; СФМ - сфингомиелины; ФХ - фосфатидилхолины; ФЭ - фосфатидэтанолламины; ФС - фосфатидилсерины; ФК - фосфатидилкислоты; ДФГ - дифосфатилглицерины.

После открытой операции наблюдается лишь тенденция к нормализации указанных показателей, тогда как ЛХЭ характеризуется определенной нормализацией уровня всех изученных представителей ФЛ лимфоцитов крови, что проявляется в нормализации коэффициентов как ЛФХ/ФХ, так и ФХ/ФК, характеризующих соответственно состояние

деградации фосфатидов-глицеридов и реакций фосфатидогенеза в биомембранах.

Для выяснения конкретных участков повреждения в цепи реакций фосфатидогенеза и деградации мембранных глицеролипидов, а также механизмов коррекции нарушенных метаболических процессов при деструктивном холецистите после лапароскопического вмешательства исследовали состояние процессов ПОЛ, некоторых этапов деградации липидов лимфоцитов крови. Выявлена тесная связь в интенсивности течения процессов ПОЛ и расщепления мембранных ФЛ лимфоцитов крови (рис. 2). Сравнительная оценка уровня мембранных глицерофосфолипидов, в частности ФХ, ЛФХ, и активности фосфолипазы A_2 показывает на определенные закономерности в картине этих изменений.

Результаты проведенных нами исследований показывают, что эндотоксикоз при деструктивном холецистите сопровождается значительным повышением активности как фосфолипазы A_2 , так и процессов ПОЛ (рис. 2).

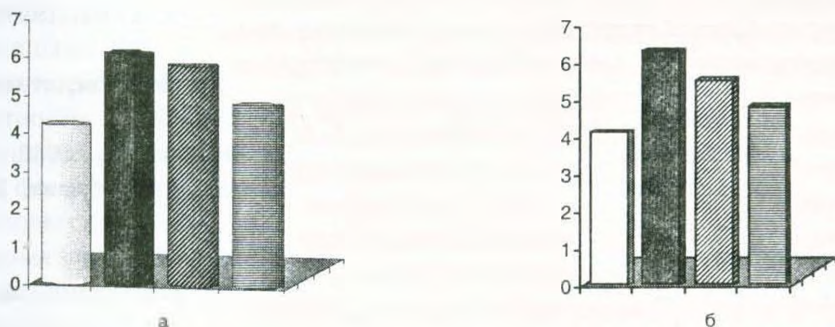


Рис. 2. Изменения активности фосфолипазы A_2 (а) и скорости ПОЛ (б) в лимфоцитах крови при деструктивном холецистите после открытой операции и ЛХЭ (в усл. ед.).

□ - здоровые ▨ - деструктивный холецистит
 ■ - после открытой операции □ - после лапароскопической холецистэктомии

Как известно, интенсификация расщепления ФЛ под действием фосфолипаз и активация процессов ПОЛ сопровождается образованием в мембранах определенных дыр и конформационными изменениями мембраносвязанных ферментов, рецепторных белков, а также нарушением проницаемости биомембран [9, 10, 15]. По нашим данным, эндогенная интоксикация при деструктивном холецистите характеризуется нарушением проницаемости биомембран со значительным подавлением их функциональной активности. После открытой операции отмечается лишь тенденция к нормализации деятельности фосфолипазы A_2 и скорости ПОЛ, тогда как ЛХЭ приводит к почти полной нормализации уровня этих показателей (рис. 2).

Таким образом, ЛХЭ в сочетании с антибактериальной терапией при деструктивном холецистите в стадии развития эндотоксикоза приводит к определенной нормализации всех показателей метаболизма мембранных

липидов, что обусловлено нормализацией начальных этапов расщепления ФЛ и процессов ПОЛ. Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности определения активности фосфолипазы A_2 и процессов ПОЛ в лимфоцитах крови при оценке состояния эндогенной интоксикации и эффективности проводимого лечения у больных деструктивным холециститом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бебуришвили А.Г., Зюбина Е.Н., Земцов Р.В. Эндогенная хирургия, 4, 14-17, 1998.
2. Брискин Б.С. Эндоскопическая хирургия, 3, 3-6, 1996.
3. Бударин В.Н., Темнышев С.В., Большаков В.В. и др. Хирургия, 2, 58, 1999.
4. Галлингер Ю.И., Тимошин А.Д. Лапароскопическая холецистэктомия. НИЦХ РАМН, М., 1994.
5. Ермолов А.С., Гуляев А.А., Адамян А.И. Эндохирургия, 1, 64, 1997.
6. Ермолов А.С. Хирургия, 3, 13-24, 1998.
7. Ланкин В.З., Гуревич С.М., Бурлакова Е.Б. В кн.: "Биоантиокислители". 73, М., 1975.
8. Казарян П.А., Элоян Д.В. Хроматографические методы. М., 1982.
9. Казарян П.А., Элоян Д.В. Нарушения фосфолипидного обмена. М., 1985.
10. Крепс Б.М. Липиды клеточных мембран. Л., 1981.
11. Мясников А.Д., Бежин А.И., Бондарев А.А., Пономаренко А.А. Эндогенная хирургия, 6, 20-24, 2000.
12. Чугунов А.Н., Федоров И.В., Шакиров М.В. Эндохирургия для России, 2, 21-23, 1993.
13. Италь Э. Хроматография в тонких слоях. М., 1965.
14. Duggan D.D. Arch. Biochem. and Biophys., 84, 116, 1959.
15. Grassl M., Maellering H. Anal. Chem., 243, 416-423, 1969.

Поступила 12.XII.2000

АКТИВНОСТЬ ФОСФОЛИПАЗЫ A_2 В ПЕЧЕНИ ПРИ ОСТРОМ ХОЛЕЦИСТИТЕ

Ю.А. АРУТЮНЯН

Медицинский центр Эребуни, 375047, Ереван

Холецистит - фосфолипаза

Изучение активности фосфолипазы A_2 в тканях представляет интерес с точки зрения патогенетической значимости этого энзима при различных заболеваниях [7], в том числе и при остром холецистите [9, 11].

Как известно, специфическая функция фосфолипаз состоит в расщеплении фосфолипидов (ФЛ) клеточных мембран и липопroteидов. Расположение прочно связанных с ФЛ белковых молекул такое, что они уменьшают скорость гидролиза мембранных ФЛ или даже полностью защищают ФЛ от разрушения [4]. При патологических состояниях дезинтеграция структуры мембран облегчает действие фосфолипаз, в частности фосфолипазы A_2 , которая может повреждать мембранные структуры, в том числе и митохондриальные мембраны клеток. Вместе с тем, фосфолипаза A_2 принимает активное участие в синтезе простагландинов, повышает выход из клетки биологически активных веществ - ацетилхолина, адреналина, что может иметь существенное значение в развитии патологии. Повышение активности этого фермента приводит к удалению токсичных перекисленных жирнокислотных остатков фосфатидов из тканей [8, 4].

Целью настоящего исследования было изучение активности фосфолипазы A_2 в печени при остром холецистите.

Материал и методика. 22 больных острым холециститом в возрасте от 40 до 60 лет были подвергнуты комплексному клиническому исследованию по общепринятой схеме с использованием соответствующих лабораторных и рентгенологических методов, а также УЗИ органов брюшной полости. Активность фосфолипазы A_2 в печени определяли методом спектрофотометрии [10] в модификации Казаряна [5, 7].

Цифровой материал подвергали статистической обработке с использованием критерия достоверности и различий Фишера-Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Результаты исследований свидетельствуют о значительном (64,3%) увеличении активности фосфолипазы A_2 в печени больных острым холециститом. Наблюдается определенная связь между изменением активности фермента и накоплением цитотоксичных лизофосфолипидов в печени, о чем свидетельствуют результаты ранее проведенных исследований [6].

Нет сомнений, что повышение активности фосфолипазы A_2 в гепатоцитах может сопровождаться уменьшением содержания фосфатидилхолинов — основных компонентов биомембран.

Известно, что фосфолипазы класса А (A_1 и A_2) ответственны и за

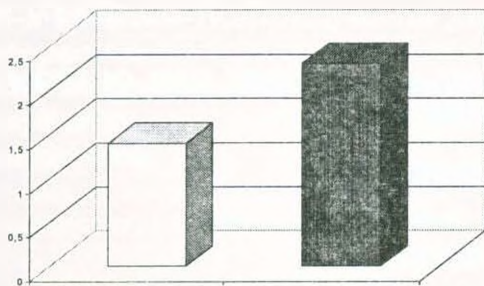


Рис. 1. Изменение активности фосфолипазы A₂ в гепатоцитах в норме и при остром холецистите (в усл. ед.) - здоровые, - острый холецистит

расщепление других фосфатидов-глицеридов [1]. При изучаемой патологии содержание последних в печени заметно уменьшается. Очевидно, что значительные количественные и качественные изменения ФЛ в печеночной ткани частично обусловлены нарушением деятельности ферментов распада ФЛ, в частности, активацией фосфолипазы A₂ в этом органе. В этих условиях следует ожидать

повреждения митохондриальных мембран и нарушения проницаемости мембран гепатоцитов.

Одной из причин, которыми объясняются повреждения митохондрий в условиях гипоксии, является увеличение содержания лизофосфолипидов и свободных жирных кислот в тканях в результате гидролиза мембранных ФЛ. При этом разобщение транспортов электронов и окислительного фосфорилирования связаны с нарушением проницаемости мембран [2]. Фосфолипаза A₂ может влиять на активность ряда мембраносвязанных ферментов, нарушая метаболические процессы в тканях и органах [3, 6]. Фосфолипаза класса A способствует высвобождению ряда ферментов в очагах воспаления, повышая мембранную проницаемость. Указанные фосфолипазы в равной мере стимулируют выход в среду изоферментов лактатдегидрогеназы, аланинаминотрансфераз, аспаратаминотрансфераз и других ферментов. Эти и другие литературные данные свидетельствуют об активном участии фосфолипаз в воспалительных процессах [6].

Таким образом, повышение активности фосфолипазы A₂ и накопление лизофосфолипидов в печеночной ткани свидетельствуют о существенной роли этого ключевого фермента расщепления мембранных ФЛ в патогенезе острого холецистита.

ЛИТЕРАТУРА

1. Брокерхоф Х., Дженсен Р. Липолитические ферменты, М., 396, 1978.
2. Бразин Е.О. и соавт. *Вопр. мед. химии*, 5, 673-677, 1977.
3. Вельтищев Ю.Е. *Вопросы охраны материнства и детства*, 4, 3-9, 1981.
4. Вельтищев Ю.Е., Юрьева Э.А. и др. *Вопр. мед. химии*, 4, 441-449, 1981.
5. Казарян П.А., Элоян Д.В. *Хроматографические методы*. М., 1982.
6. Казарян П.А., Элоян Д.В. *Нарушения фосфолипидного обмена*. М., 1985.
7. Казарян П.А. Докт. дис., Ереван, 1986.
8. Козлов Ю.П. В кн.: *Биоантиоксиданты*, М., 5-14, 1975.
9. Мясников А.Д., Бежин А.И. и др. *Эндогенная хирургия*, 6, 20-24, 2000.
10. Grassl M., Maellering H. *Anal. Chem.*, 243, 416-423, 1969.
11. Kocher T., Herrog U. et al. *Helv. Chir. Acta*, 60, 5, 761-765, 1998.

Поступила 12.XII.2000

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СТРУКТУРНЫХ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ МАКРОФАГОВ ПЕЧЕНИ И СЕЛЕЗЕНКИ ПРИ АНТИГЕННОЙ СТИМУЛЯЦИИ

М.З. БАХШИНЯН, Э.С. АКОПДЖАНИЯ

*Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци,
кафедра гистологии, 375025, ЦНИЛ*

*Макрофаги печени и селезенки — кислая фосфатаза — лаброциты —
эозинофилы — система мононуклеарных фагоцитов*

Не отрицая точки зрения отдельных авторов о стадийности дифференцировки макрофагов как одной из причин их гетерогенности, мы склонны предполагать, что в основном она обусловлена органоспецифическими особенностями этой многочисленной клеточной популяции.

Исследование этого вопроса в условиях антигенной стимуляции нам представляется особенно важным в плане выявления тех морфофункциональных особенностей макрофагов различной тканевой локализации, которые не проявляются в норме [5].

В настоящей работе представлены результаты изучения морфофункциональных признаков наиболее активных представителей системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) в условиях антигенной стимуляции (макрофагов печени и селезенки) на предмет определения закономерности между изменением фагоцитарной активности макрофагов и содержанием в них маркерного фермента лизосом (кислой фосфатазы) и выявления контактов активированных макрофагов с окружающими тканевыми элементами.

Материал и методика. Для эксперимента были использованы беспородные белые крысы (27) и мыши (17) обоего пола, которых иммунизировали внутрибрюшинным введением 0,5 мл 6%-ной (мышам) и 8%-ной (крысам) взвеси эритроцитов барана. Крыс забивали на 5-7, 14 дни, мышей на 4-7 дни опыта.

Исследования проводили электронномикроскопическими, гистохимическими и морфометрическими методами.

Результаты и обсуждение. Выявлена высокая фагоцитарная активность макрофагов печени в течение всего периода эксперимента. В отдельных наблюдениях содержание макрофагов со сверхинтенсивной фагоцитарной функцией превосходит контрольные показатели в 2-3 раза. Между фагоцитарной активностью и содержанием фермента в макрофагах печени и селезенки прямой корреляции не наблюдали. Так, на 7 день опыта при максимальной активации фагоцитоза отмечалось сравнительное снижение содержания кислой фосфатазы. Возможно, это обусловлено тем, что при значительном возрастании фагоцитарной функции клетки расходует большое количество фермента, превышающее ее синтетические

возможности. Затем по мере снижения фагоцитарной активности и соответственно уменьшения расхода фермента содержание последнего в клетке постепенно возрастает (табл. 1).

Таблица 1. Морфофункциональная характеристика макрофагов печени и селезенки в условиях антигенной стимуляции

	Сроки	Кол-во жив.	Селезенка	КФМ±м	Печень	КФМ±м
Крысы	Контроль	5	7.8±0.17	166±4.7	7.13±0.3	159±11
	5-7	9	9.2±0.91*	221±6.6*	10.1±0.2	283±10
	14	6	9.1±0.18*	343±14.9*	8.3±0.08	188±5.1*
Мыши	Контроль	5	10.3±0.18	102±8.1	13±0.3	301±12.3*
	4-7	9	11.1±0.7	186±6.1	17±0.3	
	9	6	11±0.3	217±4.3	16±0.6	

Примечание: * $p < 0.001$

Наряду с возросшим содержанием лизосом, среди которых преобладали вторичные, в цитоплазме клетки мы наблюдали многочисленные вакуоли, что свидетельствует об активации в ней метаболических процессов, отмечались также тесные контакты макрофагов с гепатоцитами, иногда с лимфоидными клетками и очень часто с лаброцитами или их гранулами.

Полученные данные свидетельствуют о широком спектре функциональных признаков макрофагов. Участвуя вместе с гепатоцитами в выполнении основных функций печени, о чем свидетельствуют постоянные тесные контакты, наблюдаемые и в норме, активированные макрофаги печени находились в тесных контактах и с другими клетками. В литературе имеются сообщения о контактах макрофагов с тучными клетками [1], однако окончательного объяснения этому цитотопографическому признаку нет. Поскольку печень является органом, синтезирующим гепарин и макрофаги обладают способностью фагоцитировать их гранулы, можно предположить, что вместе с гепатоцитами и лаброцитами они образуют единую систему, регулирующую гепариновый обмен.

Макрофаги селезенки также характеризуются высокой активностью (табл.). С 5-7 дня опыта наблюдалась сильная активация их основных морфологических признаков: на поверхности клетки появлялись в большом количестве широкие клапанообразные вздутия, гребневидные выросты, выемки. В цитоплазме отмечалось значительно возросшее число лизосом различных размеров с преобладанием вторичных.

Фагоцитарная активность макрофагов селезенки резко возрастала с первых дней опыта, достигала максимума на 7-9 дни, что коррелирует с морфологической активацией клетки.

Электронномикроскопически нами обнаружены часто встречающиеся тесные контакты макрофагов с лимфоидными клетками, а также с эозинофилами. Участие последних в иммунных реакциях до настоящего времени не выяснено окончательно, хотя и отмечается наличие у них фагоцитарной функции [2], способности фагоцитировать, образовывать комплексы антиген-антитело [3, 4], а также регулировать

процессы пролиферации лимфоцитов [6, 7]. Эти особенности эозинофилов, возможно, и объясняют в некоторой степени их тесные контакты с макрофагами — клетками, фагоцитирующими и перерабатывающими антиген и регулируемыми, вероятно, совместно с эозинофилами процессы пролиферации и дифференцировки лимфоидных клеток, тем более что мы часто наблюдали контакты трех отмеченных клеточных типов. Выраженность этого явления в селезенке объясняется тем, что именно в лимфоидном органе создаются наиболее благоприятные условия для проявления указанных клеточных взаимодействий.

Итак, полученные данные свидетельствуют о полифункциональных возможностях макрофагов, выявляемых в условиях целого организма и не ограничивающихся только фагоцитозом. Являясь наиболее активной клеточной популяцией, макрофаги печени и селезенки достигают в условиях антигенной стимуляции максимальной активности всех своих основных морфофункциональных признаков, проявляющихся также в контактах с окружающими клетками.

ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов В.В., Воробьева Н.Ф. Тучные клетки. М, 1973.
2. Карр Ян. Макрофаги /обзор ультраструктуры и функции/. М, 1978.
3. Хэм А., Кормак Д. Гистология. 2, 1983.
4. Farzan-M, CHoe-H, Martin-K.A, Sun-Y, Sidelko-M, Mackay-C.R, Gerard-N.P, Sodroski-J, Gerard-C. J-Biol-Chem, 14, 272(11), 6854-7, 1997.
5. Gomez -Villamandos. J C., Hervas-J, Moreno-C, Carrasco-L, Bautista-MJ, Caballero-JM, Wilkinson-PJ, Sierra-MA. Vet-Res, 28 (2), 179-89, 1997.
6. Rana-S, Besson-G, CXook-DG, Rucker-J, Smyth-RJ, Yi-Y, Turner-JD, Guo-HH, Du-JG, Peiper-SC, Lavi-E, Samson-M, Libert-F, Liesnard-C, Vassart-G, Doms-RW, Parmentier-M, Collman-RG. J-Virol, 71 (4), 3219-27, 1997.
7. Romesh K., Pincus S., H., Rockin R. E.Cell immunol, 92, 2366-375, 1985.

Поступила 12.VII.1999

ХИМИОТЕРАПИЯ И АКТИВНОСТЬ ЕСТЕСТВЕННЫХ КИЛЛЕРНЫХ КЛЕТОК ПРИ ТУБЕРКУЛЕЗЕ

М.А. КАРАЛЯН

Противотуберкулезный диспансер МЗ РА, 378510, Абовян

*Туберкулез - естественные киллерные клетки - естественный иммунитет
- противотуберкулезная химиотерапия*

В последние годы возрос интерес врачей и ученых к проблемам иммунитета при туберкулезе [9, 11, 14]. При этом особое значение имеет проблема химиотерапии туберкулеза и ее влияние на иммунную систему человека [2, 9, 10, 11, 13]. В работах 80-х годов иммунологическому статусу отводилась роль преимущественно контроля за терапией туберкулеза [9, 11, 12]. В дальнейшем была пересмотрена роль иммунной системы и, в частности, естественного иммунитета в развитии и течении туберкулезного процесса. В более поздних работах предпринимаются попытки по иммунотерапии туберкулеза [2]. Заметим, что во всех работах по иммунологии туберкулеза приоритет отдается естественному иммунитету, и в частности системе мононуклеарных фагоцитов. Лишь в некоторых из них рассматриваются взаимодействия лимфоцитов и макрофагов при туберкулезном процессе [4, 15]. К сожалению, практически не изучена проблема влияния такого важного звена естественной резистентности, как естественные киллерные клетки (ЕКК) при туберкулезном процессе [16].

ЕКК вместе с системой мононуклеарных фагоцитов осуществляют самый ранний этап противоопухолевой защиты. Их активность по отношению к инфекционным агентам изучена слабее, однако без предварительной иммунизации способность их к лизису практически всех чужеродных клеток позволяет считать это звено иммунитета чрезвычайно важным, особенно при первичном контакте с патогенными микроорганизмами.

В свете сказанного представлялось интересным изучение влияния воздействия различных противотуберкулезных химиопрепаратов на важное звено естественного иммунитета - активность ЕКК.

Материал и методика. Работа проведена в условиях *in vitro*, подобные исследования считаются целесообразными и применяются в экспериментальных и клинико-экспериментальных исследованиях [10, 12].

Изучали действие рифампицина и изониазида на цитотоксическое действие (ЦТД) ЕКК у доноров и больных различными формами туберкулеза. В эксперименте использовалась кровь больных до начала противотуберкулезной химиотерапии. С этой целью из крови больных с диагнозом фиброзно-кавернозного туберкулеза (n=30) и диссеминированного туберкулеза (n=11) выделяли мононуклеары по методу Воуит [7]. ЦТД ЕКК определяли по методу Гордиенко [1]. В качестве контроля использовалась кровь клинически здоровых доноров (n=29). Оба изучаемых препарата использовались в терапевтических дозах - 0,01 мг/мл. ЦТД ЕКК изучали при инкубации ЕКК с исследуемыми препаратами в течение 4 и 16 ч в атмосфере CO₂.

Результаты и обсуждение. Основной нашей задачей являлось изучение влияния химиотерапии на ЦТД ЕКК у больных с диагнозом фиброзно-кавернозного туберкулеза. Полученные данные приведены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК у больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом при 4-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	37,4±3,1	33,4±2,9	28,9±2,2*
Больные	30	28,7±1,9**	27,5±2,1	25,1±2,4

Примечание: * достоверно ($p<0,05$) по сравнению с контролем; ** достоверно ($p<0,05$) по сравнению с донорами.

Как видно из табл. 1, при фиброзно-кавернозном туберкулезе зафиксировано достоверное снижение активности ЕКК по сравнению с донорами. В то же время, в отличие от доноров, у больных с этим диагнозом отмечается отсутствие иммуносупрессивного действия химиопрепаратов на изучаемые показатели.

Таким образом, ни рифампицин, ни изониазид не оказывают иммуносупрессивного действия на ЦТД ЕКК у больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом при 4-часовой инкубации.

Таблица 2. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК у больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом при 16-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	42,1±4,8	35,7±3,9	30,4±2,9*
Больные	30	35,2±4,1	32,0±3,8	27,1±2,4

Примечание: * достоверно ($p<0,05$) по сравнению с контролем

Из табл. 2 следует, что при 16-часовой инкубации в контроле у больных с фиброзно-кавернозным туберкулезом в отличие от соответствующего показателя 4-часовой инкубации не отмечено достоверного снижения активности ЕКК по сравнению с донорами. В то же время, как и в предыдущем опыте, у больных отмечается отсутствие иммуносупрессивного действия химиопрепаратов на изучаемые показатели.

Мы изучили также влияние противотуберкулезной химиотерапии на показатели активности ЕКК у больных с диагнозом диссеминированного туберкулеза. С этой целью исследовали кровь 11 больных с этим диагнозом. Результаты исследований приведены в табл. 3.

Видно, что у больных выражен дефицит естественного иммунитета, проявляющийся в достоверном снижении ЦТД ЕКК, как в контроле, так и в группе эффекторных клеток, инкубировавшихся с изониазидом. В то же время действие рифампицина не вызвало достоверного снижения ЦТД ЕКК по сравнению с донорами.

Как видно из табл. 4, 16-часовая инкубация приводит к достоверному

снижению ЦТД ЕКК, как и в предыдущем опыте, у больных с диагнозом диссеминированного туберкулеза. Также заметно отсутствие воздействия рифампицина на активность ЕКК.

Таблица 3. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК у больных с диссеминированным туберкулезом при 4-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	37,4±3,1	33,4±2,9	28,9±2,2*
Больные	11	22,8±2,9**	20,5±2,1**	23,6±2,3

Примечание: * достоверно ($p<0,05$) по сравнению с контролем; ** достоверно ($p<0,05$) по сравнению с донорами.

Итак, изучение действия двух важных препаратов противотуберкулезной химиотерапии на показатели одного из звеньев естественного иммунитета показало общее иммуносупрессивное действие их, проявляющееся в достоверном снижении ЦТД ЕКК у доноров, при инкубации эффекторных клеток с рифампицином в течение 4 и достоверном снижении ЦТД ЕКК как у больных, и так у доноров при 16-часовой инкубации в условиях *in vitro*. В работе показано также, что изониазид не оказывает выраженного действия на активность ЕКК и вызывает лишь тенденцию к снижению ЦТД даже при 16-часовой инкубации.

Таблица 4. Влияние рифампицина и изониазида на активность ЕКК у больных с диссеминированным туберкулезом при 16-часовой инкубации

Группы	n	Активность ЕКК, %		
		контроль	изониазид	рифампицин
Доноры	29	42,1±4,8	35,7±3,9	30,4±2,9**
Больные	11	25,3±2,8**	24,1±3,1**	26,0±3,0

Примечание: * достоверно ($p<0,05$) по сравнению с контролем; ** достоверно ($p<0,05$) по сравнению с донорами.

Сравнение данных опытов с 4- и 16-часовой инкубацией позволяет сделать предположение о том, что в основном иммуносупрессирующее действие препаратов проявляется в первые 4 часа инкубации.

Нами показано, что, несмотря на общее иммуносупрессивное действие препаратов, проявляющееся в достоверном снижении ЦТД ЕКК у доноров, при инкубации эффекторных клеток с рифампицином, у больных туберкулезом различных форм они не вызывают достоверных сдвигов в показателях активности ЕКК. Более того, у больных с диссеминированной формой туберкулеза при воздействии рифампицина нет достоверных изменений в ЦТД ЕКК, в то время как в остальных случаях наблюдалась достоверная иммуносупрессия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гордиенко С.М. Лабор. дело, 9, 45-48, 1983.
2. Грачева М.П. Пробл. туберкулеза, 3, 60-64, 1980.
3. Сибирная Р.И. Проблемы туберкулеза, 9, 69-71, 1980.
4. Сокуренок Л.С., Морозов В.Л., Адамбеков Д.А., Ешеналиев М.К. Здравоохранение Киргизии, 2, 14-17, 1989.
5. Чернушенко Е.Ф., Шатров В.А., Беляновская Т.И., Кузнецова Л.В., Шпак О.И. Проблемы туберкулеза, 1, 59-63, 1986.
6. Шатров В.А., Кузнецова Л.В., Беляновская Т.И. Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 5, 76-78, 1985.
7. Boyum A. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 61, 4, 629-634, 1968.
8. Condos R., Rom W., Schluger N. Lancet, 5, 24; 349 (9064); 1513-1515, 1997.
9. Crowle A.J., Sharbaro J.A. Judson F.N., Douvas G.S., May M.H. Am. Rev. Respir. Dis., 130 (5) 839-844, 1984.
10. Crowle A.J. Semin. Respir. Infect., 1 (4), 262-264, 1986.
11. Gangadharm P.R., Pratt P.F. Am. Rev. Respir. Dis., 128 (6), 1044-1047, 1983.
12. Guillaumont M., Leclercq M., Frobett Y., Guise B., Harf R. J. Chromotogr., 12 232 (2), 369-376, 1982.
13. Isaeva E.G., Lapteva N.A. Probl. Tuberk. 6, 59-64, 1984.
14. Lagrange P.H., Hurtrel B., Brandley M., Thickstun P.M. Bull. Eur. Phisiopathol. Respir., 19 (2), 163—172, 1983.
15. Schwander S.K., Sada E., Torres M., Escobedo D., Sierra J.G., Alt S., Rich E.A. J. Infect. Dis., 173 (5), 1267-1272, 1996.
16. Stach J.L., Gros P., Forget A., Skamene E. J. Immunol., 132 (2), 888-892, 1984.

Поступила 12.VII.1999

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

Աղահավանք • Обзоры • Reviews

УДК 615.276.4

**ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ И НЕСПЕЦИФИЧЕСКАЯ
РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОРГАНИЗМА**

А.С. АГАБАЛЯН

Ереванский государственный медицинский университет, 375025

Проведен обзор литературных данных, посвященных проблемам стимуляции неспецифической резистентности организма. Обсуждаются механизмы действия и показания к применению используемых в настоящее время иммуномодуляторов. Показана высокая эффективность иммуномодуляторов различной природы при заболеваниях, сопровождающихся нарушениями иммунного статуса и иммунодефицитах. Обсуждаются вопросы иммунокоррекции при иммунологической недостаточности. Особое внимание уделяется проблеме цитокинов.

Աշխատանքում ամփոփված են գրականության տվյալները, որոնք նվիրված են օրգանիզմի ոչ սպեցիֆիկ դիմադրողականության խթանմանը: Բննարկվում են ներկայումս օգտագործվող իմունոմոդուլյատորների ազդեցության մեխանիզմը և կիրառման ցուցումները: Ցույց են տրված տարբեր բնույթի իմունոմոդուլյատորների բարձր արդյունավետությունը այն հիվանդությունների ժամանակ, որոնք ուղեկցվում են իմունոստատուսային և իմունոդեֆիցիտային խանգարումներով: Բննարկվում են իմունոկարգավորման հարցեր իմունոլոգիական անբավարարության ժամանակ: Զատուկ ուշադրություն է դարձվում ցիտոկինների պրոբլեմին:

A review of literature data, devoted to problems of stimulation of nonspecific resistance of organism, was carried out in the work. The mechanisms of functioning, directions for use of immunomodulators at present, are discussed. The high effectiveness of immunomodulators of different origins is shown in case of illnesses, accompanied by violations of immune status and immunocorrection. Also, the problems of immunocorrection of ill patients with immunological insufficiency are discussed. A special attention is paid to the problem of cytokines, one of the most important factors of natural protection of organism.

Иммуномодуляторы - резистентность организма - цитокины - иммунокоррекция

В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что неспецифическая защитная реакция является ранним стереотипным ответом организма на нарушение гомеостаза и от степени ее интенсивности и завершенности зависит устойчивость к патогенным воздействиям.

Ряд причин и в первую очередь такие, как ослабление естественного отбора, широкое и во многих случаях неоправданное применение антибиотиков, загрязнение окружающей среды, привели к тому, что у большинства людей иммунная система слабо реагирует на внедрение инфекционных агентов. В результате существенно изменилось течение многих инфекционных заболеваний. Отмечены частые переходы инфекционных заболеваний в затяжные и хронические формы, наблюдается возросшее число заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. Все чаще встречаются заболевания, которые ранее относились к редко встречающимся (плазмоз, герпес половых органов и др.). Возросли ситуации, в которых самые современные антибактериальные и противовирусные препараты оказываются

малоэффективными для полного прекращения инфекционного процесса, переводя его из острой формы в затяжную. Течение инфекционного процесса осложняется, а трудности терапии значительно усугубляются при поражении иммунной системы и механизмов неспецифической защиты. Эти нарушения могут быть обусловлены генетически (первичные иммунодефициты) или же возникают вторично под влиянием разнообразных факторов (вторичные иммунодефициты) [23, 26, 30, 36].

Иммунодепрессию различного характера и глубины вызывает уже сама инфекция: бактериальная (особенно гнойная), вирусная и протозойная. Обнаружена зависимость между вирулентностью штаммов бактерий и степенью выраженности индуцированной ими иммунодепрессии, являющейся важным фактором патогенности и основным условием формирования хронического инфекционного процесса. Иммунологическая недостаточность, как правило, сопровождается болезнями, связанными с нарушением питания, развитием злокачественных новообразований, хронической патологией печени, почечной недостаточностью, сахарным диабетом, старением, стрессом и т.д. [17, 18, 20, 21, 25, 32]. Она проявляется также при гипербарической оксигенации, длительной гипертонии, бронхиальной астме, хронических бронхитах, выраженной интоксикации и т.д. [12, 14, 15, 38, 39].

В появлении иммунологической недостаточности особую роль играют иммунодепрессивные средства, которые одновременно с подавлением специфического ответа при аллотрансплантации и лечении аутоиммунных заболеваний вызывают подавление противoinфекционных механизмов, в результате чего формируется высокая восприимчивость к инфекции. Нужно отметить, что кроме классических иммунодепрессоров (антиметаболиты, алкилирующие агенты, глюкокортикостероиды, радиация и др.) аналогичной способностью в определенной степени обладают антигистаминные, противовоспалительные средства, антикоагулянты и другие химические соединения [24, 27, 28].

На этом фоне все большее значение приобретают препараты, стимулирующие работу иммунной системы, активирующие факторы естественной неспецифической резистентности организма, - так называемые иммуномодуляторы, или иммуностимуляторы, которые из разряда вспомогательных средств переходят в категорию существенно важных в системе профилактики и терапии инфекционных и других заболеваний [10, 19, 33, 35, 37].

Кроме стимуляции неспецифической резистентности, коррекции нарушений противoinфекционных механизмов и повышения эффективности антибактериальной терапии, иммуномодуляторы оказались весьма ценными для усиления специфической иммунотерапии и иммунопрофилактики, экстренной индукции неспецифической резистентности в эпидемически опасной ситуации, при появлении неидентифицированного возбудителя и т.д.

Было показано, что наряду с активацией моноклеарной фагоцитирующей системы, являющейся главным звеном в повышении неспецифической резистентности организма, различные стимуляторы в неодинаковой степени влияют на разные компоненты и этапы иммунного ответа [13,22]. Это создает возможность дифференцированного их применения. Однако селективная стимуляция различных звеньев иммунитета целесообразна при иммунодефицитах, некоторых аутоиммунных заболеваниях, инфекциях. Такая избирательность в действии иммуностимуляторов, с одной стороны, и определенная селективность в действии иммунодепрессоров - с другой, стала теоретической основой для разработки комбинаций препаратов обеих групп и режимов их использования с целью одновременного или последовательного выключения одних механизмов иммунитета и активации других, что и составляет основные направления иммунофармакологии.

Иммунный ответ, биологический смысл которого состоит в защите организма от генетически чужеродной информации (инфекционные агенты, трансплантированные чужеродные органы и ткани, опухолевые клетки и др.), представляет собой сложный многокомпонентный процесс. Многокомпонентность системы иммунитета создает принципиальную основу для попыток селективного вмешательства в те или другие этапы иммунитета. Стратегия вмешательства в деятельность иммунной системы в первую очередь зависит от того иммунологического дефекта, который нуждается в коррекции. С этой целью могут применяться как разнообразные лекарственные препараты, обладающие иммунотропной активностью, так и немедикаментозные

методы воздействия.

Существуют два основных варианта иммунотерапии и иммунопрофилактики: специфическая (вакцины и иммунные сыворотки) и неспецифическая, при которой используются иммуномодуляторы [11]. Иммуностимуляторы, принимая участие практически во всех иммунных реакциях, могут увеличивать образование антител, стимулировать фагоцитоз, усиливать цитопатическую активность лимфоцитов, подавлять гиперчувствительность замедленного типа, влиять на процессы реализации иммунологической памяти.

Известные иммуномодуляторы представлены широким кругом соединений природного и синтетического происхождения, которые подразделяются на три класса:

- эндогенные иммуномодуляторы - медиаторы иммунного ответа - цитокины (интерфероны, интерлейкины, колониестимулирующие факторы активации макрофагов, фактор некроза опухолей, эритропоэтины, миелопептиды и т.д.);

- экзогенные иммуномодуляторы естественного происхождения, в том числе вирусы, бактерии, простейшие и выделенные из них компоненты (эндотоксины, одно- и двухспиральные рибонуклеиновые кислоты, продигозан, сальмозан, зимозан, липополисахариды и др.);

- синтетические высоко- и низкомолекулярные иммуномодуляторы, обладающие, кроме иммуномодулирующих, рядом других эффектов. В эту группу входят синтетические аналоги нуклеиновых кислот, поверхностно-активные вещества (адаптогены, минеральные соли, поликарбонаты, производные пирана, фосфорорганические соединения и т.п.).

Помимо иммуномодулирующего действия, некоторые соединения второго и третьего классов обладают способностью включать систему интерферона, что позволяет рассматривать их в качестве индукторов интерферона (дсРНК, эндотоксины бактерий, липополисахариды и др.) [4, 5, 8].

Иммуномодуляторы, отобранные для клинического использования, могут применяться как для лечения иммунодефицитных состояний, вызванных различными вирусными инфекциями, так и для предупреждения инфекционных заболеваний у лиц с врожденными иммунодефицитами. Основные препараты, механизм действия и показания к их применению представлены в таблице 1.

Таблица 1. Механизм действия иммуномодуляторов, используемых в клинической практике

Препарат	Основной механизм действия
Диуцифон Левамизол	Стимуляция, нормализация функций Т-лимфоцитов и фагоцитов
Инозиплекс Миелопептил	Стимуляция Т-лимфоцитов Стимуляция В-лимфоцитов
Дибазол Липополисахарид Метилурацил Пентоксил Пирогенал Продигозан Сальмозан	Усиление фагоцитоза и продукции антител, стимуляция лейкопоэза и киллерной активности и моноцитов крови
Интерлейкины -4,5,6	Дифференцировка В-лимфоцитов
Тактивин Тималин Тимозин Тимотропин	Нормализация функций различных популяций Т-лимфоцитов, стимуляция продукции интерлейкинов - 1,2,3 и киллерной активности клеток лимфатических узлов
Индукторы интерферона	Включение системы интерферона
Интерфероны	Плеотропные лимфокины (описано множество эффектов)

При использовании иммуномодуляторов наиболее важным является точное знание клеточ-мишеней, на которые они направлены и селективно воздействуют. Так, известно, что бактериальные продукты (липополисахариды, сальмозан, продигиозан и др.) действуют на макрофаги, интерлейкины 4, 5, 6 - на рост и дифференцировку В-лимфоцитов, тимические пептиды (тимозин, тимопозтин, тималин, тактивин), левамизол, фитогемагглютинин, интерлейкины 1, 2, 3 - на различные субпопуляции Т-клеток и т.д.

Несмотря на широкий список иммуномодуляторов, большинство из них по ряду параметров (токсичность, малая эффективность, недостаточная изученность, стоимость) не могут быть использованы в медицинской практике. В то же время показано, что их применение обосновано и перспективно для профилактики и лечения широкого круга острых и хронических вирусных инфекций, особенно таких, против которых пока не разработаны или малоэффективны существующие средства специфической профилактики (респираторные и кишечные инфекции, вирусные гепатиты, герпес, СПИД). Диапазон противовирусной активности иммуномодуляторов приведен в табл. 2.

Таблица 2. Спектр противовирусной активности иммуномодуляторов

Заболевания	Иммуномодулирующие препараты
Герпетические заболевания	Левамизол, миелопептид, интерферон
Вирусные гепатиты	Дибазол, интерферон
Грипп, ОРЗ, пневмония	Дибазол, продигиозан, левамизол, интерферон
ВИЧ-инфекция	Тактивин, тималин, тимоген, интерферон
Гнойные инфекции	Диуцифон, метилурацил, пентоксил, пирогенал, продигиозан, нуклеинат натрия, дрожжевая РНК
Первичные и вторичные иммунодефициты	Тактивин, тимозин, тималин, тимотропин

Особую ценность эти препараты приобретают при длительно текущих вирусных инфекциях, приводящих к развитию вторичных иммунодефицитов. Последние развиваются вследствие вызванных вирусами дисфункций мононуклеарных фагоцитов, клеток миелопозитической системы и естественных киллеров, нарушения регуляции функций иммунокомпетентных клеток и т.д.

Кроме перечисленных выше иммуномодуляторов, нужно также отметить лекарственные средства: интраглобулин-Ф, сандоглобулин (аналоги ИгГ) - показаны для профилактики и лечения инфекций, при хроническом лимфолейкозе. Препарат пентаглобулин (ИгМ) используют для заместительной терапии и стимуляции фагоцитов. В настоящее время осуществлен синтез препаратов цитокинов - роферон, интерлейкины - 1, 2 и их комбинации (лейкинферон).

Для стимуляции противомикробного иммунитета используют препараты, разработанные на основе микробных гликопротеинов (гликопин) и рибосом (рибомунил). Они повышают фагоцитарную активность, стимулируют синтез эндогенного интерферона, интерлейкинов - 1, 2, продукцию ИгА и т.д. [1, 9, 16, 40].

В качестве иммуномодуляторов особый интерес представляют препараты низкомолекулярных нуклеиновых кислот: нуклеинат натрия, ларифан, ридостин кальциевый преципитат дсРНК. Препараты рибонуклеиновых кислот обладают способностью стимулировать первичный и вторичный иммунные ответы, активировать фагоцитоз и макрофагальную реакцию. Установлено, что Ca^{2+} - дсРНК индуцирует синтез эндогенного интерферона, ингибирует рост опухоли в экспериментальных условиях, подавляет размножение вируса ящура, ускоряет процесс заживления ран различного происхождения, обладает радиопротекторным действием, повышает активность факторов неспецифической защиты организма [2, 3, 6, 7, 29, 31, 39].

Способность индуцировать синтез гаммаферона (интерферон- γ) и подавлять рост злокачественной экспериментальной опухоли обнаружена у эндотоксина *B. thuringiensis*.

В заключение нужно сказать, что иммуномодуляторы используются в разных областях медицины с различной целью - для усиления неспецифической резистентности организма к инфекции и эффективности химиотерапевтических средств, для коррекции иммунодепрессивной терапии в онкологии и гематологии, лечения ряда аутоиммунных заболеваний. Значение иммуностимуляторов возрастает и в связи с необходимостью устранения побочных эффектов иммуносупрессоров при трансплантации органов и тканей и лечении лейкозов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А.С., Аветисян И.В., Карагезян К.Р. Нейрохимия, 2, 207-209, 1998.
2. Агабян А.С., Агабян А.М., Давтян О.Я. и др. ДНАН Армении, 2, 166-169, 1998.
3. Агабян А.С., Давтян О.Я., Багдасарян А.А. и др. ДАН Арм.ССР, 1, 31-35, 1989.
4. Агабян А.С., Захарян Р.А., Маркарян А.П. ДНАН Армении, 1, 62-64, 1996.
5. Агабян А.С., Захарян Р.А., Месропян Н.П. Журн. клин. эксп. мед., 6, 559-562, 1985.
6. Агабян А.С., Рухкян Л.А., Захарян Р.А. ДАН Арм.ССР, 2, 93-96, 1989.
7. Агабян А.С., Туманян М.А., Захарян Р.А. ДНАН Армении, 4, 363-366, 1998.
8. Агабян А.С., Казарян П.А. В кн.: Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины, 24-35, Ереван, 1998.
9. Агабян А.С., Казарян А.В. В кн.: Вирусные инфекции. Эпидемиология и профилактика, 261-262, Санкт-Петербург, 1999.
10. Агабян А.С., Назаров Л.У., Акопян Э.Б. и др. ДАН Армении, 3, 173-177, 1993.
11. Алехин Е.К. Антибиотики, 3, 74-79, 1982.
12. Варгин В.Р., Семенов Б.Ф. В кн.: Иммунология инфекционного процесса, 178-192, М., 1993.
13. Вережкина К.Н., Даниленко Е.Д., Костамаха А.Н. и др. Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол., 5, 69-72, 1988.
14. Земсков А.М. Иммунология, 4, 83-84, 1984.
15. Йегер Л. В кн.: Иммунная система человека, 131-138, М., Медицина, 1996.
16. Казарян Г.С. Ежегодник Академии хирургических наук, 4, 63-68, 1998.
17. Лазарева Д.Н., Алехин Е.К. В кн.: Стимуляторы иммунитета, 15-45, М., Медицина, 1987.
18. Литвинов В.И., Авербах М.М., Марков А.Н. и др. В кн.: Актуальные вопросы иммунологии, 1, 120-122, М., 1981.
19. Островский А.Б. Тер. архив, 2, 37-40, 1986.
20. Петров Р.М. В кн.: Иммунология, 134-152, М., Медицина, 1987.
21. Покровский В.Н., Литвинов В.И., Герцерт В.Я. и др. В кн.: Иммунология инфекционного процесса, 256-259, М., 1993.
22. Провоторов В.М., Земсков А.М., Никитин А.В. и др. Иммунология, 1, 75-79, 1984.
23. Ройт А. В кн.: Основы иммунологии, 93-112, М., Мир, 1991.
24. Самсонов В.А., Чистякова И.А. Вест. дерматол. и венерол., 1, 46-48, 1991.
25. Сапин М.Р., Этинчен Л.Е. В кн.: Иммунная система человека, 153-174, М., Медицина, 1996.
26. Серебрянский Ю.В., Афанасьев С.С., Денисов Л.Л. и др. Военн. мед. журнал, 3, 41-51, 1999.
27. Ткач С.М., Бычкова Н.Г., Блаженко И.Л. Врач. дело, 9, 58-62, 1989.
28. Утешев Б.С. Пат. физиол., 3, 71-78, 1981.
29. Фазина В.А., Разворотнев В.А. Антибиотики и химиотерапия, 7, 527-530, 1988.
30. Щелкунов С.Н. Вест. Росс. АМН, 3, 24-29, 1998.

31. Agabalyan A.S., Zakharyan R.A., Akopyan J.I., et al. In: International small conference "Brain and immune system", 2, Yerevan, 1997.
32. Bocci V. Immunomodulation: New Frontiers and advances Proc. of asymp. On Recent advances on immunomodulators, 131-154, New York, 1984.
33. Bribanti S., Yarson J., Foli M. Stal., Gastroenterology, 1077, 812-817, 1994.
34. Davtyan O.Y., Bagdassarjan A.A., Agabalyan A.S. et al. 3-rd Biennial congress to the European council coloproctology, 44-45, Berlin, 1990.
35. Hubbett H.R., Kvalnes-Krick K., Carter W. Cancer. Res., 45, 2481-2486, 1985.
36. Lieberman A.P., Pitha P.M., Shin H.S. et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 86, 6348-6352, 1989.
37. Sedman P.C., Ramsden C.W., Brennan T.G. et al. Br. Journ. Surg., 75, 976-981, 1988.
38. Serrou B., Rey A., Cupissol D. et al. In: New immunomodulating agents and biological modifiers, 5, 62-72, 1982.
39. Tufano M.A., Cipollero de L' Ero G. Immunopharmacol. Immunotoxicol, 14, 769-782, 1992.
40. Zavyalov V.P., Navolotskaya E.V., Abramov V.M. et al. FEBS lett., 278, 187-189, 1991.

Поступила 2 IV. 1999

Биолог. журн. Армении, 1-2 (53), 2001

УДК 577.212.175.3

ЭКСПРЕССИЯ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*

В.Е КАРАПЕТЯН

Институт биохимии НАН РА, 375014, Ереван

Использование технологии получения рекомбинантной ДНК сделало возможным получение бактериальных штаммов, продуцирующих различные биологически активные белки и пептиды. Экспрессия эукариотических генов в штаммах *Escherichia coli*, помимо решения некоторых фундаментальных задач молекулярной биологии, позволяет решать и некоторые прикладные задачи медицины и других областей деятельности человека. В клетках микроорганизмов используются два основных пути экспрессии чужеродных генов: прямая экспрессия и экспрессия гибридных генов. Первый способ используется для получения экспрессии белков, которые стабильны в клетках бактерий и менее чувствительны к протеолитической деградации. Второй путь используется для экспрессии пептидов. Ген экспрессируемого эукариотического пептида соединяется с геном бактериального белка и регуляторным элементом бактерии. Бактериальный белок в таком случае называется белком носителем, или буферным белком. Гибридный белок устойчив в клетках микроорганизмов и может накапливаться в больших количествах.

Ուեկոմբինանտ ԴՆԹ-ի ստացման տեխնոլոգիայի կիրառումը հնարավոր է դարձրել տարբեր կենսաբանական ակտիվ սպիտակուցներ և պեպտիդներ արտադրող բակտերիալ շտամների ստացումը: Էուկարիոտիկ գեների արտահայտումը *Escherichia coli* բջիջներում թույլ է տալիս մոլեկուլային կենսաբանության մի շարք հիմնադրային խնդիրներին զուգահեռ լուծել մալ կիրառական հարցեր կապված բժշկության և ժողովրդական տնտեսության այլ ոլորտների հետ: Մանրէների բջիջներում օգտագործվում են օտարածին գեների արտահայտման 2 հիմնական

ուղիներ ուղղակի արտահայտում և հիբրիդային գեների արտահայտում: Առաջին եղանակը կիրառվում է սպիտակուցների արտահայտման համար, որոնք կայուն են բակտերիաների բջիջներում և ավելի քիչ զգայուն պրոտեոլիտիկ քայքայման նկատմամբ: Երկրորդ եղանակն օգտագործվում է պեպտիդների լեպտոսիսի համար: Արտահայտվող էուկարիոտիկ պեպտիդի գենը միացվում է բակտերիալ սպիտակուցի գենի և բակտերիալ կարգավորիչ էլեմենտի հետ: Այդ դեպքում բակտերիալ սպիտակուցը կոչվում է կոդը կամ բուֆերային սպիտակուց: Հիբրիդային սպիտակուցը կայուն է մանրէների բջիջներում և կարող է արտադրվել մեծ քանակությամբ:

The use of recombinant DNA technology makes possible to construct bacterial strains, producing different biologically active proteins and peptides. The expression of eukaryotic genes in *Escherichia coli* strains besides of some fundamental problems of molecular biology permits to solve the applied problems of medicine and other spheres of human activity. There are two main ways of expression of heterologous genes in cells of microorganisms: direct expression and expression of hybrid genes. The first method is used for obtaining of protein expression, which are stable in bacteria and are less sensitive to proteolytic degradation. The second method is used for the expression of peptides. The hybrid gene is expressed under the control of bacterial regulatory elements. Hybrid protein is stable in microbial cells and can worked out in large number.

Экспрессия - гибридный белок - векторы - секреция - бактерии - промотор - эукариотические гены

При экспрессии эукариотических генов в клетках микроорганизмов необходимо получить последовательность, в которой регуляторные элементы прокариот соединены с эукариотическим геном. Для клонирования небольших пептидов ген нужного пептида соединяют с кодирующей последовательностью одного из белков микроорганизма так, чтобы эукариотический ген попал в рамку считывания эндогенного белка. При этом транскрипция регулируется бактериальным промотором и синтезируется гибридный транскрипт, трансляция которого приводит к синтезу гибридного белка: бактериальный белок-эукариотический белок. Кодированный гибридным геном белок устойчив в клетке хозяина и может нарабатываться в больших количествах.

Исследование экспрессии генов эукариот в клетках микроорганизмов представляет интерес по ряду причин. Они способствуют решению некоторых фундаментальных вопросов молекулярной биологии. Огромный интерес представляет и практическая сторона. Экспрессия гетерологичных генов в бактериальной клетке открывает качественно новые перспективы в производственном получении важных для человека белковых физиологически активных веществ.

Для правильной экспрессии чужеродной ДНК, в особенности эукариотического происхождения, предстоит решить ряд сложных проблем. Необходимыми условиями экспрессии генов является стабильная репликация чужеродной ДНК в клетке, правильный контроль транскрипции гена, трансляция мРНК на рибосомах, процессинг белка в конечную зрелую форму. Экспрессия гена может регулироваться на всех перечисленных уровнях. Экспрессия структурных генов прокариот зависит от регуляторных участков: промоторов, операторов, участков связывания рибосомы. Для достижения эффективной экспрессии эукариотических генов в бактериях необходимо, чтобы конструкция "экспрессируемых плазмид" максимально приближалась к организации участков "промотор-ген" у прокариот. Логическим решением этой проблемы является соединение *in vitro* интересующих исследователя генов с высокоэффективными промоторами бактерий и фагов, таких как промотор *lac* оперона, *trp* оперона, P_L и P_R промоторы фага λ . Поскольку эукариотическим генам не предшествует область, кодирующая подходящие для *E.coli* последовательности Шайна-Далгарно, для экспрессии в клетках кишечной палочки эукариотических генов необходимо конструирование эффективных участков инициации трансляции, что является одним из способов увеличения уровня экспрессии генов.

Принцип слитых (гибридных) белков. Некоторые эукариотические белки, такие как гормон роста [14], β -глобин [15], инсулин и другие удалось получить с высоким выходом подстраиванием исследуемого гена под сильный бактериальный промотор с образованием гибридных участков инициации трансляции. Этот способ экспрессии эукариотических генов называется прямой экспрессией. Такой подход оказывается неприемлемым для синтеза многих пептидов. В частности, короткие чужеродные пептиды, синтезированные в *E.coli*, подвергаются протеолитической деградации [33]. Для повышения стабильности пептидных

продуктов в клетках микроорганизмов используют метод экспрессии пептидов в составе гибридных белков или мультимерных комплексов. Принцип метода состоит в том, что ген нужного пептида соединяют с кодирующей последовательностью одного из белков микроорганизма так, чтобы эукариотический ген попал в рамку считывания эндогенного белка. При этом транскрипция регулируется бактериальным промотором и синтезируется гибридный транскрипт, трансляция которого приводит к синтезу гибридного белка: бактериальный белок-эукариотический белок. Кодируемый гибридным геном белок устойчив в клетке хозяина и может нарабатываться в больших количествах. Из этих двух подходов экспрессии эукариотических генов в клетках бактерий мы остановимся на рассмотрении второго - образования слитых (гибридных) белков. Необходимо отметить, что первые работы по экспрессии эукариотических генов с получением гибридных белков имели своей целью показать принципиальную возможность экспрессии генов в бактериальной клетке, а не получение конечного биологически активного продукта. Так, впервые метод применен для экспрессии синтетического гена соматостатина в клетках *E.coli* [18]. Ген соматостатина клонировался в плазмиде pBR322, содержащей регуляторную область лактозного оперона и кодоны для первых 7 аминокислот β -галактозидазы. Однако гибридный белок все еще подвергался протеолитической деградации из-за небольшого размера. Для получения большого гибридного белка авторы переклонировали ген в плазмиду, содержащую регуляторные области оперона со значительной частью гена β -галактозидазы, что действительно привело к предохранению соматостатина от деградации. Расщепляли гибридный белок BrCN по остатку Met, предшествовавшему последовательности соматостатина. Выход соматостатина из гибридного белка составлял 0,001-0,03% от суммарного клеточного белка. Таким образом, размер гибридного белка оказывает влияние на степень деградации гетерологичного продукта в клетках микроорганизмов.

Выбор вектора для клонирования. В качестве векторов при клонировании гибридных генов в микроорганизмах обычно используют плазмиды небольшого размера, репликация которых находится под ослабленным контролем. Для селекции трансформантов и поддержки плазмиды в бактериальной популяции она должна нести один или несколько маркеров, по которым можно вести отбор, наконец, такая плаزمида должна содержать единичные уникальные сайты для ферментов рестрикции. Примером такой плазмиды является pBR322. Сайты рестрикции находятся в генах устойчивости к двум антибиотикам - ампицилину и тетрациклину. Когда в один из таких генов встраивается фрагмент чужеродной ДНК, ген инактивируется. Таким образом, успешное встраивание фрагмента чужеродной ДНК в один из этих генов легко детектировать по исчезновению у бактерий устойчивости к данному антибиотику. С другой стороны, когда такая плазмида попадает в бактериальную клетку, последняя становится устойчивой к тому антибиотику, который обезвреживается продуктом второго, интактного гена.

В настоящее время широко используются векторные плазмиды серии pUC [24]. В их состав входят синтетические полилинкерные участки с множеством уникальных сайтов рестрикции. Плазмиды pUC18 и pUC19 имеют большее число копий на клетку при 37°, чем родительская плазмида pBR322, что вызвано одиночной точечной мутацией в праймерной РНК II [23]. Описано два типа векторных систем, в которых трансляция клонированных генов регулируется поздним промотором фага T4. Первый тип характеризуется одновременным присутствием в бактериальной клетке как целевого гена, встроенного в многокопийную плазмиду, так и гена T7 РНК-полимеразы, находящегося в той же плазмиде или хромосоме хозяина. Однако имеющая место неполная репрессия гена полимеразы T7, контролируемая индуцибельным промотором *lac UV5*, приводит к синтезу фермента в количествах, достаточных для эффективной транскрипции целевого гена [18], что может препятствовать созданию плазмид с генами, продукты которых токсичны для клетки, или приводить к плазмидной нестабильности. Описано новое семейство экспрессионных плазмид такого типа. Плазмиды имеют область начала репликации *ori p15* и совместимы с плазмидами - производными ColE1. Это позволяет осуществить в одной клетке синтез белков с новых векторов и старых, основанных на ColE1 T7-экспрессионных векторов. Векторы являются среднекопийными и содержат область *ori* фага M13, что позволяет получить одно- и двунитевую ДНК. Плазмиды несут детерминант *Km^r* устойчивости к канамицину, что позволяет избежать их утраты, часто наблюдаемые в случае векторов с детерминантом *Ap^r*. Одна

из плазмид несет ген *lacI* для более строгой регуляции продукции токсичных белков [26].

Второй тип основан на раздельном введении генов в бактерию предварительно путем трансформации клеток *E.coli* с плазмидой с экспрессируемым геном и последующим инфицировании их бактериофагами T7 или λ , несущими ген РНК-полимеразы. Однако при использовании этих фагов как носителей гена РНК-полимеразы возникает ряд трудностей, связанных с быстрым лизисом бактериальных культур и сложностью подбора оптимальных условий инфицирования клеток. Указанные ограничения могут быть преодолены при использовании нитчатых бактериофагов, которые в процессе инфекции клеток *E.coli* не приводят к их лизису, а лишь несколько замедляют скорость роста инфицированных культур [19].

Выбор промоторов. Для эффективной экспрессии чужеродных генов используются сильные P_L и P_R промоторы фага λ . Была сконструирована серия плазмид рНУВ, содержащих P_L промотор фага λ [5, 7]. Плазмида содержит 4 одиночных сайта для рестриктаз, стабильна в лизогенных штаммах, но не трансформируется нелизогенно. Транскрипция с нерепрессивного P_L промотора влияет на какие-то свойства плазмиды, возможно на репликацию. Поэтому в нее встроены фрагмент, содержащий термочувствительный мутант гена *cI* репрессора. При 30° синтезируется нормальный *cI* репрессор и транскрипция с P_L промотора не происходит, а при 42° репрессор инактивируется и начинается интенсивная транскрипция. Для экспрессии фибробластного интерферона использовали промотор, контролируемый термочувствительным *cI* геном. В одном случае синтезировался гибридный белок из 82 аминокислот β -лактамазы-фибробластного интерферона, а в другом - 98 аминокислот MS2-полимеразы-интерферона. После индукции при 42° уровень экспрессии составил 100 000 ед/литр бактериальной культуры [12].

Для экспрессии в *E.coli* наиболее часто используются гены β -галактозидазы (*lac Z*), β -лактамазы (*bla*), антранилатсинтетазы (*trp*), щелочной фосфатазы, ген белка *A. S.aureus* и белка внешней мембраны *Omp F*.

Выбор *lac Z* и *trpE* обуславливается в частности тем, что промоторы этих генов P_{lac} и P_{trp} хорошо изучены, это сильные бактериальные промоторы, обладающие оперативными участками, позволяющими контролировать уровень экспрессии гибридного белка [31]. Осуществлена экспрессия в виде гибридных белков с использованием *lac* для некоторых эукариотических белков. При использовании химически синтезированного гена инсулина отдельно были получены гибридные белки для А и В цепей инсулина [11]. В виде гибридного белка с β -галактозидазой был получен β -эндорфин [30], урогастрон [32], синтетический ген ангиогенина человека [2]. Сконструированы новые векторы, содержащие гибридный T7 *lac*-промотор, обеспечивающие экспрессию белков типичных для *E.coli*. В этих векторах *lac*-оператор расположен на расстоянии 14 п.н. после участка инициации транскрипции РНК-полимеразы фага T7. Векторы отличаются более высокой копийностью. Используя их, получили продукцию различных белков с молекулярной массой от 10 до 150 кДа, в том числе несколько белков, токсичных для *E.coli*. Уровень экспрессии белков в растворимой форме повышается при культивировании клеток в течение ночи при 15° [28].

Сконструирован вектор рЕН1 для клонирования токсичных белков в клетках *E. coli*. Для строгой регуляции экспрессии авторы использовали векторы с промотором *lac*, а не *ara*. С 3'-стороны от промотора *Lac UV5* расположен сайт связывания рибосом и модифицированным геном *lac Z'* с уникальным сайтом для рестрикции *Nco I*. Вектор использовался для клонирования маннитпермеазы *E. coli* и адренергического рецептора β человека. Экспрессия индуцируется изопропил - β -D-тиогалактозидазой [17].

Экспрессию эукариотических генов получают также под контролем триптофанового промотора, который сильнее *lac* промотора. Изучена экспрессия эпидермального фактора роста крысы в виде гибридного белка, который состоит из 320 аминокислотных остатков *TrpE*, лизинового линкера и полипептида эпидермального фактора роста [13]. Полученный гибридный белок, образующийся в клетке, формирует нерастворимые тельца включения.

Получена рекомбинантная плазмида, обеспечивающая синтез в *E.coli* под контролем промотора P_{trp} химерного белка, состоящего из иммунного интерферона человека и С-концевой части α -фетопротенина человека. Показано, что продукция химерного белка существенно ниже продукции γ -интерферона при использовании тех же самых регуляторных элементов и условий

культивирования. Гибридный белок содержится преимущественно в тельцах включения [6].

Сконструированы векторы, в которых последовательности, кодирующие сигнальные пептиды трех секретируемых белков - щелочной фосфатазы (Pho A), белка внешней мембраны OmpA *E.coli* и белка A *S.aureus*, были помещены под контроль *trp* и *tac* - промоторов. Векторы использовались для получения экспрессии и секреции гормона роста человека. В периплазматической фракции штаммов, трансформированных различными плазмидами, кодирующими гибридные последовательности, определялся уровень накопления зрелого гормона роста методом иммуоферментного анализа. Наиболее высокий уровень был выявлен в периплазматической фракции штамма, содержащего гибридные последовательности Omp A - hGH - 3-5 мкг/мл бактериальной культуры [3].

Под контролем *tac*-промотора получена экспрессия заякоренной гидролазы фосфорорганических соединений на поверхности клеток *E. coli*. Наибольшее разложение паратиона наблюдалось у штамма *E. coli* Im105. Для образования активной гидролазы фосфорорганических соединений в среду для выращивания клеток добавлялся хлорид кобальта в поздней стационарной фазе роста [21].

Описаны рекомбинантные плазмиды, направляющие в *E. coli* синтез гибридных белков, содержащих часть щелочной фосфатазы *E.coli* и адренокортикотропный гормон 1-24 и 1-39 человека [10]. Но в этом случае гибридный белок остается в цитоплазме, формируя "тельца включения".

Выбор белка-носителя. Клетки *E.coli* содержат ферменты, отщепляющие N-концевой метионин, однако эти ферменты действуют не на все полипептиды в равной степени. Таким образом, белки полученные в результате прямой экспрессии эукариотических генов, могут содержать N-концевой метионин. Например, такая проблема возникла в случае экспрессии гормона роста человека [14]. Кроме того, чужеродные белки, особенно полипептиды небольшого размера, не обладающие компактной пространственной структурой, расщепляются протеазами *E.coli*. В случае высокого синтеза рекомбинантного продукта он может образовывать малорастворимые агрегаты, или тельца включения, и тогда требуются специальные методы для его перевода в растворимое состояние [20]. Наконец, экспрессии некоторых белков не удается достичь из-за их токсичности для клеток *E.coli* [29]. Многие из этих проблем позволяет решить секретиция белков через цитоплазматическую мембрану *E.coli* в периплазматическое пространство или во внешнюю среду. При секреции в периплазматическое пространство происходит процессинг сигнального пептида и рекомбинантный продукт накапливается в периплазме. В периплазме накапливается не только полный продукт, но и продукты его протеолитической деградации [4, 8]. Преимуществом секреции является упрощенное получение продукта, в частности, когда белок выделяется в культуральную жидкость. Секреторные белки более легко очищаются в одноступенчатой процедуре, но не все гетерогенные продукты эффективно секретируют, так что общий выход чужеродных белков в секретируемых системах может быть меньше, чем получаемый в интрацеллюлярном пространстве [27]. Получена секреция эпидермального фактора роста человека под промотором и лидером щелочной фосфатазы (AP) *E.coli* [27]. Секреция эпидермального фактора роста в периплазму составляла 95% и достигала 2 мг олигопептида на 1л бактериальной культуры. Следует отметить, что при "прямой" экспрессии эпидермального фактора роста под промотором щелочной фосфатазы без лидерной области AP продукт обнаруживается в меньших количествах (21 мкг/л) и полностью отсутствует в периплазме.

Грам-отрицательные бактерии секретируют непосредственно в культуральную среду только несколько белков, и в каждом случае задействованы различные, еще до конца не изученные механизмы [25]. В некоторых случаях секретируемые белки грам-положительных бактерий и их фрагменты секретируются в грам-отрицательных бактериях. Например, гибридные плазмиды, несущие промотор, сигнальную последовательность и tandem IgG-связывающих доменов белка A *S. aureus* и слитую с ним последовательность гена инсулин подобного фактора роста, способны обеспечить секрецию до 85% гибридного белка в культуральную среду [22]. Аналогичные результаты были получены и в случае гибридных белков, содержащих белок A и адренокортикотропный гормон человека [1]. Белок A - это мономерный белок, ковалентно связывающийся с пептидогликанами клеточной стенки у большинства штаммов *S. aureus*. Белку предшествует

сигнальный пептид, который отщепляется во время секреции. В N-конце белка находится участок, специфически связывающийся с константной частью иммуноглобулинов (фракция Fc) многих эукариот. Uhlen с сотрудниками [34] сконструировали две векторные плазмиды, содержащие ген, кодирующий белок А с целью получения гибридных белков, которые можно очистить с помощью аффинной хроматографии. Ген белка А был соединен с геном *lac Z E. coli*. Штаммы *E. coli*, содержащие такие плазмиды, продуцируют гибридный белок, обладающий способностью с IgG и β -галактозидазной активностью. Плазмиды, в которых отсутствовал C-конец белка А, продуцировали в 3-4 раза больше гибридного белка, чем плазмиды, содержащие C-конец (Х-домен) [34]. Сконструированы векторы для экспрессии гетерологичных белков, содержащие гексагистидиновую метку на N-конце. В большинстве изученных случаев экспрессированные белки были растворимыми. Метка His₆ позволяет очистить изучаемые белки в одностадийной процедуре методом Ni-аффинной хроматографии [9, 28]. Аффинной хроматографией на целлюлозе очищались гибридные белки, полученные при использовании новых высококопийных плазмид pTUGA и pTUGAS, обладающих высоким уровнем индуцибельной трансформации [16]. Во всех перечисленных выше случаях конечный продукт получается с помощью специфического гидролиза гибридного белка, отщепляясь от белка носителя.

Таким образом, при экспрессии эукариотических генов в клетках микроорганизмов необходимо получить последовательность, в которой регуляторные элементы прокариот соединены с эукариотическим геном. Для получения экспрессии относительно небольших генов продукт клонированного гена получают в составе гибридного белка. Важным этапом экспрессии эукариотических генов является подбор оптимальных условий, обеспечивающий высокий уровень и полноценность получаемого в бактериях продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карапетян В.Е., Парсаданян А.Ш., Галоян А.А. Молекулярная биология, 28, 3, 595-601, 1994.
2. Коваленко С.П., Лисняк И.А., Мертвецов Н.Н. Биоорганическая химия, 15, 4, 492-498, 1989.
3. Нурмухамбетова С.Т., Морозов И.А., Чернов Б.К., Рубцов П.М. Молекулярная биология, 30, 1, 111-120, 1996.
4. Парсаданян А.Ш., Карапетян В.Е., Рубцов П.М., Скрыбин К.Г., Галоян А.А. Молекулярная биология, 24, 1, 220-230, 1990.
5. Солонин А.С., Трояновский Б.М., Тяншин В.И., Баев А.А. ДАН СССР, 265, 6, 1504-1507, 1982.
6. Татьков С.И., Сиволюбова Г.Ф., Кочнева Г.В., Реметников С.С., Цивковский Р.Ю., Серпинский О.И. Молекулярная биология, 30, 6, 1299-1306, 1996.
7. Bernard H.U., Helinski D.R. Methods Enzymol., 68, 482-492, 1979.
8. Chang J.J.M., Chang P.R., Bannet W.F., Bochner B.R. Biochem. Soc. Trans. 17, 2, 335-337, 1989.
9. Cheing Ch.-Z., Huang H., Cong J., Xia Qi-Ch., Li B.-L., Wang Y.-L. Acta Biochim. et. Biophys. Sin., 28, 5, 523-530, 1996.
10. Daum J., Donner P., Geilen W., Hubner-Kosnay G., Isernhagen M., Scheidecker H., Seliger H., Boidol W., Siewert G. Eur. J. Biochem., 185, 2, 347-354, 1989.
11. Denhardt D.T., Dressler D., Ray D.S. In: The singlestranded DNA phages, Cold Spring Harbor, 4, 1978.
12. Derynck R., Remaut E., Samen E., Stanssens P., De Cierq E., Content J., Fiers W. Nature, 287, 5779, 193-197, 1980.
13. Geoffrey A., Cora A.F., Winther M.D. J. Cell Sci., 3, 29-38, 1985.
14. Goeddel D.V., Heyneker H.L., Hozuma T., Arentzen R., Itakura K., Yansura D.G., Ross M.I., Miozzare G., Grea R., Seeburg P.H. Nature, 281, 5732, 544-548, 1979.
15. Guarente L., Lauer G., Roberts T.M., Ptashne M. Cell, 20, 2, 543-553, 1980.
16. Graham R.W., Greenwood J.M., Warren R.A.J., Kilburn D.G., Trimbur D.E. Gene,

- 158, 1, 51-546, 1995.
17. Hashemzadeh-Bonehi L., Mehraei-Gohom F. Mol. Microbiol., 30, 3, 676-678, 1998.
18. Itacura I., Hirose T., Grea R., Riggs A.D., Heyneker H.L., Bolivar F., Boyer H.W. Science, 198, 4321, 1056-1063, 1977.
19. Ivanov I., Jay E. Biotechnol. and Bioindustry, 2, 6-13, 1986.
20. Kane J.F., Hartley D.L. Trends Biol. Tech., 6, 95-101, 1988.
21. Kaneva J., Mulchandani A., Chen W. Biotechnol. Progr., 14, 2, 275-278, 1998.
22. Kareem B.N., Rokkones E., Hogset A., Holmgren E., Gantvic K.M. Anal. Biochem., 204, 26-33, 1992.
23. Lin-Chao She, Chen Wen-Tsuan, Wong Ten-Tsao Mol. Microbiol., 6, 22, 3285-3293, 1992.
24. Messing J., Vieira J. Gene, 19, 269-276, 1982.
25. Model P. Cell, 61, 739-741, 1990.
26. Munson M., Predki P.F., Regan L. Gene, 144, 1, 59-62, 1994.
27. Oka T., Sakamoto S., Miyoski K.-i., Fuwa T., Yoda K., Yamasaki M., Tamura G., Miyake T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 21, 7212-7216, 1985.
28. Peranen J.R.M., Hyvonen M., Ka aribinen L. Anal. Biochem., 236, 2, 371-373, 1996.
29. Quaas R., McCeown J., Stanssens P., Frank R., Blocker H., Hahn U. Eur. J. Biochem. 173, 617-622, 1988.
30. Shine J., Fetters I., Lan N.C.J., Roberts J.L., Baxter J.D. Nature, 285, 5765, 456-461, 1980.
31. Studier F.W., Moffatt B.A. J. Mol. Biol., 189, 113-130, 1986.
32. Sumi S.-I., Hasegawa A., Yagi S., Miyoshi K.-i., Kanezawa A., Nakagawa S., Suzuki M. J. Biotechnol., 2, 1, 59-74, 1985.
33. Talmadge K., Gilbert W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6, 1830-1833, 1982.
34. Uhlen M., Nilsson B., Guss B., Lindberg M., Gatenbeek S., Philipson L. Gen, 23, 269-378, 1983.

Поступила 11.XII.1998

Լրագրի • Хроника • Chronics

РАИСА ОГАНЕСОВНА ПАПАНЯН



28 апреля 2001 г. после тяжелой болезни скончалась ответственный секретарь редакции “Биологический журнал Армении” Раиса Оганесовна Папанян. Ушла из жизни исключительно преданный делу работник, внесший большой вклад в обеспечение издания центрального журнала биологической науки Республики.

Р. О. Папанян родилась в 1940 г. в Талинском районе Армении и постоянно проживала в Ереване. Окончив в 1957 г. среднюю школу, она поступила в том же году на филологический факультет Ереванского государственного университета.

В редакции “Биологического журнала Армении” она начала работать с 1968 года, выполняя последние 6 лет обязанности ответственного секретаря. Ее характеризовали большая требовательность к своим обязанностям и высокий профессионализм в выполняемой работе.

Р. О. Папанян пользовалась уважением и признанием не только коллектива редакции, но и многочисленных авторов и научных сотрудников.

Раиса Оганесовна Папанян навсегда останется в памяти друзей и коллег.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Օրիգինալ հոդվածներ

Վարդանյան Ն.Ս., Գասպարյան Ա.Վ., Հակոբյան Վ.Պ. Ծծմբի և երկաթի օքսիդացումը թերմոադիոֆիլ բակտերիաների կողմից միքսոտրոֆ պայմաններում	3
Գանին Պ.Գ., Կոմարով Ե.Վ. Հ- պոտենցիալի, ճարպաթթուների և ն-ալկանների սուբմիկրոնային կաթիլների դերը սուբստրատի տրանսպորտի մեխանիզմում դեպի ալկանյուրացնող շաքարասնկերի բջիջներ	10
Պետրոսյան Ռ.Ա., Պետրոսյան Ա.Ռ., Ղազանյան Ն.Լ., Աֆրիկյան Է.Գ. Սանրենների ադիեզիայի էկոլոգա-բժշկական և ֆիզիկա-քիմիական տեսակետները պոլիմերային նյութերի կենսաքայքայման ժամանակ	17
Կարաբեկով Բ.Պ., Հովսեփյան Ա.Ս., Չախալյան Ա.Խ., Քելեշյան Ս.Ղ., Ջուրաբյան Ա.Ս. Ամինաթթուների որոշ ածանցյալների ազդեցությունը <i>Bacillus thuringiensis</i> -ի բակտերիոֆագերի լիտիկ ակտիվության վրա	24
Կարաբեկով Բ.Պ., Հովսեփյան Ա.Ս., Չախալյան Ա.Խ., Քելեշյան Ս.Ղ., Ջուրաբյան Ա.Ս. Բակտերիոֆագ-բակտերիալ բջիջ հարաբերությունների ուսումնասիրությունը միջատափվանդածին <i>Bacillus thuringiensis</i> համակարգում	32
Պարոնյան Ա.Խ. Հայաստանի տարբեր աղուտներից մեկուսացված ալկալոֆիլ ծծմբային ֆոտոսինթեզող բակտերիաներ	41
Էլիազյան Ա.Ա., Պարոնյան Ա.Խ. Ֆոտոսինթեզող բակտերիաների ամինոացիլազային ակտիվության մասին	46
Հակոբյան Լ.Հ., Չարյան Լ.Մ. Կաթնաթթվային բակտերիաների պաիպանման եղանակների մասին	51
Հարությունյան Ա.Հ., Ասլամյան Ա.Գ., Ալեքսանյան Ն.Մ., Ստեփանյան Թ.Հ., Մաթևոսյան Ֆ.Ս. Հացաբույսերի պալարաբակտերիաներով վարակման հնարավորության մասին	59
Սամվելյան Գ.Ա. Եթիլ սպիրտի ազդեցությունը շաքարասնկերի մենբրանային կառուցվածքի անկայունության վրա	63
Հովհաննիսյան Հ.Գ., Հովհաննիսյան Ա.Ս. <i>Longitudinal</i> աղիների ամբողջական ճնշումը <i>Escherichia coli</i> K-12-ի մոտ քրոմոսոմային մասնիկի միջոցով	68
Համբարձումյան Ն.Ս., Նալբանդյան Ն.Հ., Թաթոսյան Ա.Գ., Հակոբյան Ժ.Ի. V-SRC օնկոգեն տրանսկրիպցիան և էքսպրեսիան <i>Escherichia coli</i> բջիջներում	75
Արզումանյան Ա.Ն., Բազուկյան Ի.Լ., Պոպով Յու.Գ. Բակտերիական լանանգային գեն կրող <i>Heliantus tuberosus</i> L. տրանսգեն բույսերի ստեղծումը	81
Աղաքանյան Ա.Խ., Մոլաի Ռադ Մ.Բ., Ղալբյան Ա.Ս. <i>Pisum sativum</i> L. ոլոռի սերմերի արգինազի իզոնեզիմային սպեկտրը և ֆիզիկա-քիմիական հատկությունները	87
Աղաքանյան Ա.Խ., Մոլաի Ռադ Մ.Բ., Ղուկասյան Ջ.Գ., Աղաքանյան Ա.Ա. Որոշ ազդակների ազդեցությունը <i>Pisum sativum</i> L. ոլոռի ծլող սերմերի ազատ պրոլիմի կուտակման վրա	92
Ղազարյան Վ.Հ., Խաչատրյան Ռ.Ֆ. Էտի ազդեցությունը որոշ ծառատեսակների ջրային ռեժիմի վրա	98
Սարգսյան Կ.Շ. Երևանի կանաչ գոտու պայմաններում հատված ծառերի կոծղաշվային ծանրաբեռնվածության ազդեցությունը տերևային մակերեսի զարգացման և ջրային ռեժիմի վրա	102
Գասպարյան Գ.Հ., Գրիգորյան Ռ.Մ., Սարգիսյան Ն.Կ., Սալաթյան Ա.Վ., Ղաթաղյան Է.Յու., Մովսեսյան Վ.Տ. Հոմոլոգ բջիջների բազմացման կոնտակտային խթանումը կաթնասուների բջիջների կուլտուրաներում	107

Համառոտ հաղորդումներ

Նիկողոսյան Վ. Գ. Ազոտֆիքսող նոր բացիլներ հացազգիների արմատային համակարգում	111
Նիկողոսյան Վ. Գ., Բաղդասարյան Ի. Բ. Տարբեր դիագնոստիկների փոխհարաբերության ու ազոտի ֆիքսման ակտիվության մասին	114
Յովհաննիսյան Յ. Գ. Կապտուլային բազմաշաքարների գերարտադրության և λ պրոֆագի ինդուկցիայի սուպրեսիան <i>Escherichia coli</i> K-12-ի <i>lon</i> շտամի մոտ	118
Ղարիբյան Զ. Վ., Խուղավերդյան Ն. Վ., Ղանիբեյան Ի. Ս., Ահարոնյան Ա. Ս., Կարապետյան Օ. Գ. Առողջ մարդկանցից անջատված <i>Escherichia coli</i> ՂՆԹ ի մեթիլացման առանձնահատկությունները և նրա ազդեցությունը ուռուցքային ՂՆԹ-ի վրա	121
Զամինյան Ա. Ս., Մուրադյան Լ. Գ., Ավսյան Ռ. Է., Աբրահամյան Լ. Խ. Գարու էնդոմիկ տեսակի մոտ աճի ծայրահեղ պայմանների տարբերակումը ըստ մոդֆոնատոմիական ցուցանիշների	124
Փոստոյան Ա. Ռ. <i>Trypanosoma vivax</i> Ziemann, 1905 կենսունակության պահպանումը տզերի մոտ	128
Ղազարյան Ա. Պ., Ղազարյան Պ. Ա. Գլիցերոֆոսֆատի և գլիցերինի փոխանակության խանգարումները սրտամկանում սիրտ-թոքային անբավարարվածության ժամանակ	130
Հարությունյան Յու. Ա., Ղազարյան Ա. Պ. Սուր խղեցիստիտով հիվանդների բուժման արդյունավետության գնահատման որոշ կենսաքիմիական ցուցանիշներ	133
Հարությունյան Յու. Ա. Լեղապարկի սուր բորբոքման ժամանակ ֆոսֆոլիպազ A_2 -ի ակտիվությունը լյարդում	137
Բախշինյան Ա. Զ., Հակոբջանյան Է. Ս. Լյարդի և փայծաղի մակրոֆագերի կառուցվածքային և ֆունկցիոնալ փոփոխությունների համեմատական բնութագիրը հակազենային խթանման ժամանակ	139
Կարապետյան Մ. Ա. Քիմիոթերապիան և բնական կիլերների ակտիվությունը թրջախտի ժամանակ	142

Ակնարկներ

Աղաբալյան Ա. Ս. Իմունոմոդուլյատորները և օրգանիզմի ոչ սպեցիֆիկ դիմադրողականությունը	146
Կարապետյան Վ. Ե. Տարասեն գենների արտահայտումը <i>Escherichia coli</i> -ի բջիջներում	151

Լրատու

Ուսիսա Յովհաննեսի Պապանյան	158
----------------------------------	-----

БЖА, 1-2 (53), 2001

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

Варданян Н.С., Гаспарян А.В., Акопян В.П. Окисление серы и железа штаммами термоацидофильных бактерий в миксотрофных условиях	3
Ганин П.Г., Комаров Е.В. Роль ζ -потенциала, жирных кислот и субмикробных капель н-алканов в механизме транспорта субстрата в клетки алканутилизующих дрожжей	10
Петросян Р.А., Петросян А.Р., Казанчян Н.Л., Африкян Е.К. Эколого-медицинские и физико-химические аспекты адгезии микроорганизмов при биоповреждении полимерных материалов	17

Карабеков Б.П., Овсепян А.С., Чахалян А.Х., Келешян С.К., Зурабян А.С. Влияние некоторых производных аминокислот на литическую активность бактериофагов <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
Карабеков Б.П., Овсепян А.С., Чахалян А.Х., Келешян С.К., Зурабян А.С. Взаимоотношения в системе фаг-клетка у энтомопатогенных бактерий <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
Паронян А.Х. Алкалофильные серные фотосинтезирующие бактерии из содовых солончаков Армении	41
Элиазян А.А., Паронян А.Х. Об аминокислотной активности фотосинтезирующих бактерий	46
Акопян Л.Г., Чарян Л.М. О способах хранения молочнокислых бактерий	51
Арутюнян С.А., Асланян С.Г., Алексанян Н.М., Степанян Т.У., Матевосян Ф.С. О возможности инфицирования клубеньковыми бактериями злаковых культур	59
Самвелян Г.А. Влияние этилового спирта на структурную лабильность мембран дрожжей	63
Оганесян Г.Г., Оганесян С.С. Полная супрессия проявления <i>lon</i> мутаций <i>Escherichia coli</i> K-12 хромосомным фрагментом	68
Амбарцумян Н.С., Налбандян Н.Г., Татосян А.Г., Акопян Ж.И. Онкоген V-SRC: транскрипция и экспрессия в клетках <i>Escherichia coli</i>	75
Арзуманян А.Н., Базукян И.Л., Попов Ю.Г. Конструирование трансгенных растений <i>Helianthus tuberosus</i> L. с бактериальным геном леваназы	81
Агаджанян А.Х., Молаи Рад М.Б., Давтян М.А. Изоэнзимный спектр и физико-химические свойства аргиназы в семенах гороха <i>Pisum sativum</i> L.	87
Агаджанян А.Х., Молаи Рад М.Б., Гукасян Дж.Г., Агаджанян А.А. Влияние некоторых эффекторов на накопление свободного пролина в прорастающих семенах гороха <i>Pisum sativum</i> L.	92
Казарян В.О., Хачатрян Р.Ф. Влияние обрезки на водный режим некоторых древесных растений	98
Саркисян К.Ш. Влияние порослевой нагрузки на развитие листовой поверхности и водный режим срубленных деревьев в условиях зеленого кольца г. Еревана	102
Гаспарян Г.Г., Григорян Р.М., Саркисян Н.К., Саядян А.В., Дабагян Э.Ю., Мовсесян В.Т. Контактная стимуляция размножения гомологичных клеток в культурах клеток млекопитающих	107

Краткие сообщения

Никогосян В.Г. Новые азотфиксирующие бациллы из корневой системы злаковых	111
Никогосян В.Г., Багдасарян И.Б. О взаимодействии и активности азотфиксационных различных диазотрофов.	114
Оганесян Г.Г. Супрессия сверхсинтеза капсульных полисахаридов и индукции профага λ у <i>lon</i> штамма <i>Escherichia coli</i> K-12	118
Гарибян Д.В., Худавердян Н.В., Даниелян И.С., Агаронян А.С., Карапетян О.Г. Особенности метилирования ДНК <i>Escherichia coli</i> , выделенной у здоровых людей и ее влияние на опухолевую ДНК	121
Заминян С.С., Мурадян Л.Г., Авалян Р.Э., Абрамян Л.Х. Идентификация экстремальных условий произрастания по морфоанатомическим показателям у эндемичного вида ячменя.	124
Постоян С.Р. Сохранение жизнеспособности <i>Trypanosoma vivax</i> Ziemann, 1905 в клещах	128
Казарян А.П., Казарян П.А. Нарушение обмена глицерофосфата и глицерина в миокарде при легочно-сердечной недостаточности	130

Арутюнян Ю.А., Казарян П.А. Некоторые биохимические критерии оценки эффективности лечения больных острым холециститом	133
Арутюнян Ю.А. Активность фосфолипазы A ₂ в печени при остром холецистите	137
Бахшиян М.З., Аколджян Э.С. Сравнительная характеристика структурных и функциональных изменений макрофагов печени и селезенки при антигенной стимуляции	139
Каралян М.А. Химиотерапия и активность естественных киллерных клеток при туберкулезе	142

Обзоры

Агабалян А.С. Иммуномодуляторы и неспецифическая резистентность организма	146
Карапетыан В.Е. Экспрессия гетерологичных генов в клетках <i>Escherichia coli</i>	151

Хроника

Раиса Оганесовна Папанян	158
--------------------------------	-----

BJA, 1-2 (53), 2001

CONTENTS

Original articles

Vardanyan N.S., Gasparyan A.V., Hachobyan V.P. Sulphur and iron oxidation by thermoacidophilic bacteria under mixotrophic conditions	3
Ganin P.G., Komarov E.V. Role of ζ -potential, fat acids and n-alkanes submicrone drops in substrate transport mechanism into alkane-utilizing yeast cells	10
Petrosyan R.A., Petrosyan A.R., Ghazanchyan N.L., Afrikian E.G. Ecological, medical and physico-chemical aspects of microbial adhesion in biodeterioration of polymeric materials	17
Karabekov B.P., Hovsepian A.S., Chakhalyan A.Kh., Qeleshyan S.K., Zurabyan A.S. Effect of some amino acid derivatives on lytic activity of the bacteriophages in <i>Bacillus thuringiensis</i>	24
Karabekov B.P., Hovsepian A.S., Chakhalyan A.Kh., Qeleshyan S.K., Zurabyan A.S. Interrelation within the phage-cell system in entomopathogenic bacteria of <i>Bacillus thuringiensis</i>	32
Paronyan A.Kh. Alkalophilic sulfur photosynthetic bacteria from soda salted soils of Armenia	41
Eliazyan A.A., Paronyan A.Kh. On aminoacylase activity of photosynthetic bacteria	46
Akopyan L.G., Charyan L.M. On methods of preservation of lactic acid bacteria	51
Harutyunyan S.H., Aslanyan S.G., Alexanyan N.M., Stepanyan T.H., Matevosyan F.S. On possibility of infection of cereals with root nodule bacteria	59
Samvelyan G.A. Effect of ethanol on structural lability of yeast membranes	63
Hovhannisyan H.G., Hovhannisyan S.S. Full suppression of <i>lon</i> mutations expression in <i>Escherichia coli</i> K-12 by a chromosomal fragment	68
Ambartsumian N.S., Nalbandyan N.G., Tatossyan A.G., Akopian J.I. Oncogene V-SRC transcription and expression in <i>Escherichia coli</i> cells	75
Arzumanyan A.N., Bazukyan I.L., Popov Yu.G. Construction of transgenic plants <i>Helianthus tuberosus</i> L. with bacterial levanase gene	81
Aghadjanian A.Kh., Molaee Rad M.B., Davtian M.A. Isoenzyme spectrum and	

physico-chemical peculiarities of arginase in suds of pea <i>Pisum sativum</i> L.	87
Aghadjanian A.KH., Molaee Rad M.B., Gookasian J.G., Aghadjanian A.A. Effect of some effectors on free proline accumulation in germinating suds of pea <i>Pisum sativum</i> L.	92
Kazaryan V.O., Khachatryan R.F. Influence of the pruning on the water relationships of some wood plants	98
Sarkisyan K.Sh. The influence of verdure load on the development of leaf litter and water regime of cut trees under the conditions of green ring of Yerevan	102
Gasparyan G.H. Grigoryan R.M., Sarkissyan N.K., Sayadyan A.V., Dabagian E.Yu., Movsessyan V.T. Contact stimulation of homologous cell proliferation in mammalian cell cultures	107

Short communications

Nikoghosyan V.G. Nitrogen-fixing new bacilli in root system of cereals	111
Nikoghosyan V.G., Bagdasaryan I.B. On the activity and relationship of nitrogen fixation of various diazotrophs.	114
Hovhannisyan H.G. Suppression of overproduction of capsular polysaccharides and induction of prophage λ in <i>lon</i> strain of <i>Escherichia coli</i> K-12	118
Garibian D.V., Khudaverdian N.V., Danielian I.S., Agaronian A.S., Karapetian O.G. Peculiarities of DNA methylation of <i>Escherichia coli</i> isolated from healthy persons and its influence on tumor DNA	121
Zaminian S.S., Mouradian L.G., Avalian R.E., Abramian L.Ch. The identification of extremal growth conditions by morpho-anatomical indexes of endemic species of barley	124
Postoyan S.R. Maintenance of viability of <i>Tripanosoma vivax</i> Ziemann, 1905 in mites	128
Kazarian A.P., Kazarian P.A. Impairment of the metabolism of glycerophosphate and glycerol in myocardium at cardio-pulmonary insufficiency	130
Aroutunyan Yu.A., Ghazaryan P.A. Some biochemical criteria for evaluation of efficiency of therapy in patients with acute cholecystitis	133
Aroutunyan Yu.A. Phospholipase A ₂ activity in liver at acute cholecystitis	137
Bakhshinyan M.Z., Hakobdjanyan E.S. Comparative characteristic of structural and functional changes of microphages of liver and spleen at antigen stimulation	139
Karalian M.A. Chemotherapy and natural killer cells activity at tuberculosis	142

Reviews

Agabalian A.S. Immunomodulators and nonspecific resistance of organism	146
Karapetyan V.E. Expression of hybrid genes in <i>Escherichia coli</i>	151

Chronics

Raisa H. Papanyan	158
-------------------------	-----

7500m.

Сдано в набор 20.III.01 г. Подписано к печати 20.IV.01 г. ВФ 02824
Бумага офсет 1. Печать офсетная. Усл. печ. лист 10
Тираж 150.

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

Издательство "Эдит Принт", 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.