

ISSN 0366-5119

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ
ԿԵՆՏՐԱԼՆԱԿԱՆ ՀԱՆԴԵՍ

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ЖУРНАЛ
АРМЕНИИ

BIOLOGICAL JOURNAL
of ARMENIA

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 բնագավառների 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 - N.H. Apinyan

Խմբագրական կոլեգիա՝ Է.Գ.Աֆրիկյան (գլխավոր խմբագիր), Ծ.Մ.Ավագյան, Մ.Ա.Դավթյան, Ժ.Ի.Հակոբյան (գլխավոր խմբագրի տեղակալ), Ռ.Մ.Հարությունյան, Կ.Գ.Ղարազյուրյան, Ս.Խ.Մայրապետյան, Ս.Հ.Մովսիսյան, Ն.Հ. Ապինյան (պարասխանատու քարտուղար)

Խմբագրական խորհուրդ՝ Է.Գ. Աֆրիկյան (նախագահ), Ա.Ս.Աղաբալյան, Յու.Թ.Ալեքսանյան, Է.Ց.Գաբրիելյան, Ա.Ա.Գալոյան, Ա.Լ.Թախտաջյան, Բ.Ց.Ղարիբջանյան, Կ.Ս.Ղուղոսյան, 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, М.А.Давтян, К.Г.Карагезян, С.Х.Майрапетян, С.О.Мовсесян, Н.А. Апинян (ответственный секретарь)

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

Биол. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 502.656.556.5(479).25

**ՋՐՕԳՏԱԳՈՐԾՄԱՆ ՄԻՋՊԵՏԱԿԱՆ ԵՎ ՄԻՋԱԶԳԱՅԻՆ
ՓՈԽՅԱՐԱՐԵՐՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԵՎ ՀԱՄԱԳՈՐԾԱԿՑՈՒԹՅԱՆ
ՄԻ ԲԱՆԻ ՀԻՄՆԱՀԱՐՑԵՐ**

ՎԼԱԴԻՄԻՐ Մ. ՍՈՎՍԻՍՅԱՆ

*ՀՀ վարչապետի խորհրդական, Հայաստանի Հանրապետություն, Երևան,
Կառավարության շենք*

Ջրային ռեսուրսների ապահովումը հանդիսանում է առավել կարևոր և կենսականորեն անհրաժեշտ խնդիր, առանց որի հնարավոր չէ լուծել Հայաստանի պարենային, էներգետիկ և էկոլոգիական ծրագրերը:

Անփոփած է տվյալ հիմնահարցի ժամանակակից իրավիճակը և հիմնավորված են նրա ռացիոնալ լուծման եղանակները ժամանակակից մոտեցումների և գիտատեխնիկական առաջընթացի նվաճումների հիման վրա, հաշվի առնելով այդ բնագավառում միջպետական և միջազգային համագործակցության հեռանկարները:

Յեղիմակը, որն ակտիվորեն մասնակցել է այդ բնագավառի միջոցառումների իրացմանը, ինչպես նաև քննարկվող հարցի վերաբերյալ միջպետական բանակցություններին, հիմնավորում և ներկայացնում է առաջարկներ Հայաստանում ջրային ռեսուրսների արդյունավետ կառավարման, տնօրինման և նրանց ռացիոնալ օգտագործման նպատակով հատուկ Համապետական ծրագրի մշակման անհրաժեշտության մասին: Հատուկ ուշադրություն է դարձվում Սևանա լճի ջրային ռեսուրսների պահպանմանը և ռացիոնալ օգտագործմանը:

Обеспечение водными ресурсами является наиболее важной и жизненно необходимой проблемой, без разрешения которой невозможно решение производственной, энергетической и экологической программ Армении.

Обобщено современное состояние данной проблемы и обоснованы пути ее рационального решения на основе современных подходов и достижений научно-технического прогресса с учетом перспектив межгосударственного и международного сотрудничества в этой области.

Автор, принимавший активное участие в реализации мероприятий в этой области, а также в межгосударственных переговорах по рассматриваемой проблеме, обосновывает и представляет предложения для разработки в Армении целевой Государственной программы по эффективному управлению, владению водными ресурсами и их рациональному использованию. Особое внимание уделяется охране и рациональному использованию водных ресурсов озера Севан.

Water-supply and security is the key and vital problem for Armenia and the background for solution of Food/Feed, Energetic and Ecological programs in the Republic.

Actual situation of this problem has been presented and rational approaches for its realization in Armenia have been analyzed in detail with the emphasis of scientific and technical progress in this field as well as interstate and international co-operation.

The author, actively engaged in realization of measures in this field and in interstate

negotiations on problem discussed analyzes and presents proposals for development in Armenia the State Program for effective management, maintenance of water resources and their rational use. The special attention is paid to the protection and rational use of water resources of the Lake Sevan.

Водные ресурсы Армении - водопользование - озеро Севан

Այսօր մարդկության առջև ծառացած կարևորագույն հիմնախնդիրների թվին են պատկանում պարենային, վառելիքաէներգետիկ, էկոլոգիական և ջրային (հատկապես քաղցրահամ) պրոբլեմները, որոնք 21-րդ դարում էլ կմնան որպես մարդկությանը հուզող գերխնդիրներ: Հարավային Կովկասում, հատկապես Հայաստանում, ի թիվս վերոհիշյալ պրոբլեմների, ամենալուրջագույնը կա և կմնա ջրային ռեսուրսների տնօրինման, կառավարման և օգտագործման խնդիրը, առանց որի հնարավոր չէ լուծել պարենային, էներգետիկ և էկոլոգիական պրոբլեմները:

Հայաստանի Հանրապետությունը սակավահող և սակավաջուր երկիր է, որը գտնվում է Հարավային Կովկասում և սահմանակցում է Վրաստանին, Ադրբեջանին, Իրանին և Թուրքիային: Ցամաքի բարձրությունը տատանվում է սկսած Դեբետ գետի ավազանից 375 մետր ծովի մակերևույթից բարձր միջից, մինչև Արագած լեռան առավելագույն 4090 մետր բարձրության սահմանանիշը: Երկրի տարածքի 75 տոկոսը գտնվում է ծովի մակերևույթից ավելի բան 1500 մետր բարձր մակարդակի վրա, այն դեպքում, երբ աշխարհի բնակչության միայն 5 տոկոսն է բնակվում ծովի մակերևույթից 1000 մետր և ավելի բարձր տարածքների վրա:

Բնական ջրային ռեսուրսների առումով Հայաստանը հարևան երկրների համեմատությամբ գտնվում է առավել անբարենպաստ պայմաններում: Հայաստանում տարեկան միջին հաշվով յուրաքանչյուր շնչին բաժին է ընկնում 2700 խորանարդ մետր ջուր, այն դեպքում, երբ Ադրբեջանում և Վրաստանում այդ ցուցանիշը համապատասխանաբար կազմում է 3800 և 11600 խորանարդ մետր: Հայաստանի ջրային ռեսուրսները ձևավորվում են Կուր գետի ավազանում: Կուր գետի ավազանը ներառում է 204 հազար քառակուսի կիլոմետր տարածության, որից Հայաստանի տարածքը 29,8 (երկրի տարածքի 100 տոկոսը), Ադրբեջանինը համապատասխանաբար 69 (79 տոկոս), Վրաստանինը 36 (52 տոկոս), Թուրքիայինը 29 հազար քառ. կմ և Իրանինը 40 հազ. քառ. կմ:

Ջրային ռեսուրսները Կուր գետի ավազանում միջին տարեկան կտրվածքով գնահատվում են 30,5 խոր. կմ, որից մակերեսային հոսքը 27,3 խոր. կմ և ստորգետնյա ջրերինը 3,2 խոր. կմ: Դրանցից ձևավորվում են (միջին ջրապահովության տարում) Վրաստանի տարածքում 10,7 խոր. կմ (35 տոկոս), Հայաստանի տարածքում 7,3 (24 տոկոս), Ադրբեջանում 7,9 (26 տոկոս), Թուրքիայի և Իրանի տարածքում 4,6 խոր. կմ (15 տոկոս): Քանի որ Հայաստանի տարածքի միջին միշը (ծովի մակերևույթից բարձր) կազմում է 1818 մետր և Հայաստանի ջրերը ամբողջությամբ արտահոսում են նրա սահմաններից դուրս և գրեթե ոչ մի գետ հարևան երկրներից չի ներհոսում հանրապետության տարածք ջրային ռեսուրսների տնօրինման օգտագործման և կառավարման հարցերը դառնում են ազգային նշանակության կարևորագույն գերխնդիր: Ուսումնասիրությունները ցույց են տալիս, որ հանրապետության ջրային ռեսուրսների

կայուն կառավարման բնագավառում դեռևս կան մի շարք հիմնախնդիրներ, որոնք արմատական լուծում են պահանջում: Եական թերություններ կան ջրային ռեսուրսների արդյունավետ օգտագործման և կառավարման բնագավառում: Բավական է ասել, որ ամեն միջին ջրապահոված տարի 7,3 մլրդ խոր. մետր ջրային ռեսուրսներից օգտագործվում է ընդամենը 2,5-2,6 մլրդ խոր. մետրը, կամ պաշարների միայն 34-35 տոկոսը:

Նման իրավիճակում ջրօգտագործման միջհամրապետական և միջպետական խնդիրների լուծումն ու համակարգումը ունեն չափազանց կարևոր նշանակություն, քանի որ դրանք անմիջապես առնչվում են ջրի ազգային պաշարի մեծության հետ: Ջրային ռեսուրսների պահպանումն ու տնօրինումը կան ու առաջիկայում էլ կմնան որպես ազգային նշանակության կարևորագույն գերխնդիր:

Հայաստանը ցամաքով շրջափակված երկիր է և գրեթե բոլոր գետերը հոսում են դեպի հարևան երկրներ: Ուստի ջրային պաշարների տնօրինման և օգտագործման միջպետական փոխհարաբերություններում, ինչպես նաև միջազգային համագործակցության շրջանակներում հանրապետության շահերի պաշտպանությունը դառնում է ազգային անվտանգության ապահովման ամենահիմնական խնդիրներից մեկը:

Ինչպես նշվեց, Հայաստանի տարածքը ամբողջությամբ գտնվում է Կուր գետի ավազանում: Հանրապետության ջրային պաշարները Կուր գետի և նրա Արաքս վտակի միջոցով դրենաժվում, արտահոսում և թափվում են Կասպից ծով:

Դերեդ գետի միջոցով արտահոսքը Վրաստան գնահատվում է 890 մլն խմ/տարի: Զյուսիս-արևելյան արտահոսքերը դեպի Ադրբեջան տարբեր գետերի միջոցով կազմում են 555 մլն խմ/տարի: Հարավ-արևելքում Արաքս գետի վտակների միջոցով (Արփա, Որոտան, Ողջի և այլն) ուղղակի հոսքը Ադրբեջան կազմում է 1,791 մլն խմ/տարի, մի քանի ստորերկրյա ջրերի ջրապարունակ հորիզոններ բաժանվում են Թուրքիայի հետ, որոնցից ամենակարևորը Արարատյան հարթավայրի ջրապարունակ հորիզոնն է:

Հայտնի է, որ Խորհրդային Միության տարիներին միջհամրապետական ջրային հիմնախնդիրները լուծվում էին ԽՍՀՄ Պետպլանի և ԽՍՀՄ մեխորացիայի և ջրային տնտեսության նախարարության կողմից: Ջրային պաշարների միջհամրապետական խնդիրների քննարկման ժամանակ հաշվի էր առնվում նաև միութենական հանրապետության Նախարարների խորհրդի կարծիքը: Ջրային պաշարների միջպետական հարցերը քննարկվում և կարգավորվում էին ԽՍՀՄ կառավարության կողմից: Նախկին Խորհրդային Միության տարիներին կնքվել են մի շարք երկկողմանի պայմանագրեր, որոնց շրջանակներում Հայաստանը պարտավորություններ ունի միջազգային ջրերի զարգացման և օգտագործման առնչությամբ: Հայաստանը պայմանագիր ունի Թուրքիայի հետ Արաքս և Ախուրյան գետերի օգտագործման վերաբերյալ (1927 թ. հունվարի 8-ի կոնվենցիա): Պայմանագրի համաձայն այս երկու անդրսահմանային գետերի ջրերը բաշխվում են հավասարաչափ համամասնությամբ: Թուրքիայի հետ կա նաև մեկ այլ պայմանագիր Ախուրյան գետի պատվարի և ջրամբարի համատեղ շահագործման մասին, որի տարողությունը 525 մլն խմ է: Հայաստանի և Իրանի միջև գոյություն ունի Արաքս գետի սահմանամերձ հատվածներում ջուրը ոռոգման, էլեկտրաէներգիայի արտադրության և կենցաղային նպատակներով

համատեղ օգտագործելու մասին (1957 թ. օգոստոսի 11) համաձայնագիր, ըստ որի անդրսահմանային գետի ջուրը հավասարաչափ համամասնություններով սահմանային հատվածներում բաշխվում է (50%) Իրանի և Հայաստանի միջև: Չնայած այս պայմանագրերը կնքվել են ԽՍՀՄ-ի կողմից, այնուամենայնիվ Հայաստանը համարվում է ՀԽՍՀ-ի իրավահաջորդ երկիրը և հետևաբար պարտավորված է կատարելու դրանց համապատասխան դրույթները:

Այդ տարիներին կնքվել են նաև Դեբեդ գետի օգտագործման մասին պայմանագիրը (1971 թ. նոյեմբերի 5), որը սահմանել է Հայաստանի և Վրաստանի չափաբաժինները, ինչպես նաև Արփա, Որոտան և Աղստև գետերի օգտագործման պայմանագրերը, որոնցով կարգավորվել են Հայաստանի և Ադրբեջանի ջրօգտագործման չափաքանակները: Այս համաձայնագրերը ընդունվել են նախկին ԽՍՀՄ կառավարության կողմից, սակայն դրանց դրույթները այսօր էլ կիրառվում են: Միջհանրապետական ջրային պաշարների օգտագործման ուրվագծերը (սխեմաները), ինչպես նաև առանձին ոռոգման համակարգերի կառուցման նախագծերը միութենական մակարդակով քննարկման ժամանակ Ադրբեջանը մշտապես ներկայացնում էր մի շարք տարածայնություններ, որոնց հաղթահարելը մեծ ջանքեր ու հիմնավորումներ էին պահանջում: Դա պայմանավորված էր նրանով, որ նախ շոշափվում էին հանրապետությունների տնտեսության զարգացման շահերը, մյուս կողմից, առանց այդ ուրվագծերի ու նախագծերի հաստատման ԽՍՀՄ Պետպլանը չէր ֆինանսավորում ջրային օբյեկտների շինարարությունն ընդհանրապես:

Ջրօգտագործման միջապետական և միջազգային հարցերում ճիշտ կողմնորոշվելու և վճիռներ կայացնելու նպատակով հարկ էն համարում լուսաբանել ջրային պրոբլեմների բաշխման հետ կապված միջհանրապետական վիճահարույց պրոբլեմներից մի քանիսը, որոնց քննարկման մասնակիցն են եղել:

1. 1980 թվականին ԽՍՀՄ կառավարության հանձնարարությամբ միութենական Պետպլանը ձեռնամուխ էր եղել Անդրկովկասի, մասնավորապես Կուր գետի ավազանի, ջրային պաշարների համալիր օգտագործման և պահպանման սխեմայի քննարկմանը: Որն էր դրա իմաստը: Քանի որ ջրատնտեսական օբյեկտների նախագծումն ու կառուցումը ֆինանսավորվում էին միայն կենտրոնական մարմինների կողմից, պետք է նախ սխեմա կազմվեր, թե Կուր գետի ավազանում գտնվող անդրկովկասյան հանրապետությունները, նաև Թուրքիան ու Իրանը ինչ ջրային պաշարներ ունեն և յուրաքանչյուրը ինչքան ջուր պիտի օգտագործի: Եվ այդ սխեմայի կազմումից ու հաստատումից հետո միայն հնարավոր կլիներ ակնկալել, թե ջրամբարների և ջրային համակարգերի կառուցման համար ֆինանսական ու նյութական ինչքան միջոցներ պիտի հատկացվեն: Ահա թե ինչու մենք մեծ ջանքեր գործադրեցինք այդ սխեմայի կազմման ու քննարկման ուղղությամբ: Նշեն, որ գլխավոր սխեման կազմվել էր ԽՍՀՄ մեկիորացիայի և ջրային տնտեսության նախարարության պատվերով, որն իրականացրել էր Ադրբեջանի «Հիդրոնախագիծ» ինստիտուտը, իսկ մեր և Վրաստանի նույնանուն նախագծային ինստիտուտները համարվել էին ենթանախագծողներ:

Ինչպես վերը նշված է, Կուր գետը ավազանի պաշարների իմաստով ունի 30,5 միլիարդ խմ ջուր: Հայաստանի բաժնեմասը այդտեղ կազմում է 7,3 միլիարդ խմ: Մյուս առանձնահատկությունն այն է, որ Կուր գետի ավազանում մեր

հանրապետության տարածքը ընդգրկված է ամբողջապես, մինչդեռ Ադրբեջանի տարածքի ընդգրկումը կազմում է 79 տոկոս, իսկ Վրաստանինը՝ 52: Այսպիսով, եթե միջհանրապետական ջրաբաժանումը կատարվեր անհիմն, կամային, ավելի շատ կվնասեր մեր հանրապետությանը, որը ամբողջապես Կուր գետի ավազանի մեջ է: Կուր գետի գլխավոր սխեման քննարկում էր ԽՍՀՄ Պետականի հատուկ փորձագիտական հանձնաժողովը: Մենք հանձնաժողովի հետ սկսեցինք, իրոք, տաժանակիր աշխատանք, որովհետև պետք է հիմնավորեինք, թե ինչու և ինչքան ջուր է հարկավոր Հայաստանին: Իսկ դա այնքան էլ հեշտ գործ չէր, թեև մենք ունեինք ծանրակշիռ փաստարկներ: Մեր ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ Կուր գետի սխեմայում զգալի չափով մեծացված է Ադրբեջանին հատկացվելիք ջրի բաժինը, քանի որ միջհանրապետական ջրաբաժանման հաշվարկներում արհեստականորեն ավելացվել էին ոռոգելի հողերի տարածությունները և լճակային ձկնաբուծության համար պահանջվելիք ջրի քանակությունը: Համաձայնվել նման հաշվարկների հետ մենք, իհարկե, չէինք կարող, որովհետև դրանք բերելու էին Հայաստանի բաժին ջրի կտրուկ նվազեցմանը:

Ամենալուրջ փաստարկը այն էր, որ սխեմայում ջրաբաժանության հարցը լուծելիս, հաշվի չէր առնվել նաև Սևանա լճի մակարդակի բարձրացման խնդիրը, քանի որ Ադրբեջանը կտրուկ դեմ էր դրան: Եվ եթե չենք որոշում Սևանի պահպանության և մակարդակի բարձրացման համար պահանջվելիք ջրային պաշարների հատկացման հարցը, ապա Կուր գետի սխեմայի հետ համաձայնության խնդիրը մեզ համար օրակարգից դուրս էր գալիս: Եթե, օրինակ, ցանկանում ենք Սևանի մակարդակը 6 մետրով բարձրացնել, ապա լիճ պետք է տեղափոխենք 8-9 միլիարդ խմ ջուր:

Այս փաստարկները փորձագիտական հանձնաժողովի ուշադրությանն արժանացան: Ներկայացված սխեման չհաստատվեց: Միաժամանակ հանձնարարվեց ԽՍՀՄ Հիդրոմետպետկոմին և Միության մեխորագիայի և ջրային տնտեսության նախարարությանը համատեղ շարունակել Կուր գետի ավազանի «հիդրոլոգիական տարի» ծրագրի ուսումնասիրումն ու անցկացումը: Մեխորագիայի և ջրային տնտեսության նախարարությանը հանձնարարվեց կազմել Սևանա լճի բնական պաշարների պահպանման և օգտագործման համալիր ծրագիր: Այսինքն, Կուր գետի գլխավոր սխեման հաստատել Սևանա լճի պահպանության սխեման հաստատելուց հետո: Սա շատ մեծ ձեռքբերում էր: Սակայն ծագեց մի նոր խնդիր: Եթե Կուր գետի սխեման չի հաստատվում, փաստորեն անորոշ ժամանակով դադարեցվում են տարածաշրջանում ջրաշինարարական աշխատանքները: Ուստի մենք առաջարկեցինք, որ այն օբյեկտները, որոնք ջրային գործոնի առումով սահմանափակումներ չունեն (այսինքն երեք հանրապետություններն էլ չեն առարկում դրանց շինարարությունը սկսելու համար), մինչև Կուրի և Սևանի սխեմաների հաստատումը, նախագծվեն և թույլատրվեն կառուցման համար: Այդ առաջարկությունը ևս ընդունվեց: Մեր հանրապետությունից թույլատրվեց շինարարության պլանների մեջ մտցնել 5 օբյեկտ՝ Թալինի ոռոգման համակարգը, Եղվարդի ջրամբարը, Որոտանի հիդրոհանգույցը, Արմանիսի և Արշալույսի ջրամբարները: Համեմատության համար նշեն, որ Ադրբեջանին թույլատրվեց կառուցել 4 օբյեկտ, որից մեկը ջրամբար, Վրաստանին՝ 3:

Այսպիսով, նպատակաւաւաց և համառ աշխատանք տարվեց, որպեսզի մեր

հանրապետության ջրային պաշարները պահվեին Հայաստանում: Այնուհետև մենք ձեռնամուխ եղանք վերոհիշյալ օբյեկտների նախագծմանն ու կառուցմանը: Կուր գետի ջրային պաշարների օգտագործման խնդիրը այսօր էլ չափազանց կարևոր է: Ցավոք TESIS-ի կողմից իրականացվող Կուր և Նրա վտակ Արաքս գետերի ջրային ավազանների պաշարների կառավարման և մոնիտորինգի ծրագիրը, որը չափազանց կարևոր է Հայաստանի Հանրապետության համար, իրականացվում է առանց մեր կողմի ակտիվ մասնակցության: Այս գործում հապաղել չի կարելի: Անհրաժեշտ է կտրուկ միջոցներ ձեռնարկել ծրագրի մշակմանը հանրապետության մասնակցությունը ակտիվացնելու ուղղությամբ:

2. 1980-ական թվականներին սկսվեց Որոտանի հիդրոհանգույցի նախագծումը, որի տեխնիկատնտեսական հիմնավորումն արդեն կար: Նախատեսվում էր Որոտանի 21,6 կմ երկարության թունելով Սպանդարյանի ջրամբարից տարեկան 165 մլն խմ ջուր բերել Կեչուտի ջրամբար, այնտեղից՝ Արփա-Սևան թունելով Սևանա լիճ տեղափոխելու համար: ՀՀ կառավարությունը հարց բարձրացրեց ԽՍՀՄ կառավարության առջև՝ թույլատրել Որոտանի հիդրոհանգույցի շինարարությունը տեխնիկատնտեսական հիմնավորման հիման վրա, մինչև տեխնիկական նախագծի հաստատելը: Միութենական կառավարությունը համձնարարեց ԽՍՀՄ Պետպլանին հարցը քննարկել և առաջարկություն տալ: 1981 թ. ապրիլին Պետպլանը, քննարկելով ՀՀ կառավարության առաջարկը, համաձայնություն տվեց սկսելու շինարարությունը և որոշման նախագիծը ներկայացրեց ԽՍՀՄ Նախարարների խորհուրդ:

Աղբբեջանական կողմը ԽՄԿԿ Քաղբյուրոյի անդամ Հ. Ալիևի օգնությամբ բողոք ներկայացրեց ԽՍՀՄ կառավարություն: Հանձնաժողով հավաքվեց կառավարության նախագահի տեղակալ Ջ. Նուրիևի մոտ: Հայաստանը ներկայացնում էի ես: Աղբբեջանական կողմի առաքելության գլխավոր փաստարկը մորից խարսխված էր այսպես կոչված ազգային գործոնի վրա: Իբր թե Որոտանի ստորին հատվածում ապրող քրդերը կարող են հիվանդագին ընդունել այդ կառույցի շինարարությունը, որը նեղ կացության մեջ կդնի Աղբբեջանին՝ ազգամիջյան խնդիրների և սանիտարական խնաստով: Տեղյակ պահվեց, որ Կուրաթլիի բնակիչները բոլորը աղբբեջանցիներ են և անձնագրերում էլ այդպես գրված է: Մենք կրկին հիշեցրինք, որ Որոտան (Բազարչայ) գետի ամբողջ հոսքը 1388 մլն խմ է: Ինչ սանիտարական աղետ կարող է առաջանալ, եթե այդ ծավալից ընդամենը 165 մլն խմ ջուր վերցնենք Սևանի համար, որի վիճակը աղետալի է: Հանձնաժողովը համաձայնեց մեր առաջարկության հետ: Քննարկումներից հետո 1981 թ. ապրիլի 18-ին ստորագրվեց արձանագրություն (ի. ծ. 1468), որտեղ թույլատրվեց սկսել Որոտանի հիդրոհանգույցի շինարարությունը, ինչպես նաև ամրագրվեց Որոտանի ամողջ հոսքը (1,388 մլն խմ) 50-ական տոկոսով Հայաստանի և Աղբբեջանի միջև բաժանելը: Հիմք ընդունելով հանձնաժողովի արձանագրությունը՝ ԽՍՀՄ կառավարությունը ընդունեց N 725 որոշումը Որոտանի հիդրոհանգույցի շինարարության մասին, որը շահագործման կհանձնվի 2003 թվականին:

3. Այդ տարիներին Աղբբեջանը Իրանի հետ միասին Արաքս գետի վրա սկսել էր Խուղաֆերիմի հիդրոհանգույցի շինարարությունը: Այս անգամ մենք նամակ ուղարկեցինք ԽՍՀՄ Նախարարների խորհուրդ, բողոքելով, որ կառույցի շինարարությունը չի համաձայնեցված Հայաստանի կառավարության հետ: ԽՍՀՄ

կառավարությունը 1982 թ. ապրիլին (N կկ 9006) հանձնարարեց ԽՍՀՄ Պետշինին, Պետպլանին և Մեխորացիայի և ջրային տնտեսության նախարարությանը քննարկելու հարցը: Քննարկումը ցույց տվեց, որ իրոք այդ հիդրոհամգույցի ջրի ծավալը չի համապատասխանում Աղբեջանին հասանելի ջրային պաշարներին: Կազմվեց համապատասխան փաստաթուղթ, որով Խուդաֆերինի հիդրոհամգույցի ջրատարողությունը պետք է կրճատվեր 200 մլն խմ-ով: Որոշվեց, որ այդ հիդրոհամգույցը, ինչպես նաև Աղբեջանում Արաքս գետի վրա կառուցվող հիդրոտեխնիկական և ջրատնտեսական մյուս օբյեկտների շինարարությունը չպետք է ազդի Հայաստանում այն ջրամբարների ստեղծման ու ջրատնտեսական օբյեկտների շինարարության վրա, որոնք նախատեսված են ԽՍՀՄ Կենտկոմի և ԽՍՀՄ կառավարության 1977 թ. հոկտեմբերի 13-ի «Հայաստանում ոռոգելի հողագործության հետագա զարգացման և արդյունավետության բարձրացման միջոցառումների մասին» N 925 և 1978 թ. սեպտեմբերի 28-ի «Սևանա լճի բնական պաշարների պահպանման և արդյունավետ օգտագործման միջոցառումների մասին» N 812 որոշումներով:

Այս ամենը մեկ անգամ ևս հաստատում են այն ճշմարտացի միտքը, որ ջրային ռեսուրսների տնօրինումը, տիրապետումը և օգտագործումը ունեն վիթխարի նշանակություն, ինչպես մեր երկրի, այնպես էլ յուրաքանչյուր երկրի համար: ՀՀ կառավարության խնդիրն է մշակել համապատասխան ծրագրեր ուղղված ազգային ջրային պաշարի լրիվ և արդյունավետ օգտագործման խնդիրների լուծմանը:

Հատկանշական է, որ ՀՀ ջրային օրենսգիրքը սահմանել է անդրսահմանային ջրային ռեսուրսների օգտագործման և պահպանման պայմանները: Մասնավորապես սահմանված է, որ հանրապետության տարածքում ձևավորվող անդրսահմանային ջրային ռեսուրսների նկատմամբ, մինչև Հայաստանի Հանրապետության պետական սահմանի հատելը, կիրառվում են ՀՀ ջրային օրենսգրքով նախատեսվող նորմերը: Իսկ անդրսահմանային ջրային ռեսուրսների օգտագործման և պահպանության պայմանները պետական սահմանի վրա սահմանվում են Հայաստանի Հանրապետության և սահմանակից երկրների միջպետական համաձայնագրերով կամ պայմանագրերով:

Ջրօգտագործման բնագավառում մեզ անհրաժեշտ է շարունակել հարևան երկրների հետ փոխշահավետ համագործակցությունը: Այսօրվա դրությամբ հրատապ խնդիր է բանակցություններ վարել Թուրքիայի հետ՝ Սուրմալուի ջրամբարի շինարարության շուրջ, որը երկուստեք շահավետ պայմանագիր է: Ջրամբարի նախատեսվող ծավալը 600 մլն խմ է, ՀԷԿ-ի հզորությունը՝ 96 ՄՎՏ է:

Անդրսահմանային ջրային պաշարների համատեղ օգտագործման օպերատիվ հարցերի լուծման համար անհրաժեշտ է ակտիվացնել համապատասխան պետական կառավարման մարմինների և մշտական գործող միջպետական հանձնաժողովների գործունեությունը:

Կարևորագույն խնդիր է նաև միջազգային պայմանագրերով սահմանված նորմերի կիրառումը, քանի որ ըստ ՀՀ ջրային օրենսգրքի 2-րդ հոդվածի, եթե Հայաստանի Հանրապետության միջազգային պայմանագրերով սահմանված են այլ նորմեր, քան նախատեսված են մեր ջրային օրենսգրքում, ապա գործում են միջազգային պայմանագրի դրույթները:

Հարկ է նշել, որ տարբեր փաստաթղթերում միջազգային ջրերի որակավորման միջազգային սահմանները տարբեր են: Ընդունված պայմանագրերի սահմանումից կախված՝ տարբեր են նաև կիրառվելիք կանոնների օգտագործման շրջանակները: Վերոհիշյալ պայմանագրերից ամենագերիշխող փաստաթղթերը հետևյալներն են՝

- 1966 թ. Հելսինկիի կոնվենցիան միջազգային գետերի ջրերի օգտագործման մասին,
- ԵՏՀ 1992 թ. կոնվենցիան անդրսահմանային ջրային հոսքերի և միջազգային լճերի պահպանության և օգտագործման մասին,
- 1997 թ. ՄԱԿ-ի միջազգային ջրային հոսքերը նավարկության համար չօգտագործելու մասին օրենքը,
- 1997 թ. ՄԱԿ/ԵՏՀ անդրսահմանային ենթատեքստում շրջակա միջավայրի վրա ազդեցության գնահատման կոնվենցիան:

GEF-ի շահագործողական ռազմավարության մեջ նշված է, որ «GEF-ի կողմից ֆինանսավորվող միջազգային ջրային գործունեությունների համընդհանուր ռազմավարական հիմքը կողմերի համաձայնեցված աճող ծախսերի բավարարումն է», որը նպատակ ունի օժանդակել երկրներին ավելի լավ պատկերացնելու շրջակա միջավայրի այն վտանգներն ու մտահոգությունները, որոնք վերաբերում են իրենց միջազգային ջրերին, ինչպես նաև ջրօգտագործման բնագավառում նրանց համագործակցությանը՝ անդրսահմանային ջրերին առնչվող շրջակա միջավայրի խնդիրները հստակեցնելու և հասցեագրելու նպատակով: Միջազգային ջրային գործունեություններն ուժեղացնելու այլ նախաձեռնություններից կարելի է նշել, որ վերջերս Կովկասում գործող շրջակա միջավայրի տարածաշրջանային կենտրոնը (REC), որը հիմնադրվել է Վրաստանում, 1999 թ., հետևելու է մոնիտորինգի և տվյալների հավաքման խնդիրներին: Մեզ անհրաժեշտ է հստակեցնել մեր անելիքները այս կարևոր բնագավառներում ևս:

Ստացվել է 28.VII.2003

Biolog. J. of Armenia, 3 (55), 2003

УДК 575:599.9

CELL TYPE SPECIFIC SPLICING of a HETEROLOGOUS EXON MEDIATED by *cis* ELEMENTS from FIBROBLAST GROWTH FACTOR RECEPTOR 2 Pre-mRNA

R.H. HOVHANNISYAN, R.P. CARSTENS

*Renal-Electrolyte and Hypertension Division, 700 Clinical Research Building,
415 Curie Boulevard, e-mail: ruhov@yahoo.com
University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, PA 19104-6144, USA*

Splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) pre-mRNA is an example of tightly regulated alternative splicing in which exons IIIb and IIIc are utilized in a mutually exclusive manner in different cell types. Appropriate splicing of exon IIIb in prostate cancer DT3 cells requires previously described *cis* elements which activate splicing of the upstream exon. We supposed that these elements could also repress splicing of an downstream exon (IIIc exon in the case of FGF-R2 pre-mRNA). As a model minigens containing *cis* elements in different combinations upstream of a heterologous exon from cardiac troponin I (cTNI) flanked by β -globin intron have been used. Results of transfection of these constructs in DT3 and AT3 cancer cell lines have supported our suggestion. Regulation of alternative splicing could probably be occurred through formation a stem structure between ISE-2 and ISAR sequences and its interaction with ISE-3.

Օգտագործվել են մինիգեններ, որոնք պարունակում են տարբեր համակցություններում կարդիոտրոպինի (cTNI) գենից օտարածին եզրոնի *cis* էլեմենտներ β -գլոբուլինի գենի ինտրոնների շրջանակներում: Սպլայսինգի ակտիվացումը կարգավորումը ամենայն հավանականությամբ իրականացվում է միջուկային կառուցվածքի ձևավորման ճանապարհով ISE-2 և ISAR նուկլեոտիդ հաջորդականությունների միջև և ISE-3-ի հետ նրա փոխազդեցության միջոցով:

Сплайсинг рецептора 2 фактора роста фибробластов (РФРФ2) является наглядным примером регуляции альтернативного сплайсинга, при котором в различных видах клеток на взаимоисключающей основе используется либо экзон IIIb, либо IIIc. Обычный сплайсинг экзона IIIb в клетках рака простаты DT3 сопровождается участием ранее охарактеризованных *cis* элементов, которые активируют сплайсинг вышерасположенного экзона. Мы предположили, что эти элементы также могут репрессировать сплайсинг нижерасположенного экзона (экзона IIIc в случае пре-мРНК РФРФ2). В качестве модели мы использовали минигены, в различных комбинациях содержащие *cis* элементы чужеродного экзона из гена кардиотропина (cTNI) в окружении интронов гена β -глобулина. Результаты трансфекции этих минигенов в раковые клетки простаты DT3 и AT3 подтвердили наше предположение. Регуляция альтернативного сплайсинга, возможно, осуществляется путем формирования стволовой структуры между нуклеотидными последовательностями ISE-2 и ISAR и ее взаимодействия с ISE-3.

Key words: *gene engineering - fibroblast - splicing - exon*

Alternative splicing represents a commonly used pathway through which different gene products can be produced from a single gene. An example of alternative

splicing in which tight regulation results in a very defined cell type discrepancy in the differential expression of isoforms occurs during the splicing of the second half of the third immunoglobulin-like domain of the fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2). Mutually exclusive splicing results in a mRNA containing either the 148-nucleotide IIIb exon or 145-nucleotide IIIc exon (Fig. 1), a choice which is specific for a given cell type. The isoform of FGF-R2 that results when exon IIIb is included, FGF-R2 (IIIb), is the exclusive gene product observed in normal prostatic epithelia and in a well-differentiated, androgen-dependent DT3 prostate tumor or cell line. A poorly differentiated and androgen-independent AT3 tumor exhibits a change in splicing that results in loss of FGF-R2 (IIIb) and in expression of FGF-R2 (IIIc). The markedly different growth factor specificities of the resulting receptors alter signal transduction pathways, which have been proposed to be involved in the progression of prostate cancer [1-3]. Thus, investigation of general mechanisms of splicing regulation can have more far-reaching implications towards understanding how alterations in normal cellular processes can lead to cancer development.

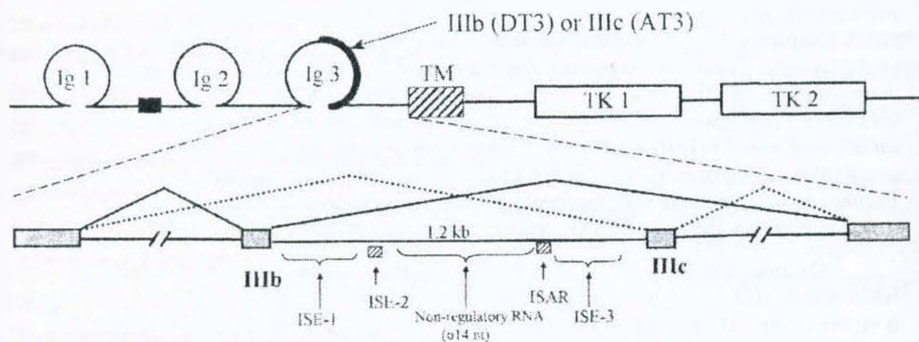


Fig. 1. Schematic representation of alternative splicing variants of FGF-R2. At top is a protein domain map with the region encoded by exons IIIb or IIIc indicated. At bottom is a map of the pre-mRNA. Hatched boxes represent defined intronic splicing elements and regions containing other elements are indicated by brackets. The horizontal arrows and dashed line underneath the pre-mRNA represent the sequence that was positioned in a heterologous intron for transfection studies.

Studies of rat and human FGF-R2 splicing have revealed the presence of several *cis* elements, which can alter the splicing of mutually exclusive alternative exons IIIb and IIIc [4-8]. We have previously characterized ISAR (for Intronic Splicing Activator and Repressor), a *cis* element located in the intron between exons IIIb and IIIc of the rat gene. This element dramatically increases the splicing efficiency of the upstream IIIb exon in DT3 cells and represses the splicing of the downstream IIIc exon [6,9]. ISAR was not shown to have an effect on the relative inclusion of either exon in AT3 cells. We have identified a second element, ISE-2 (for Intronic Splicing Enhancer), which is located 736 nt upstream of ISAR. A role in the regulation of FGF-R2 splicing can also play ISE-1 and ISE-3, other possible intronic *cis* elements.

A convenient method to assess the function of the above mentioned elements is to determine the ability of each individual element to modulate the splicing pattern of a heterologous exon [10].

Materials and methods. Plasmid construction. The plasmid DNAs used in this study were all made on the base of pPIP11 adenoviral splicing construct described previously [6]. pI-11(-H3)PL minigene was derived from pI-11 by digestion with Hind III restriction endonuclease. The digested ends were further blunted with *Pfu* polymerase (Stratagene) and religated with T4 DNA ligase. The resulting plasmid was created by cloning annealed oligonucleotides Poly F (5'-CTAGAGGCCGCTCGACGCTAGCGCGGCCGCGATAT CATCGATACTAGTGGCC-3') and Poly R2 (5'-TCGAGGGCCACTAGTATCGATGA TATCGCGGCCGCGCTAGCGTCTCGA CGGCC-3') in *Xba* I and *Xho* I sites of pI-11(-H3) plasmid. As a source of heterologous exon a splicing construct from Tom Cooper (Baylor Univ.) that consists of truncated exon (28 nt) of cardiac troponin I (cTNI) flanked by β -globin intron was used. This sequence was cloned in Cla I and *Xho* I sites of pI-11(-H3)PL minigene. Plasmids studied containing sequences from intron 8 upstream of heterologous exon were obtained following amplification with forward primers 3BF-Two and 3BF-Four, and reverse primer Int 2R2 using templates pI-11-FS: Δ 3 and pI-11-FS: Δ 4 [9].

PCR amplification. PCR from DNA templates was performed with 5 ng of plasmid DNA and *Pfu* DNA polymerase (Boehringer Mannheim) according to the supplier's recommendations. Amplifications were performed with a Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9700. A typical cycle consisted of initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 40 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min. After completion of the final cycle, a final extension was done at 72°C for an additional 7 min.

Cell culture and transfection. AT3 and DT3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone). All transfections were performed in 35-mm-diameter wells with 5 μ l of Lipofectamine (Gibco) according to the supplier's recommendations. Each well was seeded with 4 $\times$ 10⁵ cells 20 to 24 hr prior to transfection. Stable transfections were performed with 2 μ g of linearized minigene DNA, and after 24 to 48 h the cells were trypsinized and reseeded in 75-cm² flasks containing Geneticin (Gibco) at an active concentration of 400 μ g/ml, Penicillin (100 U/ml) and Streptomycin (100 μ g/ml). Selection was performed until isolated colonies were obtained (usually 14 to 20 days). Pooled colonies were then harvested for RNA preparation.

RNA purification and RT-PCR analysis. Total cellular RNA was isolated from transfected cells by the method of Chomczynski and Sacchi [11]. Two micrograms of total RNA was heated to 100°C, chilled on ice, and reverse transcribed in a reaction volume of 20 μ g containing 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol, 1 mM deoxynucleoside triphosphates, 100 ng of random hexamers, 2 U of RNasin (Promega), and 200 U of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco) at 37°C for 1 h. Samples were then heated to 90°C for 5 min and then chilled on ice. Two microliters of each reverse transcription (RT) reaction mixture was amplified in 100- μ l PCR reaction mixture containing 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M (each) dATP, dGTP, and dTTP, 50 μ M dCTP, 100 nM each primer, 10 200 μ Ci of [α -³²P]dCTP, and 2.5 U of *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim). The primers used were PIP10-F (5'-CCCGGGGGTACCGGGCGGAATTTCG AATTGAGCTCACTC-3') and PIP11-R (5'-CCCGGGGACTAGTAAGCTTAGGCTCT TGGCGTT-3'). Amplification conditions consisted of an initial denaturation at 94°C for 5 min, followed by 25 to 30 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 1 min and a final extension at 72°C for 7 min. Aliquots representing equal amounts of each PCR reaction mixture were loaded directly on nondenaturing 5% polyacrylamide gel at 100 V to 4-5 h, followed by drying and exposure to Amersham Hyperfilm-MP. Analysis was performed with a Molecular Dynamics PhosphorImager.

Results and discussion. Study of alternative splicing is complicated by the fact that regulation requires the presence of several *cis* elements. It appears that the factors that interact with these elements in combination determine the splicing pattern in a given cells. It is often not clear whether a defined RNA element or group of elements independently affects splicing efficiency or whether some of these elements must act in concert. In the case of FGFR2, a number of elements besides ISE-2 and ISAR are clearly involved in modulating splicing efficiency. In our previous studies of rat FGFR2 transcripts we have also identified a couple of other

intronic *cis* elements such as ISE-1 and ISE-3, downstream of exon IIIb, that affect splicing of this pre-mRNA. Studies of a group analyzing human FGFR2 splicing have identified three intronic elements (termed IAS-1, IAS-2, and IAS-3, for Intron Activator of Splicing) [4,7]. While IAS-2 and IAS-3 are highly similar to the rat elements we call ISE-2 and ISAR, respectively, IAS-1 is an uridine rich element that binds the ubiquitous TIA-1 protein and promotes splicing to the exon IIIb 5'-splice site in a non-tissue-specific manner. It thus appears that IAS-1 activates exon IIIb splicing, but that tissue specific activation mediated by other *cis* elements (such as dsRNA-SE and ISE-3) is required to result in efficient cell specific exon IIIb splicing. Rat FGFR2 also contains an uridine stretch downstream of the exon IIIb 5'-splice site, ISE-1, and although the sequence is not identical to IAS-1, it is likely that a similar phenomenon activates exon IIIb splicing in rat transcripts as well.

We chose to limit study of RNA *cis* elements to sequences in the intron between exon IIIb and exon IIIc (intron 8) that have been shown to activate upstream exon IIIb splicing. Some of these elements were supposed to decrease the splicing efficiency of the downstream exon IIIc. To confirm this hypothesis minigenes were generated in which FGFR2 intron 8 sequences were positioned upstream of T.Cooper's R35(28) heterologous exon [10] and tested for ability to repress splicing (Fig. 2). These minigenes were transfected into DT3 and AT3 cells, followed by RT-PCR to determine levels of exon inclusion versus skipping. Because a deletion of 614 nt from the middle of this intron had previously been shown to be inessential for splicing regulation, we did not include this region in any minigenes.

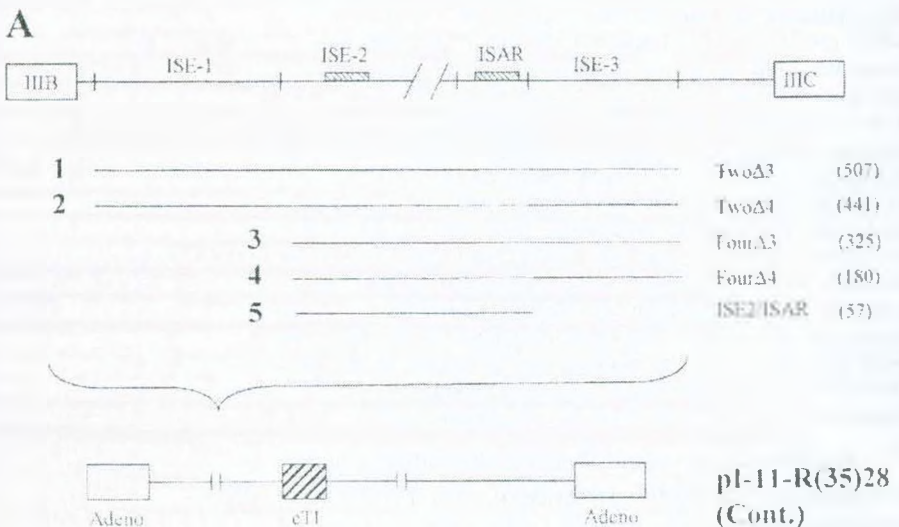


Fig. 2. Intron 8 elements from FGF-R2. Solid lines represent portions of this intron that were relocated upstream of the cTNI exon. Dashed lines indicate deleted sequence followed by the size of the repositioned intron sequence.

As seen in Fig 3, regions of FGFR2 intron 8 that include both ISE-2 and ISAR sequences followed by ISE-3 decreased dramatically splicing of the downstream exon from 61.4 (control) to 24.2 for pI-CX-R35(28)-TwoΔ3 and 10.4 percent for

pl-CX-R35(28)-Four Δ 3 in DT3 cells. We suppose that ISE-3 can perform a role of not only intronic splicing enhancer but also intronic splicing silencer (ISS) for a downstream exon. On the other hand, a sequence containing ISE-1, ISE-2 and ISE-3 but not ISAR did not repress splicing of the heterologous exon. In AT3 cells, insertion of these sequences did also not decrease splicing of the downstream exon, and in fact an increase in exon inclusion was even seen. Thus, *cis* elements in this intron, which include ISE-2, ISAR, and ISE-3, efficiently repress splicing of a downstream heterologous exon in a cell-specific manner. Deletion of the ISAR sequence resulted in increase in exon inclusion from 24.2 to 71.1 percent for Two Δ 3 and Two Δ 4 series, and from 10.4 to 30.1 percent for Four Δ 3 and Four Δ 4 series plasmids. However, a 57 nt fragment containing ISE-2 and ISAR only did not repress downstream exon splicing in DT3 cells, consistent with a possible requirement for ISE-2 and ISAR to cooperate in order to repress or/and activate splicing. Although variable levels of inclusion were observed in AT3 cells with these constructs, it should be noted that inclusion of these sequences never significantly decreased splicing of that of the control.

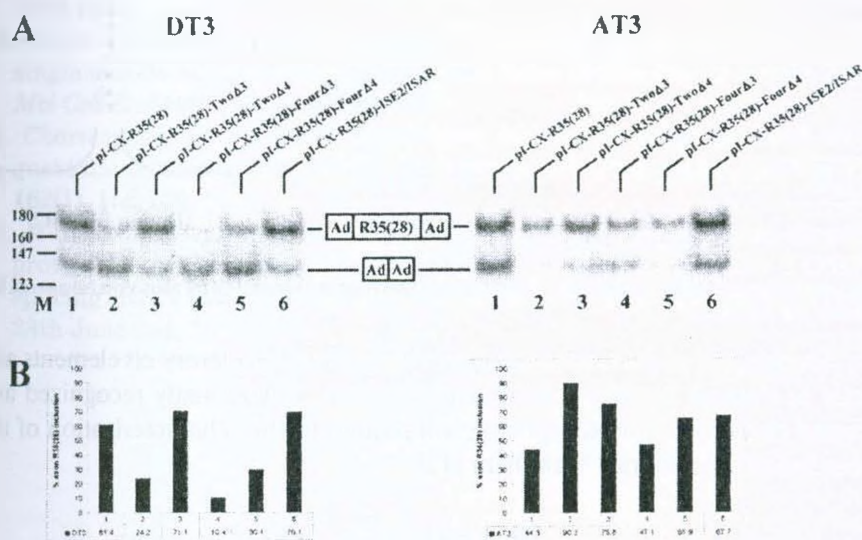


Fig. 3. Intron 8 sequences from FGF-R2 can repress *in vivo* splicing of heterologous cTroponin I exon located downstream in DT3, but not AT3 cells. **A.** RT-PCR of RNA from DT3 and AT3 cells stably transfected with minigenes containing intron 8 elements from FGF-R2 that were relocated upstream of the cTNI (R35(28)) exon. Boxes labeled Ad indicate the adenoviral exons. **B.** Graphical representation of percent exon inclusion.

Studies performed by another group investigating splicing of human FGFR2 demonstrated a sequence that was highly similar to the rat ISAR that was also essential for exon IIIb splicing; a sequence they termed IAS-3 [7]. These studies also implicated a second element, IAS-2, located approximately 700 nt upstream of IAS-3 and furthermore suggested that these elements form a secondary structure that is involved in activation of exon IIIb splicing. We identified a rat sequence, ISE-2, highly similar to IAS-2 which is located 736 nt upstream ISAR. Alignment of

ISE-2 with ISAR was consistent with formation of a putative RNA secondary structure although one not identical to that proposed from the human sequence elements (Fig. 4). This was also consistent with the observation that a minimal 20 nt ISAR was involved in exon IIIB activation since additional nucleotides did not contribute to formation of this stem structure. We suppose that in our model, the stem structure formed between ISE-2 and ISAR is required not only for activation of an upstream exon splicing but also for repression of a downstream exon splicing.

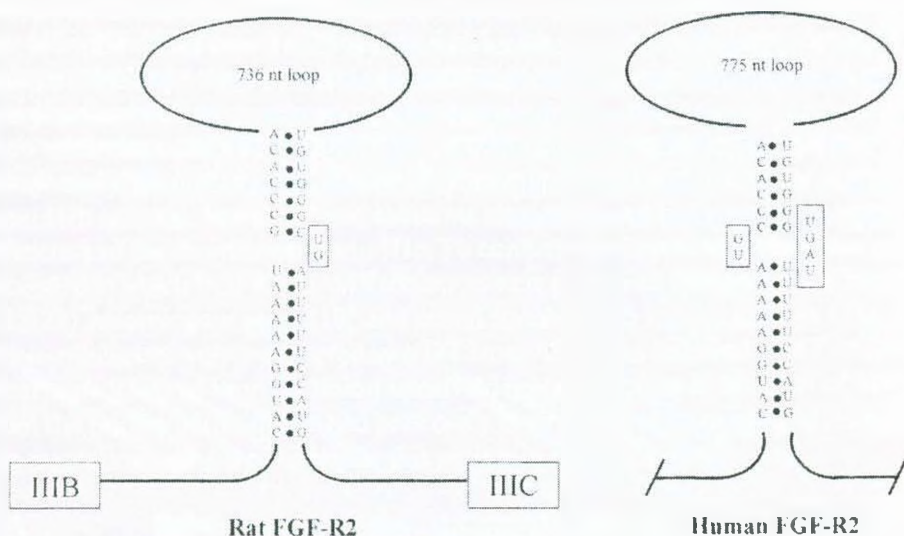


Fig. 4. Putative secondary structure between ISE-2 and ISAR in rat and human FGFR2 transcripts (sequences that do not base pair are boxed).

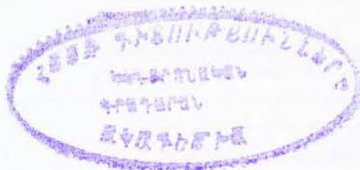
Elucidation of the mechanism by which several regulatory *cis* elements are, directly or through forming a secondary structure, differentially recognized and processed during pre-mRNA splicing will require further characterization of the protein factors that interact with them [12].

REFERENCES

1. Yan G., Fukabori Y., McBride G., Nikolaropolous S., McKeehan W.L. Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol* 1993, **13**(8), 4513-4522.
2. Carstens R.P., Eaton J.V., Krigman H.R., Walther P.J., Garcia-Blanco M.A. Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 2 (FGF-R2) in human prostate cancer. *Oncogene* 1997, **15**(25), 3059-3065.
3. Matsubara A., Kan M., Feng S., McKeehan W.L. Inhibition of growth of malignant rat prostate tumor cells by restoration of fibroblast growth factor receptor 2. *Cancer Res* 1998, **58**(7), 1509-1514.
4. Del Gatto F., Breathnach R. Exon and intron sequences, respectively, repress

- and activate splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon. *Mol Cell Biol* 1995, **15**(9), 4825-4834.
5. Hovhannisyan R.H., Muh S.J., Carstens R.P. Intronic FGFR2 cis-elements confer cell-type specific splicing regulation to heterologous exons *in vivo* and *in vitro*. RNA 2002. 7th Ann. Meet. of the RNA Soc., Madison (WI), May 28th - June 2nd, 2002, 186.
 6. Carstens R.P., McKeehan W.L., Garcia-Blanco M.A. An intronic sequence element mediates both activation and repression of rat fibroblast growth factor receptor 2 pre-mRNA splicing. *Mol Cell Biol* 1998, **18**(4), 2205-2217.
 7. Del Gatto F., Plet A., Gesnel M.C., Fort C., Breathnach R. Multiple interdependent sequence elements control splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon. *Mol Cell Biol* 1997, **17**(9), 5106-5116.
 8. Jones R.B., Carstens R.P., Luo Y., McKeehan W.L. 5'- and 3'-terminal nucleotides in the FGFR2 ISAR splicing element core have overlapping roles in exon IIIb activation and exon IIIc repression. *Nucleic Acids Res* 2001, **29**(17), 3557-3565.
 9. Carstens R.P., Wagner E.J., Garcia-Blanco M.A. An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Mol Cell Biol* 2000, **20**(19), 7388-7400.
 10. Cooper T.A. Muscle-specific splicing of a heterologous exon mediated by a single muscle-specific splicing enhancer from the cardiac troponin T gene. *Mol Cell Biol* 1998, **18**(8), 4519-4525.
 11. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate- phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987, **162**(1), 156-159.
 12. Muh S.J., Hovhannisyan R.H., Carstens R.P. A novel genetic screen for protein factors that regulate fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) splicing. RNA 2002. 7th Ann. Meet. of the RNA Soc., Madison (WI), May 28th-June 2nd, 2002, 197.

Поступила 27.V.2003



Biolog. J. Armenia, 3 (55), 2003

УДК 579.22:579.6:579.8

ISOLATION and CHARACTERIZATION of STARCH-UTILIZING LACTIC ACID BACTERIA

I.A. BOURIAKO*, N.I. ASTAPOVICH*, S.I. DUBATOUKA*,
A.G. LOBANOK*, G. ANTRANIKIAN**

*Institute of Microbiology, Belarus National Academy of Sciences, 220141 Minsk, Belarus
e-mail: natali@mbio.bas-net.by

**Technical University Hamburg-Harburg, Institute of Technical Microbiology,
21073 Hamburg, Germany

Lactic acid bacteria were isolated from various plants, fodder, food products as well as from rumen, intestines and excreta of calves, cows, goats, horses, pigs to reveal cultures able to digest starch. More than 600 strains were obtained and grouped according to their morphological, physiological and biochemical patterns. Preliminary identification of selected strains showed a taxonomic variety of amylolytic lactic acid bacteria within the genera *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*. It was established that active strains possessing ability to utilize insoluble starch are rare and found predominantly among lactic acid bacteria – constituents of calf gastrointestinal microbial cenosis. *Lactobacillus plantarum* isolated from maize silage was selected and characterized as the most promising raw starch-utilizing strain.

Սեկուսացվել են կաթնաթթվային բակտերիաներ, որոնք ընդունակ են յուրացնել օսլա տարրեր աղբյուրներից բույսերից, սիլոսի սննդամթերքներից, ինչպես նաև գյուղատնտեսական կենդանիների (ռչխար, կով, հորթ, խոզ, ծի) աղեստամոքսային տրակտի պարունակությունից: Ստացվել և դիֆերենցվել են այդ բակտերիաների 600-ից ավելի մաքուր կուլտուրաներ իրենց մորֆոլոգիական, ֆիզիոլոգիական և կենսաքիմական պարամետրերով: Ստացված շտամների նախնական իդենտիֆիկացիան թույլ է տվել բացահայտել ամիլոլիտիկ ակտիվությամբ օժտված կաթնաթթվային բակտերիաների տաքսոնոմիական բազմազանությունը. հայտնաբերվել են *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* ցեղերի ներկայացուցիչները: Հաստատվել է, որ չլուծվող օսլա յուրացնող ակտիվ շտամները հանդիպել են հազվադեպ և հաճախ մեկուսացվել են հորթերի աղեստամոքսային տրակտի միկրոբային ցենոզից: Եզիպտացորենի սիլոսի միկրոֆլորայից անջատված *Lactobacillus plantarum*-ի կուլտուրաները բնութագրվել են որպես չլուծվող օսլայի յուրացնող առավել հեռանկարային շտամներ:

Проведено выделение молочнокислых бактерий, способных утилизировать крахмал из разных источников: растений, силоса, пищевых продуктов, а также содержимого желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных (овец, коров, телят, свиней, лошадей). Получены и дифференцированы по морфологическим, физиологическим и биохимическим параметрам более 600 чистых культур этих бактерий. Предварительная идентификация полученных штаммов позволила установить таксономическое разнообразие молочнокислых бактерий, обладающих амилолитической активностью: выявлены представители родов *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*. Установлено, что активные штаммы, способные утилизировать нерастворимый крахмал, встречались редко и чаще всего выделялись из микробного ценоза желудочно-кишечного тракта телят. Выделенные из микрофлоры кукурузного силоса культуры *Lactobacillus plantarum* охарактеризованы как наиболее перспективные для утилизации нерастворимого крахмала.

Key words: *Lactic acid bacteria - Lactobacillus plantarum - starch - amylolytic activity*

Lactic acid bacteria are the most strictly substrates depending microorganisms among known non-pathogenic prokaryotes. These bacteria distinguished by effective fermentative type of metabolism consume mainly mono- and disaccharides as the substrates. The ability to utilize polysaccharides, including starch, is found relatively rare in this microbial group [1]. The significance of seeking of active amylolytic strains is motivated both by possibility to reduce cultivation costs and prospects of recycling starch containing wastes, ensiling hardly fermentable plants, synthesis of end-products (lactic acid, microbial biomass) by fermentation of starch and starch-containing materials.

Lactic acid fermentation has been extensively investigated due to evident industrial applications of the product. It is widely used by the food industry (as an acidulant, as a preservative, and for stearyl-2-lactylate synthesis), in pharmaceutical and chemical industries (for polylactic acid, green solvent, and slow release carriers). Annual global manufacture of lactic acid is close to 50,000 t, with about equal amounts being produced by fermentation and chemical synthesis [12]. Lactic acid is commercially produced by fermentation of sucrose, glucose, molasses or milk whey by *Lactobacillus* sp. A part of supply is derived from starch to decrease substrate costs by two-step process of saccharification with acid or microbial amylase followed by *Lactobacillus* fermentation [12]. Conventional biotechnological production of lactic acid from starchy materials, such as barley, maize, potato, or rice requires pretreatment, like gelatinization and liquefaction, usually at elevated temperature in limits of 90–130°C at least for 15 min, followed by acid or enzymatic saccharification of starch to glucose (during 24–96 hours) and subsequent conversion of glucose to lactic acid by lactic acid fermentation [6]. Hence, application of lactic acid bacteria possessing high amylolytic activity and ability to ferment starch, starchy materials and wastes directly to lactic acid is desirable to save the time and process costs.

The main purpose of this work is isolation and characterization of lactic acid bacteria possessing a substantial amylolytic activity to obtain most promising raw starch-utilizing strains.

Materials and methods. Plant, fodder, food samples, contents of the rumen and intestines of ruminant animals as well as excreta of cows, pigs, horses, goats have been used as sources for isolation of lactic acid bacteria with amylolytic activity on media containing starch as the only carbon source. Direct plating of serial dilutions of samples on starch-containing agar as well as dilution plating after enrichment culture procedure were applied. Pure cultures were obtained from colonies showing starch lysis zones. The cultures were grown in modified MRS broth [3] containing insoluble (raw) starch as the only carbon source.

Selected bacterial isolates were examined for carbohydrate fermentation pattern and other characteristics essential for genera and species identification by standard methods [1]. Each experiment was performed at least twice to assess reproducibility, and species were identified by comparing the reaction profile with that of type strains.

Lactic acid bacteria were routinely maintained at 10°C in modified MRS medium where glucose was replaced by 1% commercial insoluble potato starch. Strains were subcultured at 20–30 days intervals. Different methods of long-term maintenance of cultures were tested in special series of experiments. Conservation in glycerol (20-, 40-, 60-, 80% solution at -10, -40, -60°C), in liquid nitrogen (suspensions of 10% glycerol and 1% gelatin with 7% sucrose) and lyophilization

with cryoprotectors were used. 18-24- hours cultures of the third generation served as inocula (1%, v/v). The batch fermentation was conducted in 2000 ml flasks with 1800 ml of medium containing in g/l: mashed potato - 200.0, peptone - 10.0, K_2HPO_4 - 0.5, KH_2PO_4 - 0.5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0.2, $MnSO_4 \cdot H_2O$ - 0.05, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ - 0.5. The lactobacilli were cultivated at 30°C.

Viable cells (CFU/ml – colony-forming units per 1 ml of cultural liquid) were counted by final dilution technique in light (0.3 %) mash agar. Tubes were incubated at 30–37°C for 48hrs. Total titratable acidity was estimated by titration with 0.1 N NaOH in presence of phenolphthalein as an indicator. The results were expressed in Turner degrees (1°T is equivalent of 0.1 N NaOH amount (ml) sufficient for titration of 100 ml cultural liquid). Raw starch contents was controlled by measurement of dry weight after two washing and centrifugation followed by drying at 105°C for constant weight. Total starch in the media was also estimated by starch-iodine method after cell removal by centrifugation.

Amylase activity was assayed by monitoring starch degradation via measurement of its iodine-complexing ability. One enzyme activity unit was defined as the amount of enzyme sufficient for hydrolysis of 1g starch in 10 min at 40°C, pH 5.5. Lactic acid concentration was determined in the supernatant by HP 4890D unit, USA using 30m capillary column HP INNOVAX (USA) of 0.32mm internal diameter packed with fixed PEG phase 0.5µm thick. Helium served as carrier gas at flow rate 0.66ml/min. Sample volume – 1µl.

Results and discussion. *Screening, isolation and identification screening of lactic acid bacteria.* More than 600 strains of lactic acid bacteria were isolated from different sources including 200 strains from rumen, intestines and excreta of farm animals (cows, goats, horses, pigs) on media containing commercial insoluble potato starch as the only carbon source. The enrichment culture technique as well as direct plating were used. Advantage of enrichment culture technique was established. Amylolytic cultures demonstrated clear zones surrounding colonies on starch-containing media.

Obtained pure cultures were characterized by fermentative carbohydrate metabolism type with generation of acid products, absence of cytochrom-containing respiratory systems, negative catalase reaction and, in most cases, negative nitrate reductase reaction, they are air-tolerant and require nutrient factors. These properties as well as typical morphological and cultural traits (non-sporulating, non-motile gram-positive coccal- or rod-shaped cells, slight surface growth or its absence on agar media, typical colonies) allow to affiliate isolates to lactic acid bacteria.

The total titratable acidity was used as an indicator of acidogenic activity of the cultures at the initial investigation stages. Screening of active acid producers digesting insoluble starch among 400 cultures isolated from various sources (diverse plant materials, including hard-to-ensile substrates, fodder, fermented food stuffs) and 200 isolates from gastrointestinal system of young stock has revealed that active strains are relatively rare and are found predominantly among lactic acid bacteria – representatives of calf gastrointestinal microbial cenosis. The isolates differed in growth and acidogenesis on starch-containing media (active cultures were scarce). The majority of tested strains possessed low acidogenic activity (not more than 60°T) and only singular cultures generated enough acid metabolites to acidulate the cultural media over 80°T (Fig. 1). Almost twice more active amylolytic strains were isolated from rumen as compared to the intestines. Rod-shaped forms prevailed among screened cultures from different parts of gastrointestinal system: their percentage varies in terms of 59% and 73% for calf rumen and intestine isolates, respectively.



Fig. 1. Acidogenic activity of lactic acid bacteria isolated from rumen (a) and intestines (b) of young stock. Titratable acidity of cultural media: 1 – below 60°T, 2 – 61-70°T, 3 – 71-80°T, 4 – over 80°T.

Preliminary identification of selected strains revealed a taxonomic variety of amylolytic lactic acid bacteria: among the strains isolated the representatives of genera *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* were found. It was established that the most active strains were rods isolated from silage. Most promising strains were represented by bacteria of genus *Lactobacillus*. The majority was characterized by presence of fructose diphosphate aldolase and phosphoketolase and ability to ferment both pentose and hexose sugars. The obtained results allowed to refer these strains to facultative heterofermentative group of bacteria of the Genus *Lactobacillus*.

Acidogenic and amylolytic activity of some cultures on modified MRS medium with 1 % insoluble potato starch is illustrated in Table. The most active strain was isolated from silage and identified as *Lactobacillus plantarum*.

Table. Growth, acidogenesis and amylolytic activity of lactic acid bacteria on starch-containing medium

Strains	Isolation source	Biomass yield, g/l	pH	Titratable acidity, °T	Amylolytic activity, U/ml
<i>Lactobacillus</i> sp. 372	Calf rumen	1.34	6.1	60	0.039
<i>Pediococcus</i> sp. 377	Calf rumen	1.56	5.9	78	0.051
<i>Lactobacillus</i> sp. 378	Calf rumen	1.62	5.9	82	0.094
<i>Streptococcus</i> sp. 381	Calf intestines	1.48	6.1	70	0.090
<i>Streptococcus</i> sp. 386	Calf rumen	1.55	6.0	70	0.072
<i>Enterococcus</i> sp. 388	Calf rumen	2.04	5.9	89	0.103
<i>Enterococcus</i> sp. 390	Calf rumen	1.61	6.0	70	0.061
<i>Lactobacillus</i> sp. 391	Calf rumen	1.49	6.0	70	0.055
<i>Lactobacillus</i> sp. 354	Calf intestines	2.01	5.9	80	0.069
<i>Lactobacillus</i> sp. 393	Calf intestines	1.89	6.0	76	0.071
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Maize silage	3.82	5.2	105	1.051

Obtained results correspond well with other reports indicating that the ability to grow and produce lactic acid on starchy substrata is a rare characteristic of lactic acid bacteria. In literature the principal species of this type are represented by *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equines* [5], *Lactobacillus amylophilus* [8,14], *Lactobacillus amylovorus* [7], *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus cellobiosus* [10],

Lactobacillus plantarum [4,11]. As a rule, lactic acid bacteria digest soluble or pretreated starch [6, 11, 14]. The ability to decompose raw starch and starchy substrates was demonstrated in *Str. bovis* 148 isolate from bovine rumen [9], *L. amylovorus* isolated from cattle manure corn – enrichments [13], *L. cellobiosus* isolated from municipal wastes [2] and *L. plantarum* isolated from fermented cassava [4].

Among the strains of lactic acid bacteria screened for growth and acidogenic activity, only selected isolate from silage demonstrated rather high accumulation of acid products after 24 hrs batch culture of free cells on modified MRS medium with different kinds of insoluble starch (1 %). It was found that the selected strain after 18h of growth at 30°C on modified MRS medium with 1% glucose, soluble or insoluble starch accumulated lactic acid in amounts 20.02 g/l, 7.9 g/l, 12.42 g/l, respectively.

Study on maintenance and long-term conservation of lactic acid bacteria showed that lyophilization with cryoprotectors provided hopeful viability and reproduction of strains tested up to one year. Good results were obtained with 40-60% glycerol at - 40 and - 60°C. Conservation in liquid nitrogen both with gelatin and glycerol proved more effective.

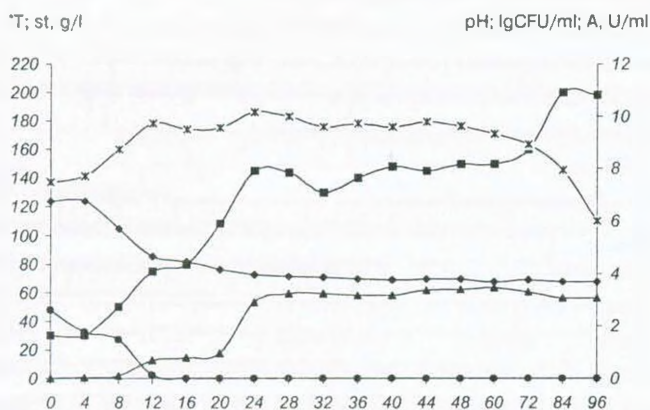


Fig. 2. Fermentation of *L. plantarum* on starchy potato medium. 1 – number of viable cells (lgCFU/ml); 2 – titratable acidity (T); 3 – active acidity (pH); 4 – amylase activity (A, U/ml); 5 – starch (g/l)

Fermentation of selected lactobacilli on starchy potato medium. Investigation of growth, acidogenesis and amylolytic activity dynamics on starchy potato medium revealed high biological potential of the selected *L. plantarum* strain (Fig. 2). By 24 hrs of culture on medium containing 1 % of inoculum number of viable cells reached

$1.5 \cdot 10^{10}$ CFU/ml. The culture selected showed effective insoluble starch transformation: by 14hrs of fermentation starch was not detected in cultural liquid. Intense accumulation of acid metabolites occurred during the growth and resulted in pH decline to 3.7 and upsurge of titratable acidity up to 200°T. Amylolytic activity increased during exponential growth phase up to 3.2 – 3.4 U/ml value by 26 – 48 h and remained at this level till the end of the culture.

Summing up the selected strain of *Lactobacillus plantarum* isolated from maize silage might be of considerable interest for industrial production of the food grade lactic acid directly from raw starchy substrates without preliminary enzymatic or chemical treatment. It may significantly reduce the costs for lactate production and process duration, facilitating solution of waste starch disposal problem.

Acknowledgement. Authors express their sincere gratitude to INTAS for financial support of this work.

REFERENCES

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth Edition/Ed. Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
2. Chatterjee M., S.L. Chakrabarty B.D. Chattopadhyay, Mandal R.K. Biotechnol. Lett. 19. 9, 841-843, 1997.
3. DeMan J.C., Rogosa M., Sharp M.E. J. Appl. Bacteriol. 23. P. 130 - 135 (1960).
4. Giraud E., Champlattier A., Rimbault M. Appl. Environ. Microbiol. 60. 12, 4319-4323, 1994.
5. Hardie J.M. Genus Streptococcus Rosenbach 1884, 22^{AL}, P. 1043 - 1071. In P. H. A. Sneath, N.C. Mair, M.E. Sharpe, and J.S. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology; vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1986.
6. Linko Y.-Y., Javanainen P. Enzyme Microb. Technol. 19, 118-123, 1996.
7. Nakamura L.K. Int. J. Syst. Bacteriol. 31, 56-63, 1981.
8. Nakamura L.K., Crowell C.D. Dev. Ind. Microbiol. 20, 531-540, 1979.
9. Satoh E., Niimura Y., Uchimura T., Kozaki M., Komagata K. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3669-3673, 1993.
10. Sen S., Chakrabarty S.L. J. Ferment. Technol. 62, 407-413, 1984.
11. Shamala T.R., Sreekantiah K.R. Microbiol. 3, 175-178, 1998.
12. Vickroy T.B. Lactic acid. P. 761 - 789. In: Comprehensive Biotechnology. Moo-Young M. (ed), vol. 3. New York: Pergamon Press. 1985.
13. Xiaodong W., Xuan G., Rakshit S.K. Biotechnol. Lett. 19, 9, 841-843, 1997.
14. Yumoto I., Ikeda K. Biotechnol. Lett. 17. 5, 543-546. 1995.

Получена 26.VIII.2003

Biolog. J. Armenia, 3 (55), 2003

УДК 579.663

CONTINUOUS PRODUCTION of LACTIC ACID

M.M. SHAMTSYAN*, E.G. AFRIKIAN**, G. ANTRANIKIAN***

*St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 198013, Russia
e-mail: shamtsyan@yahoo.com

** State Microbial Depository Centre of NAS of Armenia, 378510, Abovian city, Armenia

***Technical University of Hamburg - Harburg, Germany

Lactic acid was obtained by repeated batch and continuous fermentations using as a producer a rumen bacteria *Streptococcus bovis*, possessing high amylolytic activity. A principal possibility and reasonability of lactic acid production by mentioned methods have been shown.

Կաթնաթթուն ստացվել է պարբերական և անընդմեջ եղանակներով: Որպես արտադրիչ օգտագործվել է զանձակային բակտերիա *Streptococcus bovis*-ը, որն ունի բարձր ամիլոլիտիկ ակտիվություն: Ցույց է տրվել վերոհիշյալ եղանակներով կաթնաթթվի արտադրության հնարավորությունն ու նպատակահարմարությունը:

Молочная кислота получена отъемно-доливным и непрерывным способами. В качестве продуцента использована рубцовая бактерия *Streptococcus bovis*, обладающая высокой амилолитической активностью. Показаны принципиальная возможность и целесообразность получения молочной кислоты упомянутыми способами.

Key words: lactic acid - continuous fermentation - *Streptococcus bovis*

Lactic acid is one of the most important substances produced microbiologically and is widely used in food, pharmaceutical, cosmetic and other branches of industry. During the last decades the problems of its production initiated a significant interest of researchers to look for more efficient microbial producers [1, 6]. Hopes for market expansion are combined with utilization of lactic acid and its derivatives as initial materials to synthesize other substances, and first of all the biodegradable polymeric materials, while relatively high cost of lactic acid is limiting its prospects.

To realize an efficient production of lactic acid a novel method of direct fermentation of starch containing substances into lactate using *Streptococcus bovis* cells was previously suggested [3, 4]. Utilization of this microorganism, which possesses amylolytic activity and is a producer of L(+) lactic acid should exclude an energy consuming stage for precooking of starch, and as a result to decrease the cost of the final product.

However, the continuation of the final stage of batch fermentation was valuably prolonged, due to inhibition of producer's growth and lactate production pro-

cesses by accumulated lactate. Finally, this results significantly decrease of the fermentation productivity and increases its total duration.

To overcome this disadvantage, the possibility of lactic acid production by repeated batch or continuous fermentations using *S. bovis* cells was studied.

Materials and methods. The strain of *S. bovis* isolated from the calf rumen having high digestability for hydrolysis of raw cereal starch and characterized as a homofermentative producer of L(+) lactic acid has been applied. Lactic acid was produced by repeated batch and continuous fermentations using as a producer the culture of *S. bovis*. As a carbon source for both types of fermentation a corn starch was used. For lactic acid production by repeated batch fermentations the medium of following composition was applied (g/l): corn starch — 100.0, yeast extract — 5.0, peptone — 5.0, CaCO_3 — 50.0. Medium was sterilized under exsensing pressure of 0.5 atmosphere. When lactic acid was produced continuously, the medium of the same composition was brought into the fermentor, while into the media fed chalk was not added. After transition to continuous fermentation conditions CaCO_3 was added in doses directly into fermentator.

Preparation of glucoamylase with the activity of 2000 units/g was added to the sterilized media in a ratio of 0.5 % towards amount of starch.

Repeated batch fermentations have been conducted in a 1 liter fermentator which was filled with 800 ml of media. Inoculate grown on the same medium and containing 10^9 cells of the producer per ml has been added to the fermentation media in a ratio of 5 % only before the first fermentation. After 48 hours of fermentation 80 % of culture broth was removed from the apparatus and substituted with the same amount of new sterile fermentation media containing the necessary amount of glucoamylase. Fermentations have been carried out at 40°C with occasional (every 6 hours) steering.

Feeding fermentation media for the continuous production of lactic acid have been prepared in the separate vessel, where glucoamylase preparation was also added.

Continuous fermentations were carried out at 40° and constant stirring, with the rotation speed of stirrer blades of 40 rotations per minute. Anaerobic conditions in the fermentator were maintained by supplying of carbon dioxide.

Concentration of the produced lactate was determined by enzymatic method [5]. The concentration of starch and digestible carbohydrates, as well as remaining sugars were determined by phenol — sulphuric acid method [2].

Results and discussion. Fermentations using different starch containing substrates, such as low- grade wheat flour, sorghum grains and potato tubers were carried out. For fermentation of starchy materials their sterilization was done by steeping them into a dilute sulfuric acid (0.05 N) for several hours at room temperature. It was found, that steeping of potato mashed tubers, milled sorghum grains and wheat flour into dilute sulfuric acid was effective not only for sterilization of the substrate, but also for causing an evolution of carbon dioxide upon addition of calcium carbonate. The amount of calcium carbonate was slightly more than the equivalent for neutralization of the added sulfuric acid and lactic acid produced.

When potato or its waste products were used for the fermentation, during the sterilization procedure mentioned they were also treated by acid phosphatase, because the phosphates combined with glucose residues of potato starch inhibit the activity of α -amylase of *S. bovis*.

The influence of temperatures, pH values, as well as concentrations of substrates and inoculum on the fermentation processes and on their kinetics were exam-

ined and their optimal values were estimated. The optimal temperature for cell growth was 37°, although the maximum rate of lactate production was obtained at 40°.

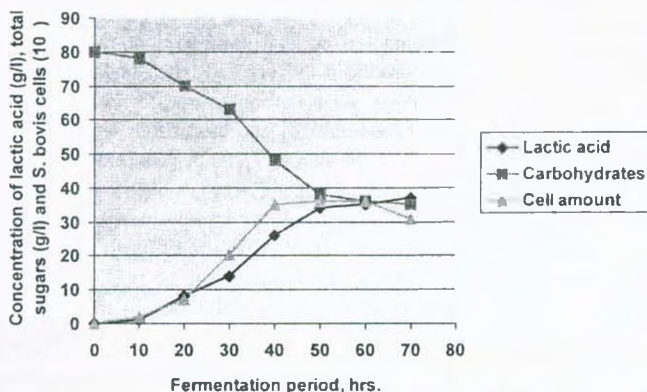


Fig. 1. Lactate fermentation time courses of starch containing media.

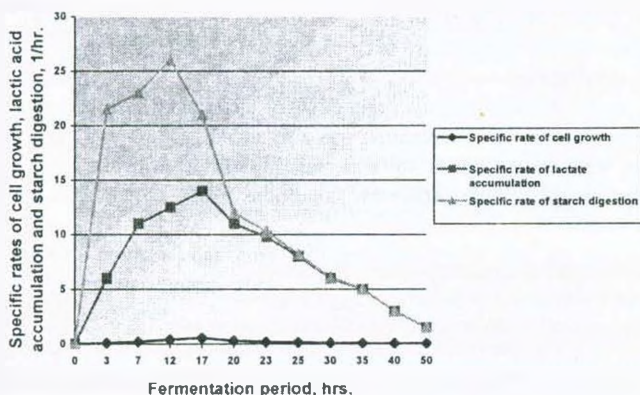


Fig. 2. Specific rates of cell growth, lactate accumulation and starch digestion.

The results presented in Fig.1 indicate, that lactic acid production began and proceeded in parallel with the cell growth. However, even after cell density began to decrease, the lactate formation was continued, but proceeds more slowly. Processes were characterized by relatively continuous lag-phase (about 10 hrs).

Maximums of specific starch (glucose) consumption rate, specific lactate production and cell growth rates were observed at the exponential phase (Fig. 2).

As the fermentation proceeded the specific lactic acid production rate approached the specific glucose consumption rate. This fact indicates that starch (glucose) conversion rate to lactic acid becomes theoretical as the fermentation proceeds to a certain stage.

Results obtained permit to make the conclusion, that investigated starchy material of fermentation media without addition of any other components provides with a complete source of carbon, nitrogen, organic and inorganic compounds for *S. bovis* cell growth and lactic acid production.

The data obtained revealed that only 60-65% of starch was consumed during the fermentation. It was caused due to the specificity of amylolytic activity of *S. bovis* what belongs to the type of sacharogenic α -amylases. This type of amylases provides a higher reducing ability, than the so-called liquefying or dextrinizing amylases. By hydrolysis of α -1,4-glucoside bonds of starch, at first these amylases produce as

an end product from the reaction fermentable sugars glucose, maltose and maltotriose as well as various branched oligosaccharides. Secondly, this type of amylases attacks and hydrolyses maltotriose molecule into glucose and maltose. Thus it can be predicted, that remaining non-converted sugars are represented by branched oligosaccharides, which cannot be digested by the α -amylase of *S. bovis*.

To accelerate raw rice starch saccharification stage and to achieve its more complete conversion into lactate, a commercial preparation of glucoamylase - an enzyme capable to digest α -1,4 and α -1,6-glucoside bonds yielding glucose as the end product of hydrolysis, as an additional saccharification factor was used.

The addition of *Rhizopus* glucoamylase (up to 0.05% towards starch content) valuably decreases the fermentation period. However, the addition of more amounts of glucoamylase did not result in further acceleration of fermentation.

Promoting the increase of intensity of hydrolysis of the raw starch, glucoamylase jointly with the α -amylase of *S. bovis* actively provide a significant decrease of the period of lactic acid homofermentative production process (about 40%).

Addition of the glucoamylase caused the increase of the values of obtained maximums of specific starch (glucose) consumption rate, specific lactate production and cell growth rates observed at the exponential phase. To find the optimal quantity of inoculate of *S. bovis* for lactic acid fermentation, studies were carried out with various initial ratios of inoculum to the culture media. Glucoamylase preparation in a ratio of 0.05% towards starch content and calcium carbonate were added. Initial pH was 6.5 and temperature was kept at 40°. Initial concentration of starch in the fermentation media was 10%. The obtained results of analyses have shown, that the increase of the amount of inoculate is accompanied by the accelerations of the fermentation process and finally initiates its shortening. The maximal level of lactate production with the ratio of starch conversion 0.9 was achieved in all the experiments tested. The ratios of 10 % of inoculum are to be more economically preferable.

Special series of researches aimed to determine the optimal initial concentrations of starch for fermentation have been conducted. Obtained results have shown that 10-12 % of initial concentrations of starch are more preferable (Table 1).

Table 1. The influence of the concentration of raw rice starch on the lactic acid fermentation

Characteristics	Initial concentration of starch, g / l					
	60	80	100	120	140	160
Yield of lactate, g/l	54.5	72.3	89.9	112.1	121.7	160
Fermentation period, hrs.	31	41	60	81	88	106
Productivity, g/l	1.76	1.76	1.50	1.38	1.38	1.31
Coefficient of conversion, g/g	0.91	0.90	0.90	0.93	0.87	0.87.

Based on the obtained results a method for lactic acid production directly

from non-cooked starchy materials has been developed (Fig. 3).

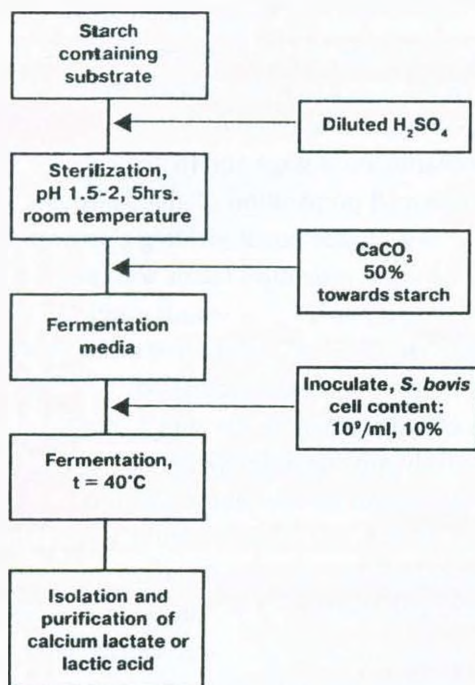


Fig. 3. The principal scheme of the lactate production from starchy substrates.

When lactic acid was produced by repeated batch fermentations, the increase of the amount of production cycles didn't lead to any significant changes in amyolytic activity and lactate producing abilities of the producer (Fig. 4). Total amount of lactic acid produced within five cycles (240 hours) from 320 g of starch (80 + 4 x 60) was about 277 g, while the amount of remained sugars was less than 28 g (around 8,5 %).

More complete fermentation of substrate was achieved due to the prolongation of the duration of the first and the last cycles respectively for 24 and 12 hours. Such a prolongation permits to increase the yield of lactic acid to 293 g, and to decrease the amount of remaining sugars to 11 g (around 3,5 %). The

only disadvantage of such approach was, that total productivity of the process also was decreased from 1,15 g/hour to 1,06 g/hour.

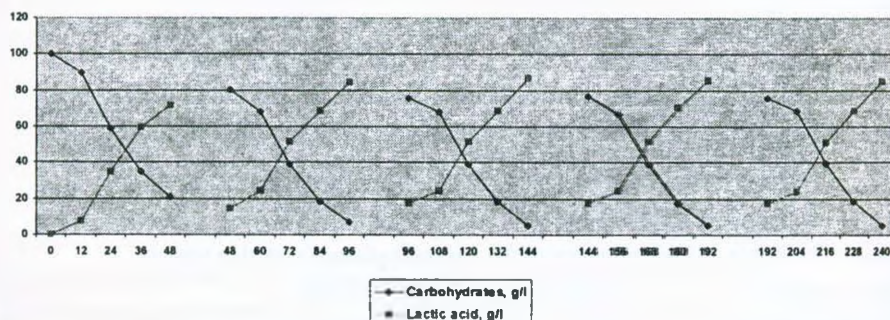


Fig. 4. Lactic acid production by repeated batch fermentations.

Studying the possibilities of continuous production of lactic acid using the cells of *S. bovis* it appears, that it is difficult to achieve steady state at the dilution rates lower than 0,1 h⁻¹. Figure 5 represents the results of continuous lactic acid fermentation at the dilution rate of 0,12 h⁻¹. At the early stage, which was passing as

a batch process, lactic acid was accumulated gradually. The concentration of lactic acid at the end of batch stage reaches to 61,5 g/l.

After the transition from batch to the continuous process, the concentration of lactic acid sharply decreases and reaches the minimum of 38 g/l at 45 – 46 hours of fermentation. Later its concentration begins to increase and was settled at a range of 45 – 50 g/l. On this level lactic acid concentration remains from 60-th to 144 hours of fermentation. On this steady state concentration

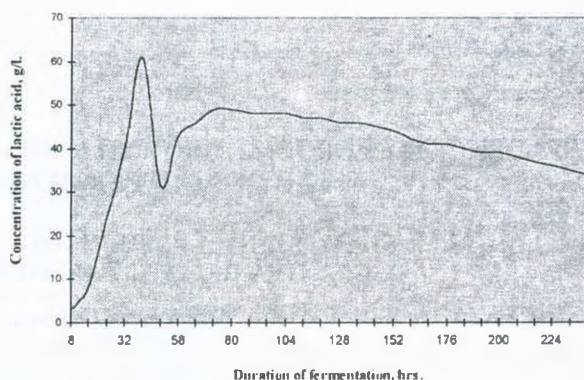


Fig. 5. Continuous production of lactic acid using *S. bovis* cells.

of lactic acid in limits of 45 – 50 g/l corresponds to the average productivity of about 5,4 – 6,0 g/l/h, what is significantly higher, than in the repeated batch process.

The results obtained evidently indicate on the principal possibility and expediency of the production of L(+) lactic acid by repeated batch and continuous methods, using as a producer a culture of *S. bovis*.

The work has been carried out by the financial support of the INTAS Project FOOD 00-876.

REFERENCES

1. Lipinsky E.C., Sinclair R.G. Chem. Tng. Progr., 82, 8, 26-32, 1986.
2. Methods of general bacteriology V.2. (ed. F. Gerhardt et al.) Moscow, Mir publishers, 472 p, 1984.
3. Shamtsyan M.M., Solodovnik K.A., Iakovlev V.I. Biotechnologiya. 4, 61-69. 2002
4. Shamtsyan M.M., Solodovnik K.A., Iakovlev V.I., Afrikian E.G. Biol. J. Armenia. 50, 3-4, 183 – 186, 1997.
5. UV - method for the determination of L-lactic acid in foodstuffs and other materials. Instructions for performance of assay. Cat. N 139084. Boehringer Mannheim GMBH, Biochemica, 3p, 1987.
6. Vick Roy T.B. Lactic acid. In Moo-young M. (ed) Comprehensive Biotechnology, V.3. Pergamon Press, 761-776.

Поступила 04.VIII.2003

Biolog. J. Armenia, 3 (55), 2003

УДК 579.663

INFLUENCE of MICROBIAL GROWTH REGULATOR HYDROPTERINE on LACTIC ACID FERMENTATION

M.M. SHAMTSYAN*, A.P. BOCHKOVA**, O. PANTYUK*,
G. ANTRANIKIAN***, E.G. AFRIKIAN****

*St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University), 198013, Russia
e-mail: shamtsyan@yahoo.com

**All-Russian State Institute of Food Aromas, Acidulates and Colors, Russia

***Technical University of Hamburg - Harburg, Germany

****State Microbial Depository Centre of NAS of Armenia, 378510, Abovian city, Armenia

The influence of a novel chemically synthesized growth regulator of microorganisms and plants - hydropterine on the processes of lactic acid fermentation by the cultures of *Lactobacillus delbrueckii* and *Streptococcus bovis* was studied.

Conducted investigations demonstrated high efficiency of mentioned regulator. Being applied in concentrations of 10^{-6} and 10^{-5} g/l of fermentation media hydropterine causes a significant stimulation of both biomass accumulation and lactate production processes. Addition of hydropterine decreases the fermentation period for 11-15% for *L. delbrueckii* and in limits of 18-20% for *S. bovis*.

Ուսումնասիրված է մանրէների և բույսերի նոր, քիմիական եղանակով սինթեզված կարգավորիչի հիդրոպտերինի ազդեցությունը *Lactobacillus delbrueckii* և *Streptococcus bovis* կուլտուրաների կաթնաթթվային խմորման վրա:

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տրվել այդ կարգավորիչի բարձր արդյունավետությունը: Հիդրոպտերինը ֆերմենտացիոն միջավայրում 10^{-6} և 10^{-5} գ/լ կոնցենտրացիաներով, զգալիորեն խթանում է արտադրիչների ինչպես բակտերիալ կենսազանգվածի կուտակման, այնպես էլ կաթնաթթվի արտադրության պրոցեսները: Հիդրոպտերինի ավելացումը կրճատում է խմորման պրոցեսի տևողությունը *L. delbrueckii*-ի համար 11-15%-ով, իսկ *S. bovis*-ի 18-20%-ով:

Изучено влияние нового химически синтезированного регулятора роста микроорганизмов и растений - гидроптерина на процессы молочнокислого брожения культур *Lactobacillus delbrueckii* и *Streptococcus bovis*.

Проведённые исследования показали высокую эффективность этого регулятора роста. В концентрациях 10^{-6} и 10^{-5} г/л ферментационной среды гидроптерин приводил к значительной стимуляции процессов как прироста биомассы обоих продуцентов, так и лактатобразования. При добавлении гидроптерина, продолжительность брожения сокращалась на 11-15% для *L. delbrueckii* и на 18-20% для *S. bovis*.

Key words: lactic acid - microbial growth regulator - lactobacteria - hydropterine

Problems related to lactic acid production initiate an increased interest due to the perspectives of its utilization not only as the product for food industry but also a source of novel bio- and photodegradable polymers [4]. The possibilities of use of new efficient lactic acid producers [2, 5], constructions of bioreactors and produc-

tion methods [1, 6, 7, 9], as well as various factors regulating the growth and lactate production of producers have been studied to optimize and intensify lactic acid fermentation processes.

We studied the possibility of stimulation of lactic acid fermentation processes of strains of *Streptococcus bovis* and *Lactobacillus delbrueckii* by a novel growth regulator of microorganisms - hydropterine, synthesized in St. Petersburg State Institute of Technology (Technical University). This substance is easily solved in water and not toxic for human and animals.

Materials and methods. Lactic acid was produced by butch fermentations using as producers the cultures of *S. bovis* or *L. delbrueckii*. For *S. bovis* cultivation corn starch, glucose and inuline were used as carbon sources, while for *L. delbrueckii* - granulated sugar. Yeast extract - 5 g/l, peptone - 5 g/l and CaCO_3 - 50% toward content of starch were added to the fermentation media. Nutritional media were sterilized at excess pressure of 0,5 atmosphere.

Inoculum was produced on the media of following composition (g/l): 20,0, yeast extract - 5,0, peptone - 5,0 and was used after a day of cultivation. Fermentations were carried out in 750 ml fermentation flasks.

Hydropterine was added to the fermentation medium just after inoculation of the bacterial culture.

Concentration of the produced lactate was determined by enzymatic method [8]. The concentration of starch and digestible carbohydrates, as well as remaining sugars was determined by phenol - sulphuric acid method [3].

Results and discussions. The influence of various concentrations of hydropterine on lactic acid production processes of *S. bovis* were studied to determine its optimal concentrations. During lactic acid fermentation on starchy substrates, high concentrations of hydropterine inhibited lactate production, while low concentrations didn't cause any significant unfavorable influence (Table 1). Because the limiting stage of this process is the stage of saccharification of raw cereal starch by α -amylase of the producer culture [3], the assumption was made of the results obtained, that hydropterine does not activate this stage. When the process was carried out on the media containing glucose instead of starch, a valuable stimulation of the process of lactic acid production was observed at the concentrations of hydropterine in 10^{-5} limits of 10^{-6} g/l (Table. 2).

Table 1. The influence of additions of hydropterine on the process of lactic acid fermentation of corn starch by *S. bovis* (starch concentration in the media - 10 %, the ratio of added inoculate to the volume of fermentation media - 10 %.)

Concentration of hydropterine, mg/l	Dynamics of accumulation of lactic acid (g/l). in hours		
	30	56	75
Control, without hydropterine	30	49	61
10^{-4}	24	38	51
10^{-5}	31	51	62
10^{-6}	29	50	60
10^{-7}	29	49	60
10^{-8}	30	50	61

Table 2. The influence of the additions of hydropterine on the lactic acid production process of glucose by *S. bovis* (concentration of glucose in the media - 10 %, ratio of the added inoculum towards (volume of the fermentation media - 10 %)

Concentration of hydropterine, mg/l	Dynamics of accumulation of lactic acid (g/l), in hours		
	28	53	73
Control, without hydropterine	39	55	71
10^{-4}	34	48	61
10^{-5}	54	73	91
10^{-6}	48	58	85
10^{-7}	41	55	74
10^{-8}	38	53	72

The ability of hidropterine in determined optimal concentrations to activate the lactic acid production process on inulin containing media has been also investigated, because the used producer possesses also inulinase activity. The influence of hydropterine was studied for the media with various concentrations of inulin as well as for different ratios of addition of inoculate. In the all cases addition of hydropterine was causing a significant intensification of the process of lactic acid production and decrease of the duration of fermentation (Table 3).

Table 3. The influence of the addition of hydropterine on the process of lactic acid fermentation of inulin by *S. bovis*

Concentration of inulin, g/l	Concentration of added inoculum, %	Concentration of hydropterine, mg/l	Dynamics of accumulation of lactic acid (g/l)		
			28hrs	53hrs	73hrs
75	10	-	43	58	65
		10^{-6}	54	71	71
		10^{-5}	59	71	71
100	10	-	43	57	71
		10^{-6}	53	69	87
		10^{-5}	57	71	93
	15	-	54	71	85
		10^{-6}	59	77	91
		10^{-5}	68	84	92
	20	-	75	89	
		10^{-5}	87	91	
	15	-	83	101	132
		10^{-5}	95	126	139
150	20	-	91	128	138
		10^{-5}	103	139	

The influence of hydropterine on lactic acid production by industrial producer strain of *L. delbrueckii* L-3 was also studied. Obtained results indicate, that

the addition of hydropterine in concentration of 10^{-2} g/l to the fermentation media result in intensification of the process for production of lactic acid (Fig. 1). When the influence of this substance on the activity of several key enzymes of *L. delbrueckii* was studied, it was revealed, that the addition of hydropterine to the media at the beginning of the fermentation was increasing the activities of invertase and phosphatase of the producer almost twice.

Fractional addition of

hydropterine during the all period

of fermentation appears to be more efficient compared with its only one time addition at the beginning of the process.

The results obtained are demonstrating the efficiency of utilization of hydropterine for intensification of the processes of lactic acid fermentation, while very low concentrations of its stimulating action are proving a prospects and expediency of its utilization.

The researches have been carried out by the partial financial support of INTAS Project FOOD 000-876.

REFERENCES

1. Andrews G.F., Fonta J.P. Appl. Biotechnol, 20/21, 375 - 390, 1989.
2. Bort J.P., de Mattos M.J.T., de Weijssel O.M. Appl. Microbiol. Biotechnol 34, 149-153, 1990.
3. Methods of general bacteriology V.2. (ed. F. Gerhardt et al.) Moscow, Mir publishers, 472 p, 1984.
4. Lipinsky E.C., Sinclair R.G. Chem. Eng. Progr. 82, 8, 26-32, 1986.
5. Shamsyan M.M., Solodovnik K.A., Lukovlev V.I., Afrikan E.G. Biol. J. Armenian 50, 3-4, 183-186, 1997.
6. Tanaka M., Shi Z., Shimizu K., Iijima S., Kobayashi T. Membrane, 14, 205-210, 1989.
7. Taniguchi M., Kotani N., Kobayashi T. J. Ferment. Technol. 65, 179-184, 1987.
8. UV - method for the determination of L-lactic acid in foodstuffs and other materials. Instructions for performance of assay. Cat. N 139084. Boehringer Mannheim GMBH, Biochemical (1987). - 3p.
9. Wang E., Hatanaka H., Iijima S., Takabayashi T., Shi Z., Shimizu K., Matsubara M., Kobayashi T. J. Chem. Eng. Japan 21, 36-40, 1988.

Received 04.VIII.2003

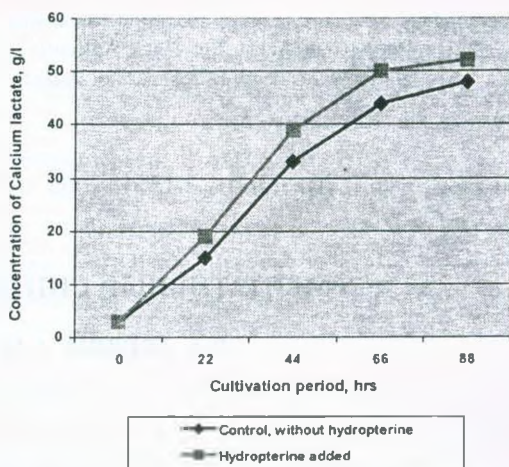


Fig. 1. The dynamics of accumulation of Calcium lactate at fermentation of granulated sugar by *Lactobacillus delbrueckii*.

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.222:577.152.32

ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ ЛАКТОСАХАРОЗЫ

В.А. АБЕЛЯН, А.М. БАЛАЯН

Институт микробиологии ИАН Армении, 378510, г.Абовян

Изучен процесс получения лактосахарозы (О-β-D-галактопиранозил-(1,4)-О-α-D-галактопиранозил-(1,2)-β-D-фруктофуранозид) из сахарозы и лактозы с помощью трансгликозилирования β-фруктофуранозидазой *Penicillium palitans* T1 и инвертазы *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884. Оптимальные pH и температура находились в пределах pH 5,5-6,0 и 50-55° соответственно. Оптимальное соотношение лактозы и сахарозы и концентрация общих сахаров для эффективного получения лактосахарозы были 1:1 и 30-40% соответственно. Выход конечного продукта составлял 71% от сахарозы.

Անունմասիովել է լակտոսախարոզի ստացման պրոցեսը (О-β-D-գալակտոպիրանոզիլ-(1,4)-О-α-D-գալակտոպիրանոզիլ-(1,2)-β-D-ֆրուկտոֆուրանոզիդ) սախարոզի և լակտոզի խառնուրդից *Penicillium palitans* T1-ի կողմից արտադրվող β-ֆրուկտոֆուրանոզիդազի և *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884-ի ինվերտազի օգնությամբ: Պրոցեսի լավագույն pH-ը և ջերմաստիճանը համապատասխանաբար գտնվում են pH 5,5-6,0 և 50-55°-ի սահմաններում: Լակտոսախարոզի արդյունավետ ստացման համար լակտոզի և սախարոզի օպտիմալ հարաբերակցությունը և ընդհանուր շաքարների խտությունը համապատասխանաբար կազմում են 1:1 և 30-40%: Վերջնանյութի ելքը կազմում է 71% հաշված սախարոզից:

The lactosucrose (O-β-D-galactopyranosyl-(1,4)-O-α-D-glucopyranosyl-(1,2)-β-D-fructofuranoside) synthesis from the mixture of sucrose and lactose by transfructosylation action of β-fructofuranosidase of *Penicillium palitans* T1 and invertase of *Kluyveromyces marxianus* IGC-3884 has been studied. The optimum pH and temperature were in the range of pH 5.5-6.0 and 50-55°, respectively. The optimum ratio of lactose to sucrose and total sugar concentration for lactosucrose synthesis were 1:1 and 30-40%, respectively. The yield of the final product was 71% from sucrose.

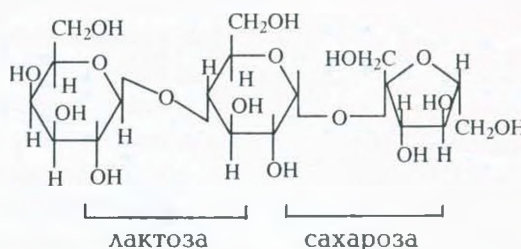
β-Фруктофуранозидаза — инвертаза — лактоза - сахароза - лактосахароза

Сахар является основным подслащивающим веществом, состоящим только из сахарозы. Однако чрезмерное потребление его приводит к возникновению различных заболеваний, а также к избыточной массе. Поэтому поиск новых, безвредных для человека сладких веществ, не являющихся источником энергии, является актуальной задачей.

В настоящее время наиболее широкое распространение получили такие синтетические заменители сахара, как сахарин, цикламат натрия, ацесульфам К и аспартам. Однако все они имеют побочные эффекты и небезопасны для организма человека при употреблении их в больших дозах. В этом отношении более перспективными являются подсластители природного происхождения — стевиозид, тауматин, глицирризин, глюкозо-фруктозный сироп и т.д.

Ранее нами сообщалось о получении сиропа фруктозо-концевых олигосахаридов из смеси крахмала и сахарозы с помощью циклодекстрин глюканотрансферазы [1], а также глюкозо-фруктозного сиропа с высоким содержанием фруктозы из инулинсодержащего сырья с применением свободной и иммобилизованной инулиназы [2].

С другой стороны, в качестве подсластителя особый интерес представляет лактозилфруктоза (О-β-D-галактопиранозил-(1,4)-О-α-D-галактопиранозил-(1,2)-β-D-фруктофуранозид, лактосахароза, ЛС), которая представляет собой трисахарид, состоящий из галактозы, глюкозы и фруктозы в эквимольных соотношениях:



Данный олигосахарид отличается отсутствием калорийности и кариогенности, не усваивается в верхнем желудочно-кишечном тракте, однако является фактором роста для бифидофлоры кишечника, улучшает уровень липидов, а также оказывает положительное влияние при запорах и гнойных процессах [6].

Настоящая работа посвящена изучению процесса получения ЛС с использованием трансферазной активности β-фруктофуранозидазы *Penicillium palitans* и инвертазы *Kluyveromyces marxianus*.

Материал и методика. Выращивание *P. palitans* шт. Т1 (ИНМИА 10745) из коллекции культур микроорганизмов Института микробиологии НАН Армении осуществляли в течение 7 сут при 30° на среде следующего состава (г/л): инулин -2,5; сахароза -2,5; NaNO₃ -2,0; KH₂PO₄ - 1,0; MgSO₄·7H₂O - 0,5; KCl - 0,5; FeSO₄ - 0,1 (pH 7,0). Культивирование *K. marxianus* шт. IGC-3884 (ИНМИА 10085) проводили согласно известной методике [2].

Биомассу отделяли фильтрованием или центрифугированием, а культуральную жидкость, содержащую β-фруктофуранозидазу, концентрировали в 10 раз на ультрафильтрационных мембранах типа AP-0.2 и диализовали против водопроводной воды в течение 24 ч.

β-Фруктофуранозидазную активность определяли по [4]. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для переноса 1 мкм фруктозы за 1 мин в условиях эксперимента.

Количество трансферных продуктов (А) определяли по формуле:

$$A\% = (\text{Glc-Fru})/\text{Glc} \times 100$$

где Glc – количество свободной глюкозы, а Fru – количество свободной фруктозы.

Количество синтезированной ЛС (В) оценивали по соотношению продукта к исходной сахарозе:

$$B\% = \text{ЛС/сахароза} \times 100$$

Количества глюкозы, фруктозы, сахарозы и лактозы определяли с помощью ферментных китов и инструкции "Boehringer Mannheim" (Германия).

Редуцирующие вещества идентифицировали методом Сомоджи-Нельсона [7], а общие сахара – по [5]. Определение типов связей в олигосахаридах проводили методом

метилирования и метанолиза [3].

Выделение и очистку ЛС осуществляли колоночной хроматографией на активированном угле, с последующей рехроматографией на Bio-Gel P-2 [6].

ТСХ проводили в системе растворителей н.бутанол-этанол-вода (4:3:3), БХ – н.бутанол-пиридин-вода (6:4:3), а ВЭЖХ – по ранее описанному методу [1].

В работе использовали глюкозу, фруктозу, сахарозу и лактозу производства "Sigma" (США) и реактивы марки х.ч. и осч.

Результаты и обсуждение. Влияние pH и температуры. Для выявления оптимальных значений pH и температуры процесса по 0,2г сахарозы и лактозы растворяли в 1мл буферного раствора с соответствующим pH, добавляли 0,3мл ферментного раствора (10ед/г сахарозы) и проводили наблюдения в течение 24 ч.

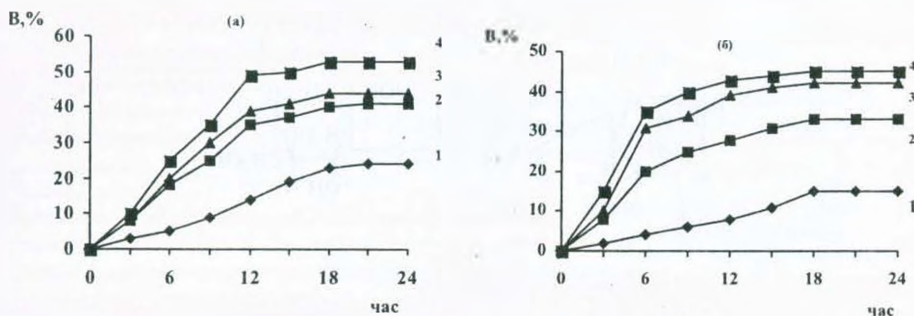


Рис. 1. Влияние pH на образование ЛС (B, %) β-фруктофуранозидазой *P. palitans* (а) и инвертазой *K. marxianus* (б). pH 4,0 и 5,0 – 20 мМ ацетатный буфер; pH 6,0 и 7,0 – 20мМ Na-фосфатный буфер. (1а,б), pH 4,0; (2а), pH 7,0; (3а, 2б), pH 5,0; (4а, 3б), pH 6,0; (4б), pH 5,5.

Образование ЛС β-фруктофуранозидазой *P. palitans* увеличивалось с повышением pH в рамках 4,0 – 5,5, несколько снижалось при pH 7,0 и достигало своего максимума при pH 6,0, что выше, чем для гидролитической активности и самотрансферазной реакции на сахарозе (pH5,0) (рис.1а). Аналогичная картина наблюдалась также для фермента, продуцируемого *K. marxianus*, который при гидролизе субстратов максимальную активность проявлял при pH 4,5 [2], в то время как наилучший синтез ЛС происходил при pH 5,5 (рис.1б). Следует отметить, что по продуктивности инвертаза *K. marxianus* несколько уступала грибному ферменту.

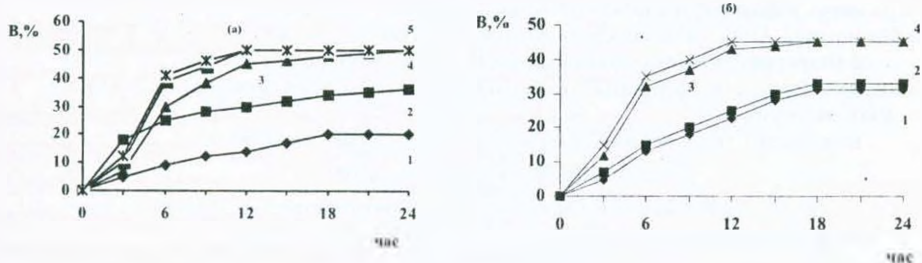


Рис. 2. Влияние температуры на образование ЛС (B, %) β-фруктофуранозидазой *P. palitans* (а) и инвертазой *K. marxianus* (б). (1а,б), 40°; (2а), 70°; (3а, б), 50°; (4а, б), 55°; (5а, 1б), 60°.

Синтез ЛС практически не зависел от изменения температуры в интервале 50-60° в случае β-фруктофуранозидазы *P. palitans*, однако

эффективность процесса резко снижалась при более высоких или низких ее значениях (рис.2а).

Инвертаза имела оптимум в пределах температуры 50-55° (рис.2б).

Влияние количества фермента. Для выявления количества вносимого фермента на трансферазную реакцию готовили 30%-ные растворы с содержанием сахарозы и лактозы в соотношении 1:1, добавляли различные количества ферментов и реакцию осуществляли в течение 10ч при 50° и pH 5,5.

В случае обоих ферментов с увеличением количества биокатализатора повышалась степень трансферазной реакции. Однако для эффективного проведения реакции, β -фруктофуранозидазу *P.palitans* целесообразно использовать в количестве 7,5 ед на 1г сахарозы, в то время как инвертазу необходимо добавлять в два раза большем количестве (рис.3).

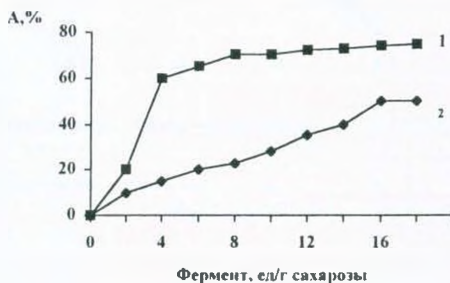


Рис.3. Степень трансгликозилирования (А, %) в зависимости от количества добавляемой β -фруктофуранозидазы *P.palitans* (1) и инвертазы *K.marxianus* (2).



Рис.4. Образование ЛС в зависимости от соотношения лактозы к сахарозе.
■ - β -фруктофуранозидаза; □ - инвертаза.

при 50° и оптимальных значениях pH в течение 10ч. Выявлено, что в данных условиях взаимопревращение достигает максимума при соотношении субстратов 1:1 в/в (рис.4).

Эффективность процесса практически не менялась при применении субстратов с общей концентрацией 30-40%, при которой реакция завершалась за 12-15ч. При этом синтез ЛС с участием β -фруктофуранозидазы *P.palitans* был менее зависим от изменения концентрации, чем при инвертазе *K.marxianus* (рис.5).

Очистка и идентификация продуктов. По 2г сахарозы и лактозы растворяли в 10мл 20 мМ Na-фосфатного буфера с pH 6,0 в случае β -фруктофуранозидазы и pH 5,5 (20мМ ацетатный буфер) для инвертазы и после добавления 7,5 ед β -фруктофуранозидазы или 15 ед инвертазы на 1 г сахарозы реакцию осуществляли в течение 15 ч при 55°. По истечении указанного

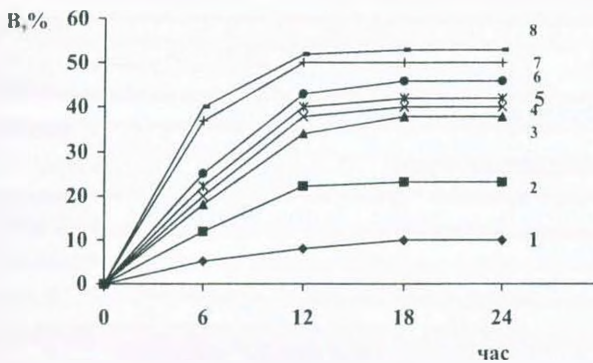


Рис. 5. Влияние концентрации общих сахаров на образование ЛС.
 (1, 2, 4, 5) - концентрация общих сахаров составляет 25, 50, 40 и 30% соответственно для инвертазы,
 (3, 6, 7, 8) - концентрация общих сахаров составляет 25, 50, 40 и 30% соответственно для β -фруктофуранозидазы.

времени реакцию оставляли выдерживанием реакционной смеси при 90° 30 мин и после фильтрации пропускали через колонку (1,0 x 30 см) с активированным углем. Колонку последовательно промывали дистиллированной водой (300 мл), а затем 10%-ным (610 мл), 15%-ным (850 мл) и 20%-ным этанолом (430 мл) со скоростью

100 мл/час.

Водная фракция содержала только глюкозу и фруктозу, 10%-ная этаноловая фракция — лактозу и сахарозу, 15%-ная — олигосахариды I и II, а 20%-ная — олигосахариды III и IV.

Дальнейшую очистку олигосахаридов проводили на колонке (1,5 x 100 см) с Bio-Gel P-2. Для этого 15%- и 20%-ную этаноловые фракции концентрировали до 2 мл и наносили на колонку. Элюцию осуществляли дистиллированной водой со скоростью 10 мл/ч. Очищенные таким образом олигосахариды были гомогенными по данным ТСХ, БХ и ВЭЖХ.

Полным кислотным гидролизом образцов установлено, что олигосахарид I состоит из глюкозы, галактозы и фруктозы в соотношении 1:1:1, а олигосахариды II, III и IV — из глюкозы и фруктозы в соотношении 1:2, 1:3 и 1:4 соответственно.

Изучение продуктов метанолиза полностью метилированных олигосахаридов показало наличие метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-галактозида, метил-2,3,4-три-О-метил-глюкозида и метил-1,3,4,6-тетра-О-метил-фруктозида в первом из них. Олигосахариды II, III и IV состояли из метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюкозида, метил-1,3,4,6-тетра-О-метил- и метил-3,4,6-три-О-метил-фруктозидов в соотношениях, приведенных в табл. I.

Полученные результаты однозначно показывают, что олигосахарид I представляет собой трисахарид, где галактозный остаток соединен с глюкозой посредством 1,4-связи, а фруктоза связана с глюкозой с помощью 1,2-связи, т.е. является лактосахарозой (О- β -D-галактопиранозил-(1,4)-О- α -D-галактопиранозил-(1,2)- β -D-фруктофуранозид). Олигосахариды II, III и IV идентифицированы как I^F (1- β -фруктофуранозилсахароза, I-кестоза), I^{II} (1- β -фруктофуранозил) сахароза, нистоза и фруктофуранозилнистоza соответственно.

В условиях пилотной установки после однократной очистки на колонке с активированным углем получена ЛС с выходом 71% от сахарозы. Конечный

сиропообразный продукт содержал около 0,5% глюкозы и фруктозы, 0,6% лактозы, 0,2% сахарозы, 0,5% 1-кестозы и 0,1% других олигосахаридов.

Таблица 1. Анализ продуктов трансгликозилирования из смеси сахарозы и лактозы под действием инвертазы и β -фруктофуранозидазы

Продукт	Редуцирующие вещества	Метил-гликозиды	Соотношение метил-гликозидов	Степень полимеризации
Олигосахарид I	Нет	2,3,4,6-Гал 1,3,4,6-Фру 2,3,6-Глю	1,1 0,9 1,0	3
Олигосахарид II	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,0 1,0 1,0	3
Олигосахарид III	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,0 1,1 2,2	4
Олигосахарид IV	Нет	2,3,4,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	1,1 0,9 3,1	5
2,3,4,6-Глю 2,3,4,6-Гал 2,3,6-Глю 1,3,4,6-Фру 3,4,6-Фру	- метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-глюкозид; - метил-2,3,4,6-тетра-О-метил-галактозид; - метил-2,3,6-три-О-метил-глюкозид; - метил-1,3,4,6-тетра-О-метил-фруктозид; - метил-3,4,6-три-О-метил-фруктозид.			

По своей продуктивности разработанный метод с применением фермента *P.palitans* практически не уступает, а в некоторых случаях превосходит известный процесс с использованием β -фруктофуранозида *Arthrobacter sp.* K-1, которая является производственным ферментом при промышленном производстве ЛС [6]. Характеристика конечного продукта соответствует качеству подсластителя LS-98 и с успехом может использоваться в качестве заменителя сахара.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абеян В.А., Балаян А.М., Авакян З.Г., Манукян Л.С., Узунян Л.В. Биохимия, 57, 3, 438-443, 1992.
2. Абеян В.А., Манукян Л.С. Прикл. биохим. и микробиол., 28, 3, 356-361, 1992.
3. Елинов Н.П., Абеян В.А., Кустова Н.В. Микология и фитопатология, 15, 5, 394-398, 1981.
4. Зинченко О.Н., Кривошеева О.В., Лобанок А.Г. Прикл. биохим. и микробиол., 31, 2, 186-189, 1995.
5. Dubois M., Gills R., Hamilton J.K. Anal. Chem. 28, 2, 350-354, 1959.
6. Fujita K., Osawa T., Mikuni K. Denpun Kagaku. 38, 1, 1-7, 1991.
7. Somogyi M.J. J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.

Поступила 26.VI.2002

Биол. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.846

**ՄԵՏԱՂՆԵՐԻ ԿԵՆՍԱՏԵՆՈԼՈԳԻԱՅԻ ՀԱՄԱՐ ԿԱՐԵՎՈՐ ԲԵՍՈՒԼԹՈՏՐՈՖ
ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ ՏԱՐԱԾՎԱԾՈՒԹՅՈՒՆԸ ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՍՈՒԼՖԻԴԱՅԻՆ
ՀԱՆՔԱՎԱՅՐԵՐՈՒՄ**

Լ.Ս. ԿԱՐԴԱՆՅԱՆ, Վ.Պ. ՀԱՎՈՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք. Արմավան

Ուսումնասիրվել է մետաղների բիոտեխնոլոգիայի համար կարևոր բենոլիթոտրոֆ բակտերիաների տարածվածությունը Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերում: Հաստատվել է, որ այդ հանքավայրերը բնորոշվում են բենոլիթոտրոֆ բակտերիաների մեծ բազմազանությամբ, որն ընդգրկում է երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների ողջ տեսականին: Բացահայտվել է արտաքին միջավայրի ֆիզիկաքիմիական գործոնների ազդեցությունը բենոլիթոտրոֆ բակտերիաների թվի և տեսակային կազմի վրա: Պարզվել է, որ պղնձա-կոլչեդանային հանքավայրերում երկաթ օքսիդացնող միկրոֆլորան ներկայացված է *Acidithiobacillus ferrooxidans*-ով և *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*-ով, պոլիմետաղական հանքավայրերում գերակշռում է *Leptospirillum ferrooxidans*-ը՝ շնորհիվ իր բարձր դիմացկունության մետաղների իոնների նկատմամբ: Դիտվել է համահարաբերակցություն ուսումնասիրված հանքավայրերի բնական և տեխնոգեն բիոտոպերում տարածված երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների քանակության և նրանցում ընթացող տարրավազման պրոցեսների ինտենսիվության միջև:

Изучено распространение хемолитотрофных бактерий, важных для биотехнологии металлов, в сульфидных месторождениях Армении. Установлено, что эти месторождения характеризуются большим разнообразием хемолитотрофных бактерий, включающих все виды железooksисляющих бактерий. Выявлено влияние физико-химических факторов внешней среды на численность и видовой состав изученных бактерий. Показано, что микрофлора медно-колчеданных месторождений представлена в основном *Acidithiobacillus ferrooxidans* и *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, тогда как в полиметаллических месторождениях преобладает *Leptospirillum ferrooxidans*, благодаря своей высокой устойчивости к ионам металлов. Установлена корреляция между распространением железooksисляющих бактерий и процессами выщелачивания, протекающими в природных и техногенных биотопах сульфидных месторождений.

Dissemination of chemolithotrophic bacteria important for biotechnology of metals in sulfide ore deposits of Armenia has been studied. It has been shown that these ore deposits are characterized by wide diversity of chemolithotrophic bacteria which includes all known strains of ferrous oxidizing bacteria. The influence of chemical and physical factors of surroundings on number and species composition of bacteria has been revealed. Microflora of copper containing ore deposits are represented by *Acidithiobacillus ferrooxidans* and *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, while *Leptospirillum ferrooxidans* predominates in polymetallic ore deposits because of its high resistance to toxic metals. Correlation between the quantities of ferrous oxidizing bacteria and the intensity of leaching process taking place in natural and technogenic biotopes of sulfide ore deposits has been detected.

Хемолитотрофные бактерии - биовыщелачивание - железooksисляющие бактерии

Սուլֆիդային հանքավայրերը բնութագրվում են յուրատեսակ միկրոֆլորայով, որում առանձնահատուկ տեղ են գրավում ացիդոֆիլ քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաները՝ որպես մետաղների բիոտեխնոլոգիայի համար կարևոր միկրոօրգանիզմներ: Ցածր ջերմաստիճան ունեցող թթվային ռեակցիայով բիոտոպերը հիմնականում զբաղեցված են մեգոֆիլ գրամ բացասական քեմոլիթոտրոֆներով, որոնց աճման օպտիմալ ջերմաստիճանը 20-40°-ն է, մինչդեռ չափավոր թերմոֆիլ պայմաններում (40-60°) միմյանց հետ գոյակցում են արխեոբակտերիաները և գրամ դրական բակտերիաները [10]: Ացիդոֆիլ մանրէների մի խումբը (*Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Sulfobacillus thermosulfidooxidans*, *Acidianus brierleyi*) ընդունակ է իրականացնելու սուլֆիդային միներալների ուղղակի օքսիդացումը: Մյուս խումբը ծծումբ կամ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաներն են (*Acidithiobacillus thiooxidans*, *Acidiphilum acidophilum*, *Acidithiobacillus caldus*, *Leptospirillum ferrooxidans* և այլն), որոնք իրականացնում են սուլֆիդային միներալների անուղղակի տարրալվացում իրենց կենսագործունեության արդյունքների H⁺-ի և Fe³⁺-ի միջոցով [4]: Մինչև վերջերս համարում էին, որ ացիդոֆիլ քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների մեծ մասը օբլիգատ աէրոբներ են: Ներկայումս գնալով ավելանում են ապացույցները այն մասին, որ դրանց գերակշիռ մասը ֆակուլտատիվ անաէրոբներ են՝ ընդունակ անօրգանական և օրգանական սուբստրատների օքսիդացումը զուգակցել Fe³⁺-ի վերականգնման հետ [15]: Այս հանգամանքը ավելի է ընդլայնում նրանց երկրաքիմիական գործունեության սահմանները: Ցույց է տրվել, որ նշված բիոտոպերի բնական բիոցենոզներում միկրոօրգանիզմների միջև գործում են բարդ փոխհարաբերություններ, այդ թվում, սիներգիզմ, մրցակցություն և այլն, և որ քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների համակեցությունները միմյանց հետ, ինչպես նաև ացիդոֆիլ հետերոտրոֆների հետ՝ հաճախ ավելի ուժեղ, կենսունակ և արդյունավետ են սուլֆիդային միներալների օքսիդացման համար, քան մաքուր կոլտուրաները [3]: Նկատի ունենալով ոչ կոնդիցիոն ապարների և թափոնների բակտերիալ մշակման՝ որպես մետաղների ստացման էժան և արդյունավետ մեթոդի հաղթարշավը, ինչպես նաև միջավայրի աղտոտման պրոբլեմը լքված հանքավայրերի բիոօքսիդացման տարածքներից (թթու հանքաջրերի գեներալիս), ացիդոֆիլ քեմոլիթոտրոֆների էկոլոգիայի ուսումնասիրությունը ձեռք է բերում կարևոր տեսական և պրակտիկ նշանակություն: Մի կողմից այն ենթադրում է նոր առավել ակտիվ բակտերիաների հայտնաբերում, մյուս կողմից քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների կենսաբանական առանձնահատկությունների համակողմանի իմացությունը՝ թույլ կտա կարգավորել հանքավայրերում ընթացող երկրաքիմիական պրոցեսները՝ ծանր մետաղներով շրջապատող միջավայրի աղտոտումը կանխելու նպատակով:

Ելուք և մեթոդ: Ուսումնասիրության համար օբյեկտ են հանդիսացել Հայաստանի տարբեր տարածաշրջանների սուլֆիդային հանքավայրերից հավաքված հանքաքարային թափոնների և հանքաջրերի նմուշները: Նմուշների pH-ը և Eh-ը, որոշվել են pH մետր-միլիվոլտմետր pH-121-ի միջոցով:

Նմուշներում երկաթ և/կամ ծծումբ օքսիդացնող քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաների հայտնաբերման համար օգտագործվել են հետևյալ սննդամիջավայրերը. Լետենի սննդամիջավայրը *A. ferrooxidans*-ի և *L. ferrooxidans*-ի, Վակսմանի սննդամիջավայրը *A. thiooxidans*-ի և Բրաբերլիի մոդիֆիկացված սննդամիջավայրը չափավոր թերմոֆիլ բակտերիաների համար [1]: *A. acidophilum*-ի համար Լետենի սննդամիջավայրին որպես էներգիայի աղբյուր երկվալենտ երկաթի փոխարեն ավելացվել է գլյուկոզ: Սննդամիջավայրերը վարակվել

են հանքաքարային թափոնների կամ հանքաջրերի նմուշներով և ինկուբացվել են 28-30°-ում մեզոֆիլ բակտերիաների և 40-50°-ում չափավոր թերմոֆիլ բակտերիաների մեկուսացման համար: Բակտերիաների աճը գնահատվել է ըստ նրանց կենսագործունեության արդյունքների Fe^{3+} -ի, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ -ի, SO_4^{2-} -ի: Կենսունակ բակտերիալ բջիջների քանակությունը հանքաջրերի և թափոնների նմուշներում որոշվել է սահմանային տասնապատիկ նոսրացումների մեթոդով, բջիջների առավել հավանական թիվը ըստ Մակ-Կրեդիի աղյուսակի [2]: Fe^{2+} և Fe^{3+} իոնները որոշվել են կոմպլեքսոմետրիկ [7], $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ -ը յոդոմետրիկ և SO_4^{2-} -ը սպեկտրոֆոտոմետրիկ մեթոդներով [9]:

Արդյունքներ և քննարկում: Աղյուսակում բերված են Հայաստանի տարբեր տարածաշրջանների սուլֆիդային հանքավայրերից վերցված նմուշների ֆիզիկաքիմիական և մանրէաբանական բնութագրերը: Ինչպես երևում է ներկայացված տվյալներից, քեմոլիթոտրոֆ բակտերիաները հանդիպում են pH-ի լայն միջակայքում 1,0-ից մինչև 8,0 և զբաղեցնում են գործնականորեն բոլոր էկոլոգիական նիշերը: Դրանց մեջ իրենց նշանակությամբ առանձնանում են ացիդոֆիլ թիոնային բակտերիաները, որոնք համաձայն վերջին դասակարգման միավորվել են *Acidithiobacillus* ցեղի մեջ [12]: Այս բակտերիաների կարևորությունը մետաղների կենսատեխնոլոգիայի համար պայմանավորված է նրանց սուլֆիդային միներալներ օքսիդացնելու, ինչպես նաև քիմիական օքսիդիչները ռեգեներացնելու ընդունակություններով:

Ացիդոֆիլ թիոնային բակտերիաներից առավել մեծ ուշադրության է արժանի *A. ferrooxidans*-ը: Այս մանրէն հանդիպում է պղնձա-կոլչեդանային, պոլիմետաղական, ծծմբա-կոլչեդանային, ոսկու և պղնձա-մոլիբդենային հանքավայրերում: *A. ferrooxidans*-ի աճման համար pH-ի օպտիմալ արժեքները համարվում են pH 1,7-2,4-ը: Մեր ուսումնասիրություններից պարզվել է, որ չնայած հանքի ջրերում և թափոններում այս մանրէները առավել մեծաքանակ են pH 2,0-4,0 արժեքների միջակայքում, նրանց որոշ քանակություններ հանդիպում են նաև ավելի բարձր pH-ի պայմաններում: Արդեն մեկ անգամ չէ, որ մեր կողմից նշվել է քիչ կամ չափավոր ացիդոֆիլ *A. ferrooxidans*-ի գոյությունը, սակայն նրա մեկուսացման և մաքրման փորձերը դեռևս չեն պսակվել հաջողությամբ: *A. ferrooxidans*-ի աճման օպտիմալ ջերմաստիճանը 28-30°-ն է, սակայն նրանց ոչ մեծ քանակություններ հայտնաբերվել են հորատանցքերից հոսող, ավելի ցածր ջերմաստիճաններով բնորոշվող հանքի ջրերում (2-4°): Նախկինում ենթադրվում էր, որ այս պայմաններում բակտերիաները չեն կարող աճել, հետևաբար և ցուցաբերել նկատելի երկրաքիմիական ակտիվություն: Սակայն վերջերս նկարագրվել են *A. ferrooxidans*-ի պսիխրոթուրանո և պսիխրոֆիլ ձևեր, որոնք ցուցաբերում են բարձր երկաթ օքսիդացնող ակտիվություն սուբօպտիմալ ջերմաստիճաններում [14]:

Բակտերիաների թիվը և նրանց ակտիվությունը սուլֆիդային հանքավայրերում պայմանավորված է ոչ միայն միջավայրի ջերմաստիճանով, այլև խոնավությամբ: Այսպես, չոր թափոնում *A. ferrooxidans*-ի քանակությունը 10^1 բջիջ/գ է, մինչդեռ նույն թափոնի վրա գոյացած ջրափոսում այդ թիվը հասնում է 10^3 բջիջ/մլ: Միաժամանակ հետազոտությունները ցույց են տվել, որ հանքի ջրերում *A. ferrooxidans*-ի քանակությունը կազմում է 10^2 - 10^4 բջիջ/մլ, խոնավ օքսիդացված թափոններում 10^3 - 10^5 բջիջ/մլ: Ենթադրվում է, որ թափոններում ֆիզիկաքիմիական պայմանները առավել նպաստավոր են մանրէների զարգացման և բազմացման համար: Հատկանշական է, որ *A. ferrooxidans*-ը

Աղյուսակ 1. Հայաստանի տարբեր տարածաշրջանների տուլֆիդային հանքավայրերի հանքաքարային թափոնների և հանքաջրերի նմուշների մանրէաբանական և ֆիզիկաքիմիական բնութագրերը

Նմուշի համարը	Նմուշը վերցնելու վայրը	pH	Eh, մվ	Fe, մգ/լ		Cu, մգ/լ	Բակտերիաների տիտղը, բջիջ/մգ (մլ)					
				Fe ³⁺	Fe ²⁺		<i>A.ferrooxi-</i> <i>dans</i>	<i>L.ferrooxi-</i> <i>dans</i>	<i>S.thermosul-</i> <i>fidooxidans</i>	<i>A.thio-</i> <i>oxidans</i>	<i>T.thiopa-</i> <i>rus</i>	<i>A.acidophi-</i> <i>lum</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	Կապան											
Կ-16	հանքի ջուր, 3-րդ հորատանցք, Կավատի ձոր	3,85	680	0	0	20	10 ⁴	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	0	10 ⁴
Կ-18	թափոն, 3-րդ հորատանցք, Կավատի ձոր	2,95	765	84	0	150	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁵	0	10 ⁵
Կ-21	չօքսիդացված թափոն, Բարաբաթունի ձոր	6,4	490	0	0	0	0	0	10	10 ²	10 ³	10 ⁵
Կ-22	օքսիդացած թափոն, Բարաբաթունի ձոր	2,75	720	1512	84	150	10 ³	10	10 ²	10 ³	0	10 ⁵
Կ-33	805 հորիզոն, հավաքող հորատանցք	3,05	740	280	0	250	10 ³	10-	10 ²	10	0	0
	Ախթալա											
Ախ-51	հանքաջուր, 3-րդ հորատանցք	7,4	-	196	0	0	0	0	0	10	10 ²	0
Ախ-52	թափոն, 3-րդ հորատանցք	3,1	-	0	0	0	0	10 ²	10 ²	0	0	0
Ախ-61	հանքի ջուր, հորատանցք-1964	2,55	-	952	28	100	10 ⁵	10 ²	10 ³	10 ²	0	10 ⁴
Ախ-62	հանքի ջուր, 2-րդ հորատանցք	5,75	-	հետքեր	0	2-3	10	10	0	0	0	10 ³
Ախ-63	ջրափոս թափոնի վրա, Եկեղեցու մոտ	3,1	-	28	0	35	10 ³	10	10	10 ⁵	0	10 ⁵

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Ախ-64	թափոն եկեղեցու մոտ	3,2	-	0	0	30	10	10 ³	10	0	0	10 ²
	Շամլուղ											
Շ-54'	թափոն	2,4	-	952	14	200	10 ²	10 ²	10 ²	10 ⁵	0	0
Շ-54''	թափոնի տակից հոսող ջուր	2,85	-	140	0	50	10	10	10	10 ⁴	0	10 ⁵
	Ալավերդի											
Ալ-70	թափոն, Մաղան	2,05	-	11452	364	280	10	0	10	0	0	0
Ալ-72	ջրափոս թափոնի վրա	2,3	-	4397	644	500	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵	0	10 ⁴
Ալ-74	թափոնին հարող գետի ջուր	7,65	-	84	0	0	10	0	10	10	0	10 ²
	Մեղրաձոր		-									
Մ-50	հանքի ջուր, հորատանցք N 50	6,9	-	28	0	0	10 ⁴	10	10	10	10 ²	0
Մ-48	հանքի ջուր, հորատանցք N 48	7,15	-	0	0	0	10 ³	10 ²	10	10 ²	10 ⁴	0
Մ-49	հանքի ջուր, նոր հորատանցք	4,0	-	56	0	0	10 ³	10	0	10 ²	10 ²	0
	Հանքավան		-									
3	հանքի ջուր	6,9	-	42	0	0	0	0	0	0	0	0
4	թափոն	6,4	-	14	0	0	10 ²	0	10 ²	10	0	0
	Ձախիձոր		-									
1	հանքի ջուր,	6,95	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	հանքի ջուր, հորատանցք	6,9	-	14	0	0	10	0	0	0	10 ²	0
	Կիրովական		-									
Էլ-4	հանքի ջուր, հավաքող հորատանցք	6,7	-	0	0	0	0	0	0	10 ²	10 ⁴	0
Էլ-5	հանքի ջուր, 1-ին հորատանցք	6,7	-	0	0	0	0	0	0	10 ³	10 ⁵	0

հանդիպում է ոչ միայն թափոնակույտի արտաքին շերտից, այլև նրա տարբեր խորություններից վերցրած նմուշներում, ուր ակնհայտորեն առկա է թթվածնի սահմանափակ քանակություն: Այս հանգամանքը հաստատում է այն փաստը, որ *A.ferrooxidans*-ը օբլիգատ աէրոբ չէ և կարող է աճել թթվածնի բացակայությամբ պայմաններում որպես էլեկտրոնների ակցեպտոր օգտագործելով Fe^{3+} -ը:

A.thiooxidans-ը նույնպես լայնորեն տարածված է սուլֆիդային հանքավայրերում: *A.thiooxidans*-ի համար հիմնական էներգետիկ սուբստրատ է հանդիսանում էլեմենտային ծծումբը, որը օքսիդացվում է մինչև H_2SO_4 : Մոնոկուլտուրայի ձևով *A.thiooxidans*-ը ընդունակ չէ օքսիդացնելու սուլֆիդներ: Սակայն բնական բիոցենոզներում այն կարող է մասնակցել սուլֆիդային միներալների տարրավազմանը՝ իրականացնելով երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների կողմից վերջիններիս բյուրեղավանդակի քայքայման հետևանքով ազատված սուլֆիդային ծծմբի օքսիդացումը: *A.thiooxidans*-ը հանդիսանում է *A.ferrooxidans*-ի մշտական ուղեկիցը և թույլ օքսիդացված բիոտոպերում իր քանակությամբ գրեթե չի զիջում *A.ferrooxidans*-ին: Միաժամանակ այն հանդիպում է նաև նոր բացված հորատանցքերից դուրս եկող հոսքաջրերում և չօքսիդացված թափոններում, որտեղ pH-ի արժեքները հասնում են pH 6,7-7,4 (Կիրովական): Այս պայմաններում *A.thiooxidans*-ը տարածված է միկրոզոնաներով, որտեղ իր գործունեությամբ նախադրյալներ է ստեղծում ացիդոֆիլ երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների զարգացման համար:

Ուսումնասիրված սուլֆիդային հանքավայրերում հանդիպող մյուս բիոնային բակտերիան *Thiobacillus thioparus*-ն է, որի զարգացման օպտիմալ pH-ը 4,5-6,0-ն է, սակայն մանրէն հանդիպում է մինչև pH 8,0-9,0-ի պայմաններում: *T.thioparus*-ն օքսիդացնում է էլեմենտային ծծումբ, ծծմբի վերականգնված միացություններ, ինչպես նաև որոշ միներալներ՝ գալենիտ (PbS) և բիսմուտին (Bi_2S_3): Առավելապես հանդիպում է չօքսիդացված թափոններում, որտեղ միջավայրի ռեակցիան չեզոք է կամ թույլ հիմնային և հանդիսանալով որպես ծծմբական թթվի առաջնային արտադրիչ՝ օպտիմալ պայմաններ է ստեղծում օբլիգատ ացիդոֆիլ բակտերիաների զարգացման համար:

Հատուկ հետաքրքրություն են ներկայացնում սուլֆիդային հանքավայրերում հանդիպող ացիդոֆիլ երկաթ օքսիդացնող լեպտոսպիրիլները [5]: Համարում են, որ *L.ferrooxidans*-ը ընդունակ է իրականացնելու նաև երկաթ պարունակող միներալների՝ պիրիտի և խալկոպիրիտի օքսիդացումը [8, 13]: Ենթադրվում է, որ *L.ferrooxidans*-ի կողմից սուլֆիդային միներալների օքսիդացումը կատարվում է անուղղակի մեխանիզմով: Այսինքն, *L.ferrooxidans*-ի ներկայությամբ պիրիտի և խալկոպիրիտի տարրավազման ինտենսիվացումը պայմանավորված է նրա կողմից Fe^{3+} -ի ռեգեներացիայով, որը հանդիսանում է սուլֆիդային միներալների ուժեղ օքսիդիչ: Պետք է նշել, որ ադյունակում ներկայացված տվյալներում *L.ferrooxidans*-ի քանակությունը զիջում է նրա իրական քանակությանը հանքի ջրերում և թափոններում: Բանն այն է, որ բջիջների մի մասը նրանց քանակության որոշման կիրառվող մեթոդի պայմաններում կորցնում են իրենց մտրակները, հետևաբար և կենսունակությունը: Արդյունքում բակտերիաների տիտրը 1-2 աստիճանով ցածր է ստացվում իրական թվից:

Գրականության մեջ որպես *A. acidophilum*-ի (*T.organoparus*) տարածման վայր նշվում է պղնձա-կոլչեդանային հանքավայրը: Սակայն մեր կողմից

կատարված հետազոտությունները հաստատեցին, որ *A. acidophilum*-ը զբաղեցնում է պոլիմետաղական, պղնձա-մոլիբդենային, ոսկու և ծծմբ-կոլչեդանային հանքավայրերի գրեթե բոլոր էկոլոգիական նիշերը և հանդիպում է միջավայրի pH-ի 2,5-6,8 միջակայքում: Այս բակտերիան կարող է զարգանալ ավտոտրոֆ օքսիդացնելով էլեմենտային ծծումբ, ինչպես նաև հետերոտրոֆ շաքարների, որոշ ամինաթթուների և օրգանական թթուների աղերի վրա: Սուլֆիդային հանքավայրերի բնական բիոցենոզներում *A. acidophilum*-ի գոյությունը վկայում է նրանցում ընթացող երկրաքիմիական պրոցեսներում ունեցած որոշակի դերի մասին: Հայտնի է, որ *A. acidophilum*-ի օգտագործումը *L. ferrooxidans*-ի հետ համակեցության ձևով թույլ է տալիս օքսիդացնել խալկոպիրիտը, կուտակելով միջավայրում մեծ քանակությամբ Fe^{3+} և պղնձի իոններ [6]:

Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերում հանդիպող մյուս միկրոօրգանիզմը դա չափավոր թերմոֆիլ *S. thermosulfidooxidans*-ն է: Ինչպես մյուս մանրէների դեպքում, սուլֆոբացիլների առավել մեծ քանակություններ են առկա թափոնների նմուշներում: Ցածր ջերմաստիճանով և չեզոքին մոտ pH-ի արժեքներով բնորոշվող հանքաջրերում սուլֆոբացիլները սակավաթիվ են և չեն կարող ցուցաբերել նկատելի երկրաքիմիական ակտիվություն: Այդ պատճառով ենթադրվում է, որ սուլֆոբացիլների առկայությունը նշված նմուշներում ավելի շուտ կապված է թափոնների օքսիդացման գոտիներից ջրի հետ նրանց դուրս բերման հետ:

Այսպիսով, Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերը բնորոշվում են քենոլիթոտրոֆ բակտերիաների մեծ բազմազանությամբ: Ընդ որում, ներկայացված է երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների ողջ տեսականին: Հատկանշական է, որ պղնձա-կոլչեդանային հանքավայրերում երկաթ օքսիդացնող միկրոֆլորան ներկայացված է հիմնականում *A. ferrooxidans*-ով և *S. thermosulfidooxidans*-ով, մինչդեռ պոլիմետաղական հանքավայրերում գերակշռում է *L. ferrooxidans*-ը: Այս հանգամանքը կարելի է բացատրել վերջիններիս բարձր դիմացկունությամբ մետաղների իոնների նկատմամբ (Ni, Zn, Co), որոնք տարրավազվում և դուրս են գալիս համապատասխան սուլֆիդային միներալների օքսիդացման ընթացքում: Սիաժամանակ դիտվել է համահարաբերակցություն սուլֆիդային հանքավայրերի բնական և տեխնոգեն բիոտոպերում տարածված երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների քանակության և նրանցում ընթացող տարրավազման պրոցեսների ինտենսիվության միջև, ինչը վկայում է նրանց կարևոր դերի մասին մետաղների տարրավազման պրոցեսում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Биотехнология металлов. Практическое руководство (ред. Г. И. Каравайко, Дж. Росси, А. Агате, С. Грудев, З.А. Авакян). Центр Международных проектов ГКНТ, М., 375с., 1989.
2. Большой практикум по микробиологии (под ред. Г.Л. Селибера), М., "Высшая школа", 49с., 1962.
3. Головачева Р.С. Успехи микробиологии, 19, 166-202, 1984.
4. Каравайко Г.И., Кузнецов С.И., Голомзик А.И. Роль микроорганизмов в выщелачивании металлов из руд, М., "Наука", 1970.

5. Маркосян Г.Е. Биолог. журн. Армении, 25, 2, 26-29, 1972.
6. Маркосян Г.Е. В сб.: "Экология и геохимическая деятельность микроорганизмов", 1976.
7. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., 1970.
8. Battaglia F., Morin D., Garcia J.L., Oliver P. Antonie van Lewenhooк, 66, 295-302, 1996.
9. Dodgson R.S. Biochem. J., 78, 312-319, 1961.
10. Johnson D.B. FEMS Microbiol. Ecology, 27, 307-317, 1998.
11. Harrison A.P., Norris P.R. FEMS Microbiol. Lett. 30, 99-102, 1985.
12. Kelly D.P., Wood A.P. Int. J. System. Evol. Microbiol., 50, 511-516, 2000.
13. Norris P.R. Recent Progress in Biohydrometallurgy, Eds. Rossi G., Torma A.E. - Cagliari, Italy, 83-96, 1983.
14. Ohonen L., Tuovinen O.H. Appl. Environ. Microbiology, 55, 2, 312-316, 1989.
15. Sugio T., Hirose T., Zhen Y.L., Tano T. J. Bacteriol., 174, 4189-4192, 1992.

Ստացվել է 06.IX.02

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 577.155.3:577.1124

ИНАКТИВАЦИЯ АРГИНАЗЫ ИОДАЦЕТАТОМ

М.Л. ГЕВОРКЯН, М.А. ДАВТЯН

*Ереванский государственный университет, кафедра биохимии и лаборатория
сравнительной и эволюционной биохимии, 375049*

The investigation of chemical modification of cattle liver arginase in the presence low concentrations of iodoacetate shows, that the inactivation takes place at pH values lower than 8.6. Arginase is resistant to this reagent in alkaline region of pH. The inactivation-concentration plot at pH 7.6 is exponential. The received data leads to conclusion, that loss of arginase activity in the presence of iodoacetate is related probably with modification of functional group with pK_a 8.6, which involved in the active site of arginase or disposed near of it.

Аргиназа - химическая модификация - иодацетат

Химическая модификация ферментов специфическими реагентами помогает выявить роль различных функциональных групп в составе белковой молекулы, определить их участие в осуществлении каталитической реакции или формировании активного центра. С целью изучения важных для активности аминокислотных остатков в аргиназе наряду с другими реагентами мы использовали и иодацетат. Этот реагент, как известно, в малых концентрациях модифицирует свободные SH-группы в белках [6]. Согласно литературным [8], а также нашим данным [1, 4], свободные сульфгидрильные группы не участвуют в формировании активного центра аргиназы печени крупного рогатого скота. Однако в наших опытах в присутствии сравнительно низких концентраций иодацетата (6 мМ в пробе) при pH 7 наблюдалась инактивация фермента. Представляло интерес более подробное исследование взаимодействия иодацетата с аргиназой. В настоящей работе представлены результаты этих экспериментов.

Материал и методика. В работе использовали коммерческий препарат аргиназы печени крупного рогатого скота фирмы Reanal (Венгрия). Растворы белка в концентрации $2.3 \cdot 10^{-6}$ М на 0.05 М Трис-НСl буфере при значениях pH от 6 до 11 выдерживали при комнатной температуре (20°) в присутствии добавок иодацетата в течение 60 мин. Затем пробу разбавляли 0.05 М глициновым буфером (pH 9.5) в 5 раз и определяли аргиназную активность по методу Ратнер, как описано ранее [3]. Молекулярную массу аргиназы принимали равной 120 кДа.

В работе использовали препараты L-аргинина, глицина фирмы Reanal (Венгрия). Остальные реактивы с маркой ХЧ или ЧДА отечественного производства.

Результаты и обсуждение. Добавление иодацетата (6мМ в пробе) к раствору аргиназы при pH 7,6 приводит к снижению активности фермента. Основная реакция протекает вначале. В течение первых десяти минут инкубации активность снижается на 35-40%. Далее процесс замедляется и через 60 мин остаточная активность составляет 55% от исходной. В присутствии более высоких концентраций реагента (25 мМ в пробе и выше) при инкубации в тех же условиях в течение часа наблюдается полная инактивация фермента. На рис. 1 показана полулогарифмическая зависимость остаточной активности аргиназы от концентрации иодацетата. Экспоненциальный характер этой зависимости указывает на то, что инактивация протекает по реакции псевдопервого порядка, в ходе которой модифицируется один или несколько однотипных аминокислотных остатков аргиназы, находящихся, по-видимому, вблизи от активного центра.

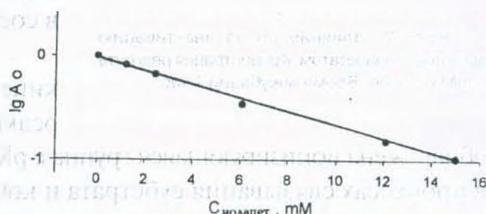


Рис. 1. Полулогарифмическая зависимость относительной активности аргиназы от концентрации иодацетата при pH 7,6. Время инкубации 1 час.

В присутствии высоких концентраций иодацетата, как известно, в белках, кроме сульфгидрильных групп, модификации подвергаются и другие аминокислотные остатки, в числе которых остатки гистидина, метионина, лизина и др. [6]. Аргиназа печени крупного рогатого скота, как уже отмечалось выше, не содержит существенных для активности сульфгидрильных групп. Модификация около 3,6 SH-групп на моль аргиназы с помощью парахлормеркурибензоата (ПХМБ) сопровождается снижением активности фермента всего на 5-7% [1]. Использование высоких концентраций ПХМБ снижает активность фермента на 80-90%. Однако и в этом случае реакция теряет специфичность, и, наряду с SH-группами, с реагентом взаимодействует целый ряд других аминокислотных остатков в белках [6]. N-этилмалеинимид не влияет на активность исследуемого нами фермента даже при использовании его в больших концентрациях [4]. Очевидно, инактивация аргиназы иодацетатом в данных условиях вызвана модификацией других чувствительных к реагенту функциональных групп.

Было изучено влияние изменения pH раствора на инактивацию аргиназы иодацетатом. При pH 6 и концентрации реагента 6 мМ в пробе в течение часа наблюдается почти полная потеря активности. С увеличением значений pH степень инактивации уменьшается, а при pH 8,6 и далее активность не снижается (рис.2). На кривой этой зависимости наблюдается перегиб. Таким образом, изменение величины pH раствора играет решающую роль во взаимодействии иодацетата с аргиназой в данных условиях. По-видимому, изменение ионизационного состояния белка в области активного центра влияет на реакционную способность взаимодействующих с реагентом функциональных групп - они становятся нечувствительными, либо просто недоступными для реагента. Можно предположить, что инактивация связана с модификацией функциональной группы с pK_a 8,6, которая находится в составе или вблизи

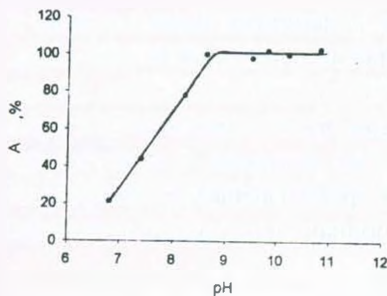


Рис. 2. Влияние pH на ингибирование аргиназы иодацетатом. Концентрация реагента 6 мМ в пробе. Время инкубации 1 час.

активного центра аргиназы. Учитывая, что в растворе иодацетат находится в виде аниона, который может притягиваться разными заряженными группами, замедляя или ускоряя реакцию [6], можно предположить, что в исследуемых процессах определенную роль играют ионы двухвалентного марганца, которые входят в состав активного центра аргиназы [7].

При исследовании зависимости кинетических параметров каталитической реакции аргиназы от pH [2] нами была

обнаружена ионизирующая группа с pK_a 8,6, которая, по-видимому, участвует в процессах связывания субстрата и конкурентных ингибиторов L-лизина и L-орнитина с ферментом. Совпадение значений pK_a этой группы со значением pH, полученным из зависимости ингибирования фермента иодацетатом от pH (рис.2), указывает на то, что в процессах взаимодействия этого реагента с аргиназой, по-видимому, принимает участие та же функциональная группа. Этой группой, возможно, является остаток гистидина.

Изучение модификации остатков гистидина аргиназы печени крупного рогатого скота, проведенное нами ранее [5], показало, что один или два остатка гистидина, модифицирующиеся с помощью диэтилпирокарбоната, находятся в активном центре фермента, либо вблизи него и легко доступны для растворителя. В ряде работ показано, что остатки гистидина могут участвовать в процессах связывания субстрата, а также являются лигандами ионов марганца в активном центре аргиназы печени крыс [7, 9]. Новые успехи в изучении структуры и механизма действия аргиназы позволят полнее объяснить явления и закономерности, наблюдаемые при взаимодействии различных реагентов с функциональными группами этого фермента.

ЛИТЕРАТУРА

1. Геворкян М.Л., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 32, 5, 435-441, 1979.
2. Геворкян М.Л., Давтян М.А., Григорян А.Г. Ученые записки ЕГУ, 2, 66-69, 1995.
3. Геворкян М.Л., Закарян А.Е., Давтян М.А. Биолог. журн. Армении, 27, 9, 44-49, 1974.
4. Геворкян М.Л., Чубарян С.В., Туманян Л.Р., Торчян Р.О. Биолог. журн. Армении, 39, 4, 314-319, 1986.
5. Давтян М.А., Геворкян М.Л. Биолог. журн. Армении, 33, 9, 941-947, 1980.
6. Торчинский Ю.М. Сера в белках, М., Наука, 1977.
7. Khangulov S.V., Sossong T.M. Jr, Ash D.E., Dismukes G.Ch. Biochemistry, 37, 8539-8550, 1988.
8. Muszynska G., Severina L.O., Lobireva L.W. Acta biochim. polon., 19, 2, 109-116, 1972.
9. Scolnick L.R., Kanyo Z.F., Cavalli R.Ch., Ash D.E., Christianson D.W. Biochemistry, 38, 34, 10558-10565, 1997.

Поступила 19.V.2003

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 502.656:556.5 (479.25)

КАЧЕСТВО ВОДЫ Р. РАЗДАН И ЕГО СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА

В.Г. ГРИГОРЯН

Институт гидроэкологии и ихтиологии НАН Армении, 375019, Ереван

On the basis of hydrochemical parameters in monitored points of Hrazdan river the quality of water and appropriate water consumption spheres are estimated. Nitrogen and phosphorus quantities entry to river Hrazdan from different sources have been calculated.

Мониторинг - качество воды - эвтрофикация вод

В современных условиях антропогенный фактор играет основную роль в процессах формирования качества поверхностных вод. Само понятие «качество» воды рассматривается с точки зрения ее пригодности для конкретного вида (отрасли) водопользования или водопотребления [3, 5].

Материал и методика. Исследования проводили в 2000-2002 гг., на 10 разрезах р. Раздан. В каждой пробе определяли более 20 гидрофизических и гидрохимических показателей. Использовали спектрофотометрический, объемный, ионометрический, весовой и другие методы.

Результаты и обсуждение. В условиях установившегося сильного антропогенного влияния водосборного бассейна на гидроэкосистему р. Раздан, бесспорно, возникает острая необходимость срочного решения задачи сочетания дальнейшего экономического развития в его бассейне с экологическими требованиями и, в частности, сохранения, защиты, улучшения и восстановления качества воды, а также рационального использования природных ресурсов р. Раздан и его притоков.

При планировании развития экономики на водосборном бассейне р. Раздан, особенно при отраслевом водопотреблении, необходимо учесть, что относительное значение различных источников, загрязняющих разданскую гидроэкосистему, выражается следующими величинами: для азота — от населения и промышленности 22%, от животноводства — 8%, от растениеводства — 62%. Для фосфора аналогичные величины соответственно составляют 22, 9 и 66%.

Необходимо пересмотреть принципы и способы эксплуатации природных ресурсов гидроэкосистемы р. Раздан с целью управления их качеством и количеством, а также уменьшения на них отрицательного воздействия народнохозяйственной деятельности.

На основании полученных гидрохимических данных нами было

определено качество воды р. Раздан [1, 2]. У истока реки по эколого-санитарной классификации качество поверхностных вод р. Раздан относится ко второму классу (чистые), что соответствует третьей категории (достаточно чистые). Воды реки Раздан от истока до Арзни пригодны для всех отраслей водопользования. Около санатория Арзни качество воды р. Раздан, как и у истока, соответствует второму классу (чистые) эколого-санитарной классификации.

Около с. Геганист, после очистного сооружении «Аэрация», происходит сильное загрязнение вод р. Раздан из-за недоочищенных сточных вод. Вследствие этого качество воды здесь ухудшается и соответствует четвертому классу (грязные).

Категория качества воды здесь соответствует шестой (грязные). Динамика качества воды на этом участке реки не имеет какой-либо сезонной закономерности. Отсутствие сезонной закономерности у с. Геганист подтверждает ранее [1] сделанный вывод о том, что на этом участке реки имеется хорошо выраженное и в течение года постоянно действующее антропогенное загрязнение. Воды р. Раздан у с. Геганист пригодны для карпового рыбного хозяйства и орошения.

Качество воды р. Раздан у с. Овташен улучшается и с четвертого (грязные) переходит к третьему классу (загрязненные) эколого-санитарной классификации качества воды. Это происходит за счет самоочищения разданских вод, так как на участке от с. Геганист до с. Овташен течение реки умеренное, в реке растет достаточное количество высших водных растений, дно илистое, а берега реки заболоченные, здесь обильно растут камыши. Категория качества воды улучшается и соответствует четвертой (слабозагрязненные) эколого-санитарной классификации качества поверхностных вод. Воды р. Раздан в пределах с. Овташен пригодны для карпового рыбного хозяйства и орошения.

Биогенные элементы и токсические вещества, поступающие в р. Раздан с поверхностными и подземными стоками с водосборного бассейна (хозяйственно-бытовые, промышленные, отходы сельскохозяйственные и животноводческих комплексов, и т.д.), вызывают изменение уровня и интенсивности продуцирования органического вещества, что приводит впоследствии к изменению структурно-функциональных характеристик водных экосистем и качества воды.

Ниже приводится количественный анализ антропогенного влияния водосборного бассейна р. Раздан на разданскую гидроэкосистему. По нашим расчетам (табл.), для водосбора бассейна р. Раздан величина выноса питательных веществ из различных источников выражается следующими величинами (% от суммарной величины соответствующего биогенного элемента): для азота - от населения и промышленности - 22; от животноводства - 8; от растениеводства - 62. Величины для фосфора составляют 22, 6 и 66 % соответственно. Среди отраслей народно-

хозяйственной деятельности, загрязняющих р. Раздан азотом и фосфором, первое место занимает растениеводство, второе — промышленность, коммунальное хозяйство, а также население, затем — животноводство (табл.).

Таблица. Обобщенные ежегодные величины, усредненные за 2000-2002 гг.
количества азота и фосфора

Источники загрязнения	Количество азота и фосфора, тонна/год			
	N	%	P	%
Население, коммун. хоз. и промышленность	768	22	15	22
Животноводство	284	8	4	6
Растениеводство	2145	62	44	66
Фоновое (исход.) колич.	257	8	4	6
Итого:	3454	100	67	100
Фактич. колич. (по данным исследования)	3670		74	
Неувязка	-216		-7	

На наш взгляд, вышеприведенный подход оценки степени загрязнения р. Раздан с успехом можно использовать для рек Армении и других горных рек в различных географических регионах, имеющих большое экономическое и ресурсное значение [3, 4, 6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Арутюнян С.А., Оганесян Р.О., Григорян В.Г. Экологический журнал Армении, научно-образовательный комплекс Татев, (1), 107-114, 2002.
2. Единые критерии качества вод. Совещание руководителей водохозяйственных органов стран — членов СЭВ. Издательский отдел управления делами Секретариата СЭВ. 69 с., 1982.
3. Оганесян Р. О. Озеро Севан вчера, сегодня... ; «Гитутюн» НАН РА, Ереван., 478 с., 1994.
4. Шилькром Г.С. В кн: Общая экология. Биоценология. Гидробиология., 2, 61-69, М., 1975.
5. Falkovskaya-Chernysheva L.N. In: Proc. Amsterdam Symp., Oct. 1977, JAHS-AJSH, Publ. 123, 358-364, 1977.
6. Vollenweider R.A. Report Organiz. Econom. Co-oper. and Devel., Paris, 1970.

Поступила 15.X.2003

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.64:631.46

ОБ ИСПОЛЬЗОВАНИИ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКОВ УГЛЕРОДА И АКТИВНОСТЬ АЗОТФИКСАЦИИ СООБЩЕСТВ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

В.Г.НИКОГОСЯН, И.Б.БАГДАСАРЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г.Абовян

Communities of nitrogen-fixing microorganisms (CNM) are characterized by stability, nitrogen fixation activity and competitiveness and are also effective for difficult of access carbon compounds displaying in spite of this high nitrogen fixation activity.

Азотфиксация - несимбиотические азотфиксаторы - целлюлоза - инулин

Известно, что свободноживущие азотфиксаторы, в том числе и азотобактер в качестве источника углерода, используют углеводы, спирты, органические кислоты, аминокислоты и углеводороды [1, 3, 4]. Однако такие источники углерода, как целлюлоза, инулин, масляная кислота и т.д., с трудом, или вовсе не усваиваются как многими микроорганизмами, так и несимбиотическими азотфиксаторами. Поскольку известно, что все важнейшие природные процессы осуществляются микробными сообществами сложного состава [2, 5, 7], нетрудно заключить, что труднодоступные соединения углерода при метаболизме некоторыми микроорганизмами могут превращаться в доступные соединения для других микроорганизмов. С этой точки зрения, следует особо отметить стимулирующее действие целлюлозоразлагающих, маслянокислых и других почвенных микроорганизмов на азотобактер [4, 9].

Исходя из приведенных предпосылок, интересно было исследовать использование различных источников углерода и активность азотфиксации выделенных нами сообществ азотфиксирующих микроорганизмов (САМ), отличающихся высокой азотфиксирующей активностью.

Настоящее сообщение посвящено изучению этого вопроса.

Материал и методика. Объектами исследования являлись САМ А42 и А65, выделенные из каштановых почв и ризоплана пшеницы (Арагацотн, 1989г.), а также А26, выделенные из бурых почв Араратской долины (Чарбах, 1991г.). Состав и активность азотфиксации исследованных азотобактерсодержащих САМ в течение длительного лабораторного хранения не изменились.

Исследования проводили на жидкой среде Виноградского следующего состава (г/л): K_2HPO_4 - 0,3, $MgSO_4$ - 0,3, $NaCl$ - 0,3, $MnSO_4$ - 0,005, $FeSO_4$ - 0,005, $(NH_4)_2 MoO_4$ - 0,05, $CaCO_3$ - 3,3, сахара - 10. Вместо сахара в качестве источника углерода использовали целлюлозу, лактозу и инулин.

Нитрогеназную активность определяли ацетиленовым методом [6].

Результаты и обсуждение. Исследования показали, что при использовании целлюлозы, инулина и лактозы активность азотфиксации у испытанных САМ больше, чем у азотобактера при раздельном культивировании. Это особенно хорошо проявляется у сообществ А26 и А65 при использовании целлюлозы и лактозы (табл. 1).

Таблица 1. Использование различных источников углерода и активность азотфиксации азотобактерсодержащих САМ

САМ, диазотрофы		Варианты	Нитрогеназная активность, н.моль C_2H_2		
			V день	XII день	XX день
А26	Сообщество	ВВ	0	0	0
		С	9000	>10000	>10000
		Ц	3200	4000	6000
		И	8000	>10000	>10000
		Л	3100	4500	8500
	<i>Azotobacter</i>	ВВ	10	25	25
		С	5500	9000	>10000
		Ц	0	0	0
		И	2700	3000	7000
		Л	1200	2700	3000
А65	Сообщество	ВВ	150	400	600
		С	7000	>10000	>10000
		Ц	4800	6300	7500
		И	3600	>10000	>10000
		Л	500	4000	>10000
	<i>Azotobacter</i>	ВВ	200	380	580
		С	3000	>10000	>10000
		Ц	250	2000	2400
		И	2500	6000	8000
		Л	150	1900	3000

Условные обозначения: ВВ-водопроводная вода, С-сахарозосодержащая жидкая среда Виноградского (контроль), Ц-целлюлозосодержащая среда, И-инулинсодержащая среда, Л-лактозосодержащая среда.

Приведенные данные свидетельствуют также о том, что нитрогеназная активность иногда замечается и в вариантах с водопроводной водой. Интересно отметить, что это явление замечается и при использовании дистиллированной воды. На наш взгляд, причиной этого может быть наличие слизи в посевном материале, которая, как известно, при углеродном голодании может быть использована азотобактером [8]. Не исключается также наличие следов углерода в посевном материале, частичный автолиз компонентов САМ при инкубации в неблагоприятной среде и т.д.

Учитывая то обстоятельство, что изученные САМ А26 и А65, кроме азотобактера, содержат также по пять сопутствующих бактерий, можно

заклучить, что указанные бактерии способны превратить испытанные источники углерода в более доступные соединения, которые, в свою очередь, могут благоприятствовать увеличению активности азотфиксации диазотрофов.

В дальнейшем было изучено САМ А42, которое имеет сложный состав. Результаты проведенных исследований показали, что отдельные диазотрофы в этом сообществе из родов *Azotobacter*, *Bacillus* и *Klebsiella* при развитии в различных углеродсодержащих средах фиксируют меньше азота, чем при совместном культивировании или в САМ вместе с сопутствующими бактериями диазотрофов (табл. 2). Отметим также, что это явление, которое напоминает синергетическое взаимоотношение микроорганизмов, нами обнаружено и у ряда САМ, выделенных из корневой зоны пшеницы и ячменя. Полученные данные свидетельствуют также о том, что из испытанных источников углерода штамм *Bacillus* использовал только инулин, а штамм *Klebsiella* ни один из них не усваивал.

Таблица 2. Использование различных источников углерода и активность азотфиксации САМ А42

САМ. диазотрофы	Варианты	Нитрогеназная активность, н.моль C_2H_4		
		V день	XII день	XX день
А42	ВВ	200	250	250
	С	>10000	>10000	>10000
	Ц	4900	7500	7500
	И	3300	4500	6500
	Л	100	800	1800
<i>Azotobacter</i>	ВВ	0	0	0
	С	4100	4300	7000
	Ц	800	900	1300
	И	1700	4000	4300
	Л	20	230	1400
<i>Klebsiella</i>	ВВ	0	0	0
	С	300	1000	1500
	Ц	0	0	0
	И	0	0	0
	Л	0	0	0
<i>Bacillus</i>	ВВ	0	0	0
	С	600	1100	2000
	Ц	0	0	0
	И	700	1400	1400
	Л	0	0	0
<i>Azotobacter</i> + <i>Klebsiella</i> + <i>Bacillus</i>	ВВ	900	1000	1200
	С	5000	800	>10000
	Ц	1200	2400	2700
	И	4000	8000	>10000
	Л	10	500	500

Примечание: Сообщество, кроме диазотрофов, содержало также три сопутствующие бактерии, у которых не обнаружена активность азотфиксации.

Учитывая сказанное, можно заключить, что САМ, которые характеризуются устойчивостью, активностью азотфиксации и конкурентоспособностью, эффективны также при усвоении труднодоступных углеродных соединений, проявляя при этом высокую активность азотфиксации. Эти САМ могут играть большую роль в естественных биоценозах в условиях наличия труднодоступных соединений углерода в среде.

ЛИТЕРАТУРА

1. Квасников Е.И., Ключникова Т.М., Нестеренко О.А., Писарчук Н.И. Докл. АН СССР, 208, 3, 714-726, 1973.
2. Кондраков Г.В., Верховцева Н.В., Кумбякин Д.А. Сб. тез. науч. конф. студ. аспирантов и мол. ученых. Ярославль, 1997. Ярославль, 133-135, 1997.
3. Мальцева Н.Н., Карпушин Н.А. Микробиология, 38, 6, 1012-1016, 1969.
4. Мишустин Е.Н., Шильникова В.К. Биологическая фиксация атмосферного азота. М., Наука, 1968.
5. Уморов М.М. Ассоциативная азотфиксация, М., Изд-во МГУ, 1986.
6. Hardy R.W., Holsten R.D., Jochson E.K., Burns R.C. Plant Physiol, 43, 1185-1207, 1968.
7. Kennedy Ann C., Cewin Virginia L. Soil Sci. 162, 9, 607-617, 1997.
8. Proctor M.N. Nature, 184, 4703, Suppl., 25, 1934-1935, 1959.
9. Remacle J. Ann. Inst. Pasteur. 111, 3, 149-154, 1966.

Поступила 28.III.2002

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.64.580.71

**ԴԻԱԶՈՏՐՈՖՆԵՐԻ ԱՉՈՏՖԻԶՍԱՑԻԱՅԻ ԽԹԱՆՈՒՄԸ ԱՉՈՏՖԻԶՈՂ
ՍԱՆԻՏԵՐԻ ՀԱՄԱԿԵՑՈՒԹՅՈՒՆՈՒՄ ԶԱՐԳԱՑՈՂ ԲԱԿՏԵՐԻԱՆԵՐԻ
ԿՈՂՄԻՑ**

Վ.Գ. ՆԻԿՈՂՈՍՅԱՆ, Ի.Բ. ԲԱՂՂԱՍԱՐՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Միկրոբիոլոգիայի ինստիտուտ, 378510, ք. Արմավյան

It was shown, that in the communities of nitrogen-fixing microbes occurs stimulation of nitrogen-fixation at the presence of some bacteria, accompanying diazotrophs.

Микробный симбиоз - диазотрофы - азотфиксация - азотобактер

Մեր նախորդ ուսումնասիրություններից պարզվել էր, որ բնության մեջ տարբեր տեսակների պատկանող դիազոտորոֆները համատեղ զարգանալով ավելի շատ N_2 են ֆիքսում, քան առանձին [1]: Հացազգիների արմատային զոնայից և տարբեր հողերից մեկուսացված 240 ազոտֆիքսող մանրէների համակեցությունների (ԱՄՀ) փորձարկումներից պարզվեց, որ 1-2 դիազոտորոֆ պարունակող համենատարբար պարզ կազմ ունեցող համակեցություններում ևս նկատվում է N_2 -ի ֆիքսման մեծ ակտիվություն, որը չի պահպանվում նրանց կոմպոնենտներն առանձին զարգանալիս: Նման ԱՄՀ-ներում դիազոտորոֆներին սովորաբար ուղեկցում են 2-9 տարբեր տեսակների պատկանող բակտերիաներ, որոնցից շատերը լաբորատոր պայմաններում բազմակի վերացանքներից հետո պահպանվել են տարիներ շարունակ:

Դեռ վաղ ժամանակներից հայտնի է, որ դիազոտորոֆների ազոտֆիքսացիան ավելի ինտենսիվ է ընթանում այլ բակտերիաների հետ համատեղ զարգանալիս, օրինակ *Azotobacter*-ը ցելյուլոզա քայքայող սպորավոր բակտերիաների հետ: Վերջինս, ինչպես պարզվել է հետազայում, նպաստում է նաև ազոտֆիքսող *Mycobacterium*-ի N_2 -ի ֆիքսման ակտիվության մեծացմանը [2]: *Mycobacterium*-ի ազոտֆիքսացիայի խթանմանը նպաստում են նաև նրան ուղեկցող բակտերիաները [3]: Կան տեղեկություններ, որ դիազոտորոֆների ազոտֆիքսացիան ինտենսիվ է ընթանում սնկերի և շաքարասնկերի հետ համատեղ զարգանալիս [7]: Վերջերս կատարված ուսումնասիրությունները հաստատում են նաև *Bradyrhizobium*-ի N_2 -ի ֆիքսացիայի խթանումը *Pseudomonas fluorescens*-ի հետ համատեղ զարգանալիս [8]:

Բերվածից ելնելով նպատակահարմար գտանք ուսումնասիրել Հայաստանում մշակվող հացազգիների արմատային զոնայից մեր կողմից մեկուսացված համենատարբար պարզ կազմ ունեցող *Azotobacter* պարունակող ԱՄՀ-ները, որին և նվիրված է սույն հաղորդումը:

Նյութ և մեթոդ: Ուսումնասիրությունների նյութ են հանդիսացել հարյուրավոր ԱՄՅ-ներից ընտրված *Azotobacter* պարունակող 15 համակեցությունները, որոնք աչքի են ընկել իրենց N_2 -ի ֆիքսման մեծ ակտիվությամբ ու կայունությամբ:

Փորձերի ընթացքում օգտագործվել են էշբիի և Վինոգրադսկու հեղուկ և ագարային սննդամիջավայրերը: Կուլտուրաների իդենտիֆիկացիան կատարվել է Բերգեի որոշիչներով [5, 9], իսկ ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը՝ ացետիլենային եղանակով, որի մանրամասն նկարագրությունը մեր կողմից ներկայացվել է նախկինում [4]: Ստացված տվյալների վիճակագրական մշակումը կատարվել է ըստ Պլիսինսկու [6]:

Արդյունքներ և քննարկում: *Azotobacter* պարունակող փորձարկված 15 ԱՄՅ-ների ուսումնասիրությունները ցույց տվեցին, որ համակեցության պայմաններում այդ դիազոտրոֆն ավելի շատ ազոտ է ֆիքսում, քան առանձին: Փորձարկված նման ԱՄՅ-ներից երեքի մաքուր և խառը կուլտուրաների ազոտֆիքսացիան ներկայացված է աղ. 1-ում:

Աղյուսակ 1. *Azotobacter* պարունակող ԱՄՅ-ների մաքուր և խառը կուլտուրաների ազոտֆիքսացիան ($M \pm n$)

ԱՄՅ-ներ	Փորձի տարբերակները	Կրկնություններ (n)	Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը, մգ/10 օրում
AcXII-I	Հ	5	$0,54 \pm 0,04$
	Ա	3	$0,43 \pm 0,00$
A26	Հ	8	$1,10 \pm 0,04$
	Ա	8	$0,53 \pm 0,07$
A65	Հ	6	$1,37 \pm 0,06$
	Ա	6	$0,51 \pm 0,05$

Ճանրություն: Հ – համակեցություն (խառը կուլտուրա), Ա – *Azotobacter* (մաքուր կուլտուրա):

Հաշվի առնելով այն հանգամանքը, որ A65 համակեցությունը *Azotobacter*-ի մաքուր կուլտուրայի համեմատ մոտ 2,5 անգամ ավելի շատ ազոտ է ֆիքսում, նպատակահարմար գտանք *Azotobacter*-ից և նրան ուղեկցող հինգ այլ բակտերիաներից կազմված այդ համակեցությունն ուսումնասիրել ավելի մանրամասն:

Ինչպես ցույց տվեցին փորձերը, A65 համակեցությունում *Azotobacter*-ին ուղեկցող բակտերիաներն առանձին N_2 չեն ֆիքսում (աղ. 2):

Չնայած դրան, Յ-2 և Յ-3 ուղեկցող բակտերիաներն առանձին դիազոտրոֆի հետ համատեղ զարգանալիս տարբեր չափերով նպաստում են ազոտֆիքսացիային, իսկ այդ երկուսի առկայության դեպքում մոտ երեք անգամ ավելանում է *Azotobacter*-ի ազոտի ֆիքսման ակտիվությունը: Ինչպես ցույց տվեցին փորձերը, N_2 -ի ֆիքսման ակտիվությանը չեն նպաստել M-1, M-2, M-3 ուղեկցողները, չնայած չի բացառվում նրանց մասնակցությունն ու որոշակի դերը ԱՄՅ-ն մետաբոլիզմի պրոցեսում:

Azotobacter-ի ֆիքսման խթանումը Յ-2 և Յ-3-ի կողմից մեր կողմից դիտվում է որպես մանրէների սիներգիստ փոխհարաբերության դրսևորում, որը ձևակերպվել է էվոլյուցիոն զարգացման ընթացքում, տարբեր բակտերիաների համատեղ կենսագործունեության պայմաններում:

Ուսումնասիրություններից պարզվեց, որ A65 ԱՄՅ-ում զարգացող Յ-2 և Յ-3 բակտերիաներն իրենց տաքսոնոմիական հատկանիշներով համապատասխանում են Բերգեի որոշիչներում նկարագրված *Flaviobacterium*

ցեղին, սակայն զգալիորեն տարբերվել են այնտեղ նկարագրված այդ ցեղի հայտնի տեսակներից: Ստորև բերված են նշված բակտերիաների հիմնական հատկանիշները:

Աղյուսակ 2. A65 ՍՄՀ մաքուր և խառը կուլտուրաների ազոտֆիքսացիան (n=3)

Տարբերակներ	Պենիցիլինի սրվակներում ֆիքսված ազոտը, մգ/10 օրում
A65 ՍՄՀ	1.48±0.06
A65 Az	0.54±0.07
Յ-2	0
Յ-3	0
M-1	0
M-2	0
M-3	0
A65 Az+Յ-2	0.78±0.04
A65 Az+Յ-3	1.51±0.01
A65 Az+Յ-2+Յ-3	1.60±0.08
A65 Az+M-1	0.62±0.07
A65 Az+M-2	0.63±0.05
A65 Az+M-3	0.67±0.11
A65 Az+M-1+M-2+M-3	0.56±0.04
A65 Az+Յ-2+Յ-3+M-1+M-2+M-3	1.33±0.06

Ծանոթություն: Յ - էշբիի վրա զարգացող բակտերիա, M - ՄՊԱ-ի վրա զարգացող բակտերիա, Az - ազոտորակտեր:

Flaviobacterium sp. Յ-2-ի բջիջներն անշարժ ծողեր են 0,8-2x0,4-0,5μ չափերով, առաջացնում է թույլ արտահայտված կապսուլա:

Գաղութները էշբիի սննդամիջավայրում 2,5-3,5մմ մեծության են, կլորավուն, քիչ ուռուցիկ, հարթ մակերեսով ու եզրերով, սպիտակավուն, փայլուն, առաջացնում են կավիճի տարալուծման զոնա: ՄՊԱ-ի վրա գաղութները մանր են, սպիտակավուն փայլուն: Աերոբ է, ժելատինը չի լուծում, թույլ պեպտոնացնում է կաթը, նիտրատները չի վերականգնում, օսլան չի հիդրոլիզում, օգտագործելով գլյուկոզան ու քսիլոզան առաջացնում է թթու, զարգանում է 3% NaCl-ի պայմաններում, առաջացնում է դիհիդրօքսիացետոն, ացետիլմեթիլկարբիմիլ չի առաջացնում, կազեինը չի տարալուծում, 45°-ի պայմաններում չի զարգանում, աճում է pH 5-ում, յուրացնում է ցիտրատը:

Flaviobacterium sp. Յ-3-ն իր հիմնական հատկանիշներով նմանվում է վերևում նկարագրված բակտերիային: Սակայն *Flaviobacterium* sp. Յ-3-ը կավիճը չի տարալուծում, կաթը փոփոխության չի ենթարկում, իսկ ՄՊԱ-ի վրա գաղութները կարմրավուն են:

Ամփոփելով կատարվածը, կարելի է եզրակացնել, որ Հայաստանում մշակվող հացազգիների արմատային զոնայի ՍՄՀ-ներում N₂ ֆիքսացիայի խթանում տեղի է ունենում ինչպես տարբեր դիագնոստիկների համատեղ զարգացման [1], այնպես էլ ազոտի ֆիքսման ունակությունից զուրկ, դիագնոստիկների ուղեկցող որոշ բակտերիաների առկայության պայմաններում:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. Նիկողոսյան Վ.Գ. Ոչ սիմբիոտիկ ազոտֆիքսատորների էկոլոգիան, կենսաբանական առանձնահատկությունները և նշանակությունը. Դոկտորական ատենախոսության սեղմագիր, Արույան, 1998.
2. Калининская Т.А. Микробиология, 36, 2, 345-349, 1967.
3. Львов Н.П., Любимов В.И. Изв. АН СССР, сер. биол. 2, 250-256, 1965.
4. Никогосян В.Г. Биолог. журн. Армении, 34, 3, 269-274, 1981.
5. Определитель бактерий Берджи, 1, 1997.
6. Плохинский Н.А. Математические методы в биологии, М., 1978.
7. Умаров М.М. Ассоциативная азотфиксация, М., 1986.
8. Шабает В.П., Смолин В.Ю., Ширшова Л.Т. Почвоведение, 8. 980-987, 1998.
9. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1, 1984.

Ստացվել է 17.IV.2000

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 579.846

ВЫЩЕЛАЧИВАНИЕ ПИРИТА СЕРО- И ЖЕЛЕЗООКИСЛЯЮЩИМИ БАКТЕРИЯМИ И ИХ АССОЦИАЦИЯМИ

Н.С. ВАРДАНЯН

Институт микробиологии НАН Армении, 378510, г. Абовян

Association of moderate thermophilic sulfobacilli with other sulfur and iron oxidizing chemolithoautotrophic bacteria allows significantly to increase pyrite oxidation without addition of organic compounds.

Сульфобациллы - ассоциация хемолитотрофных бактерий - биовыщелачивание пирита

Умеренно термофильные серо- и железоокисляющие бактерии способны активно расти и окислять сульфидные минералы только в миксотрофных условиях в присутствии органических источников углерода [6]. Исследования последних лет показали, что применение их ассоциаций с другими хемолитотрофными бактериями позволяет вести процесс окисления сульфидных минералов в автотрофных условиях со значительной интенсификацией [5, 7].

Целью данной работы являлось изучение активности серо- или железоокисляющих бактерий и их ассоциаций с умеренно термофильными бактериями в окислении пирита.

Материал и методика. Объектом исследования служили выделенные нами ранее шт. 86 умеренно термофильных серо- и железоокисляющих бактерий [2], шт. 5 термотолерантной сероокисляющей бактерии [3] и шт. 64 *Leptospirillum*-подобных бактерий [4].

Бактерии выращивали на среде Браерли [1]. В качестве источника энергии использовали Fe^{2+} в количестве 2 г/л (в виде $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) или элементную серу (S^0) в зависимости от штамма.

Бактериальному выщелачиванию подвергали пирит из Ахталского месторождения, крупностью измельчения 70-100 мкм.

Навески измельченных минералов помещали в 250 мл колбы, смачивали дистиллированной водой и стерилизовали при 0,5 атм в течение 30 мин. Затем колбы заполняли 50 мл вышеуказанной среды без железа и вносили суспензию клеток.

Для выщелачивания пирита использовали отмытые клетки трехдневной культуры шт. 86 и 7-суточную культуру шт. 5. Культуры бактерий шт. 86 и шт. 5 выращивали на среде, содержащей, соответственно, Fe^{2+} или S^0 в качестве источников энергии. В логарифмической фазе роста биомассу отделяли центрифугированием при 6000g в течение 10 мин. Затем биомассу ресуспендировали в той же среде и вносили в колбы. Штамм 64 добавляли к среде в количестве 1 мл культуральной жидкости.

Выщелачивание осуществляли в периодическом режиме культивирования на качалке (180 об/мин) при 37°. Об интенсивности окисления пирита судили по количеству перешедших в среду ионов железа. Ионы Fe^{2+} и Fe^{3+} определяли комплексонометрически с трилоном Б [1], количество меди и общего железа - на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS 1N, биомассу - по количеству белка методом Лоури [1].

Результаты и обсуждение. На рис.1 представлена динамика окисления FeS_2 штаммами умеренно термофильных и термотолерантных серо- и/или железоокисляющих бактерий. Как видно из рисунка, за 17 дней культивирования шт.5 выщелочено 1,8 г/л железа. При миксотрофном росте шт.86 количество выщелоченного общего железа составляло 3,3 г/л. В автотрофных условиях в среду выделялось лишь 2,7 г/л Fe.

Однако при совместном культивировании шт. 86 со шт.5 в автотрофных условиях количество выщелоченного железа увеличивалось до 3,5 г/л. То есть в присутствии шт.5 интенсивность выщелачивания Fe шт.86 в автотрофных условиях достигается таковой, наблюдаемой при его миксотрофном росте (рис.1).

Как показывают данные табл. 1, выщелачивание пирита шт.64 протекало в 2,3 раза интенсивнее, чем при росте шт.86 в миксотрофных условиях. Совместное культивирование шт.86 со шт.64 *Leptospirillum*- подобных бактерий в автотрофных условиях приводило к увеличению выноса железа при окислении пирита примерно в 3,1 раза по сравнению с миксотрофно растущей культурой шт.86. При этом железо, перешедшее в среду, было представлено исключительно в виде трехвалентного, что обуславливает высокий окислительный потенциал среды.

Таблица 1. Выщелачивание пирита умеренно термофильными и термотолерантными серо- и железоокисляющими бактериями и их ассоциациями (время выщелачивания 17 дней)

Штаммы бактерий	Выщелочено, г/л		pH	Белок, мг/мл
	Fe^{3+}	Fe^{2+}		
шт. 5	0,304	1,540	1,3	0,015
шт. 64	8,120	0,756	1,25	0,07
шт. 86	1,484	1,232	1,38	0,02
шт. 86*	2,492	0,840	1,33	0,025
шт. 86 + шт. 5	2,716	0,850	1,3	0,03
шт. 86 + шт. 64	11,360	0,084	1,12	0,076

Примечание: * - рост в миксотрофных условиях.

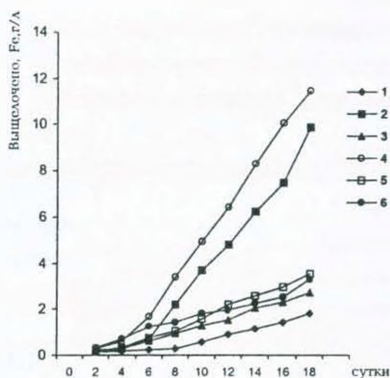


Рис. 1. Выщелачивание пирита хемилитотрофными серо- и железоокисляющими бактериями и их ассоциациями: 1-шт.5; 2- шт.64; 3- шт.86; 4- шт.86+шт.64; 5- шт.86+шт.5; 6- шт.86* - рост в миксотрофных условиях

Следует отметить, что количество выщелоченного железа при окислении пирита изученными бактериями коррелирует с приростом биомассы, а также снижением pH среды (образованием серной кислоты) (табл.1).

Таким образом, при совместном культивировании шт.86 со шт.5 в автотрофных условиях можно достичь эффективности выщелачивания пирита, наблюдаемой при миксотрофном росте шт.86. Однако ассоциация шт.64 *Leptospirillum*-подобных бактерий и умеренно термофильных бактерий позволяет увеличивать интенсивность выщелачивания пирита в 3,1 раз по сравнению с миксотрофно растущим шт.86.

Предполагается, что между исследованными бактериями возникают синтрофные отношения. Вероятно, умеренно термофильные бактерии поставляют серу и ее восстановленные соединения, а также ионы железа строго автотрофным бактериям, взамен получая от них органические вещества, необходимые для их роста.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биотехнология металлов (ред. Каравайко Г.И., Грудев С.Н.), М.: ЮНЕП, 1985.
2. Варданян Н.С. Биолог. журн. Армении. 49, 1-2, 43-46, 1996.
3. Варданян Н.С. Тезисы докл. Межд. конф. "Микробное разнообразие: состояние, стратегия сохранения, экологические проблемы" 8-11 октября, Пермь, Россия, 1996, с.135, 1996.
4. Варданян Н.С., Акопян В.П. Биолог. журн. Армении. 53, 3-4, 167-172, 2001.
5. Меламуд В.С., Пивоварова Т.А., Кондратьева Т.Ф., Каравайко Г.И. Прикл. биохимия и микробиология, 35, 2, 182-189, 1999.
6. Цаплина И.А., Красильникова Е.Н., Захарчук Л.М.6 Егорова М.А., Богданова Т.И., Каравайко Г.И. Микробиология, 69, 3, 334-340, 2000.
7. Dopson M., Lindstrom B. Appl. Environ. Microbiol. 65, 36-40, 1999.

Поступила 08.1.2002

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 547.96.663; 547.466.25

ИЗМЕНЕНИЯ В ВОДОРАСТВОРИМОЙ ФРАКЦИИ БЕЛКА ГОЛОДАВШИХ ДРОЖЖЕЙ ПРИ ВОССТАНОВЛЕНИИ АЗОТНОГО ПИТАНИЯ

Л.А. НАВАСАРДЯН

Ереванский государственный университет, кафедра биохимии, 375049

The amino acid content of water-soluble fraction of protein of yeast *Candida guilliermondii* BKM U-42 after nitrogen starvation as well as after nutrition restoration was realized. The changes in amino acids percentage content in water-soluble fraction of yeast protein show the subfractional changes of starved yeasts protein during the restoration of nitrogen nutrition.

Дрожжи - белковая фракция - азотное голодание — аминокислоты

В литературе имеются разрозненные данные о преимущественном расходовании тех или иных соединений (углеводы, липиды, аминокислоты, белки и др.) при голодании у разных дрожжей [5, 7, 8]. Согласно этим исследованиям, при голодании происходит усиление катаболизма всех химических компонентов клетки в определенной очередности. Полученные нами данные [1] свидетельствуют, что этот взгляд на сущность голодания является односторонним. Нами показано, что при голодании дрожжей резко меняется количественное состояние белковых фракций не только вследствие неравномерного катаболизма различных фракций, но и, что особенно важно, анаболизма определенных фракций.

Материал и методика. Дрожжевую культуру *Candida guilliermondii* BKM U-42 выращивали на синтетической среде [3]. Для фракционирования белков дрожжи подвергали гомогенизации в стеклянном гомогенизаторе типа Поттера-Элведжема в присутствии окиси алюминия. Фракционирование белков осуществляли по методу Плешкова [6]. Аминокислотный состав белков определяли после их кислотного гидролиза. Аминокислоты определяли хроматографией на бумаге и количественно оценивали фотоэлектроколориметрическим методом [2,6].

Результаты и обсуждение. Нашими исследованиями показано, что в процессе азотного голодания наблюдается определенный прирост биомассы (почти на 50%) и количественные изменения в белковых фракциях [1]. После восстановления азотного питания голодавших дрожжей исследовали изменение количества биомассы, белка и общего азота (табл.1). Согласно данным таблицы, при 8-часовой инкубации предварительно голодавших дрожжей в присутствии валина- N^{15} содержание биомассы не претерпевает существенных изменений. Так, количество биомассы увеличивается на 2-3%, тогда как количество белка и общего азота — на $11 \pm 1\%$ и $45.5 \pm 1.5\%$ соответственно.

Таблица 1. Изменение количества биомассы, белка и общего азота при восьмичасовой инкубации предварительно голодавших дрожжей *C.guilliermondii* ВКМ У-42 в присутствии валина-N¹⁵

Опыт	Количество биомассы, мг		Количество белка, мг		Количество общего азота, мг	
	после голодания	после 8-часовой инкубации	после голодания	после 8-часовой инкубации	после голодания	после 8-часовой инкубации
1.	965	980	170	187	25,5	37
2.	975	990	175	195	27	39
3.	435	440	76	84	12,5	18,5

При азотном голодании на фоне понижения количества общего белка (на 100г биомассы) наблюдается и изменение в водорастворимых фракциях белка (рис.1).

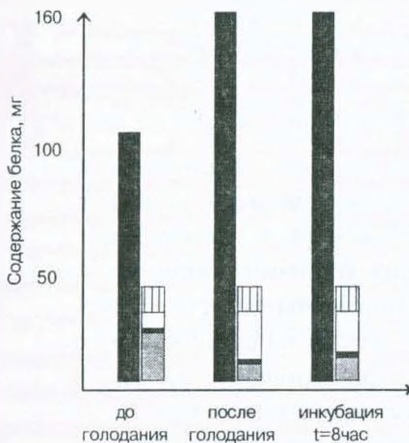


Рис. 1. Содержание белковых фракций в биомассе дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У-42 до и после азотного голодания и при инкубации t=8час на валине-N¹⁵

- - биомасса.
- - водорастворимая фракция
- - солерастворимая + спирторастворимая фракции
- - щелочерастворимые фракции (I+II)
- ▨ - нерастворимый остаток

I смесь а б в II смесь



Рис. 2. Аминокислотный состав водорастворимой фракции белка дрожжей *C. guilliermondii* ВКМ У-42.

- I смесь - цис, гис, асп, гли, тре, ала, тир, вал, лейц
- II смесь - лиз, арг, сер, глу, фала
- а - исходная культура
- б - голодающая культура
- в - после инкубации в присутствии валина-N¹⁵, t=8час

Как при голодании, так и после восстановления азотного питания голодавших дрожжей при 8-часовой инкубации на валине на фоне незначительного пророста биомассы наблюдается увеличение водорастворимых белков примерно на 40%.

Полученные хроматограммы гидролизатов водорастворимых белков (рис. 2) показывают различия в аминокислотном составе этих белков, голодавших и после восстановления азотного питания дрожжей. Выяснилось, что в водорастворимых фракциях белка, по сравнению с голодавшими дрожжами, после восстановления азотного питания происходят значительные

изменения в соотношении процентного содержания аминокислот. Заметно понижается содержание лизина+гистидина, аспартата, и, наоборот, увеличивается содержание валина, лейцина, фенилаланина, приближаясь к процентному соотношению голодавших дрожжей.

Так как генетически детерминированный аминокислотный состав индивидуальных белков при голодании никак не может измениться, на основании полученных данных можно заключить, что изучаемые фракции белков являются гетерогенными, и наблюдаемые изменения в процентном содержании аминокислот являются следствием изменения количественного соотношения подфракции белков.

При восстановлении азотного питания голодавших дрожжей, по-видимому, нормализуется не только количественное соотношение белковых фракций, но и качественный состав каждой фракции, т.е. их подфракционный состав.

Приведенные данные позволяют заключить, что при восстановлении азотного питания голодавших по азоту дрожжей в белковом обмене происходят процессы, обратные по характеру, наблюдаемому при голодании.

ЛИТЕРАТУРА

1. Давтян М.А., Багдасарян Е.Г., Навасардян Л.А. Биолог. журн. Армении, 26, 4, 23, 1973.
2. Зайцева Г.М., Тюленева И.П. Лабораторное дело, 3, 24, 1958.
3. Плевако Е.А., Гивертовский Р.В. Технология дрожжевого производства, Госиздат, М., 1949.
4. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений, Изд. «Колос», М., 1968.
5. Тер-Карапетян М.А., Макарова Е.Н., Цатурян С.С. Биолог. журн. Армении, 21, 9, 3, 1968.
6. Lissitsky S., Laurent G. Bull. Soc. Chem. Biol., 37, 1177, 1955.
7. Remesova T.S., Saubenova M.G. J. Microbiol. and Serol., 35, 1, p.9, 1969.
8. Sols A., Gancedo C., Dela Fuente G. In the «Yeasts», v.2, Physiology and Biochemistry of Yeasts, Acad. Press., London and New York, 1971.

Поступила 9.VII.2003

Աղյուսակներ • Обзоры • Reviews

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 616.98:578.89

**ПРИОНЫ - НОВЫЙ, ОСОБЫЙ ТИП ИНФЕКЦИОННЫХ
БЕЗНУКЛЕИНОВЫХ АГЕНТОВ**

А.С. АГАБАЛЯН

Ереванский государственный медицинский университет, 375025

Работа посвящена биохимической, генетической и инфекционной характеристике нового безнуклеинового класса инфекционных агентов, поражающих центральную нервную систему человека и животных. Показано, что основной инфекционной единицей, вызывающей медленные инфекции, является белковая молекула, названная "прион". Выявленные инфекционные и инфицирующие свойства прионных белков предполагают новые подходы к вопросам этиологии многих нейродегенеративных заболеваний и возможности их профилактики и терапии.

Աշխատանքը նվիրված է կենսաքիմիական, գենետիկ, ինֆեկցիոն բնութագրով նոր, առանց նուկլեինաթթվային ինֆեկցիոն ազդակով դասերին, որոնք կաթվածահարում են մարդու ու կենդանիների կենտրոնական նյարդային համակարգը: Ցույց է տրված, որ հիմնական վարակման միավորը, որը առաջ է բերում դանդաղ մոլեկուլային ինֆեկցիա, համարվում է սպիտակուցի մոլեկուլը «պրիոն» անվանումով: Պրիոնային սպիտակուցների բացահայտված ինֆեկցիոն և վարակիչ հատկությունները ենթադրում են նոր մոտեցումներ բազմաթիվ նեյրոդեգեներատիվ հիվանդությունների ծագումնաբանության հարցերի և նրանց կանխարգելման ու բերապիայի նկատմամբ:

Information on prion diseases caused by a new class of agents-nucleic free molecules of mammals, acquiring manifestation of infective properties as a result of conformations is presented. Molecular organization of priones and the conformational-cellular protein changes underlying the infectious activation of the cell homologue of prions is demonstrated. The main conclusion of the paper is that protein prionization is a common biological phenomenon and the diseases caused by these processes will increase in the near future.

Прионы - прионовые болезни - медленные инфекции - инфекционные безнуклеиновые агенты - инфекционный прионный белок

В последние годы наблюдается неуклонный рост инфекционной заболеваемости, вызванный возвращением или оживлением циркуляции ранее известных инфекций или появлением новых инфекционных агентов [3]. В конце 20-го столетия расшифрована этиология нейродегенеративных заболеваний. Установлено, что причиной их возникновения является инфекционный белок, обозначенный термином "ПРИОН", открытие которого тесно связано с открытием медленных инфекций [7]. В середине прошлого столетия Сигурдсон опубликовал результаты своих наблюдений массовых заболеваний среди овец [14]. Несмотря на явные клинические различия и неодинаковую локализацию повреждений органов и тканей, среди изученных заболеваний были обнаружены четыре одинаковых признака, отличающих медленные инфекции:

- необычно продолжительный (месяцы и годы) инкубационный период,
- медленно прогрессирующий характер течения,
- необычность поражения органов и тканей.

- неизбежность смертельного исхода.

Массовый характер медленных инфекций естественно поднимал вопрос об их происхождении. Было показано, что одна из классических медленных инфекций овец – “висна” вызывается вирусом, по всем своим свойствам сходным с представителями онкорнавирусов. Это открытие способствовало укреплению представления о вирусной этиологии всех медленных инфекций человека и животных и на многие годы предопределило поиски в этом, казалось бы, единственно правильном направлении [7].

За короткое время был накоплен большой фактический материал, анализ которого показал, что очень многие вирусы, хорошо известные как возбудители острых заболеваний, способны при определенных условиях вызывать в организме медленный инфекционный процесс, полностью отвечающий всем четырем признакам медленных инфекций. К ним относят вирусы кори, краснухи, герпеса, клещевого энцефалита, лимфоцитарного хориоменингита, бешенства, вирусы группы папова, гриппа, ВИЧ и др. [6, 7]. В литературе постепенно накапливались данные об особой группе медленных инфекций человека и животных, поражающих ЦНС, где на основе первично-дегенеративных процессов развивается характерная картина формирования губкообразного состояния серого и/или белого вещества головного, а иногда и спинного мозга [4, 6]. Такое своеобразие патоморфологической картины обусловило название этой группы болезней, как *“трансмиссивные губкообразные энцефалопатии”* (ТГЭ). Хотя инфекционная природа ТГЭ была доказана многочисленными экспериментами по передаче заболеваний различным животным, однако обнаружить возбудителей ТГЭ не удавалось.

При разностороннем изучении инфицированной мозговой ткани, в которой было обнаружено наиболее высокое содержание инфекционного агента, было выявлено, что предполагаемый инфекционный агент:

- проходит через бактериальные фильтры с диаметром от 25 до 100 нм,
- не способен размножаться на искусственных питательных средах,
- воспроизводит феномен титрования (вызывает гибель животных при высокой множественности заражения),
- накапливается до титров 10^5 - 10^{11} ИД₅₀ на 1 г мозговой ткани,
- способен первоначально репродуцироваться в селезенке и других органах ретикулоэндотелиальной ткани, а затем в мозговой,
- адаптируется к новому хозяину, что нередко сопровождается укорочением инкубационного периода,
- имеет специфический круг хозяев,
- может изменять патогенность и вирулентность для различного круга хозяев,
- способен к персистенции в культуре клеток, полученных из органов и тканей зараженного организма [10].

Перечисленные выше свойства дают основание рассматривать возбудителей ТГЭ, как *“необычные вирусы”*, почему и в течение некоторого времени эти заболевания подразделяли на медленные инфекции, вызываемые обычными вирусами и медленные инфекции, вызываемые *“необычными вирусами”* [8].

В то же время Прузинер, используя новые подходы к накоплению и очистке инфекционного начала в мозговой ткани зараженных агентом “скрепи” хомяков, показал, что возбудителем скрепи является *“безнуклеиновый низкомолекулярный (27-30 кД) белок”* [7]. Автор назвал этот низкомолекулярный белок “инфекционным прионным белком”, а в качестве инфекционной единицы было предложено наименование “прион”. Слово прион представляет собой анаграмму английских слов “белковая инфекционная (частица) – Proteinaceous infectious (particles) Прион как инфекционная единица состоит из молекул инфекционного прионного белка. Другая формулировка гласит, что прионы – это белковые инфекционные агенты, кодирующиеся в нормальной или мутантной форме геномом хозяина, не обладающие автономными механизмами репликации, вызывающие в процессе развития инфекционного процесса накопление фибриллярных белков [8].

Вследствие того, что результаты исследований последних 15-20 лет полностью

подтвердили прионную природу возбудителей ТГЕ, эти заболевания теперь называют "прионными болезнями" [10, 11]. Сегодня очевидно, что открытие прионов как инфекционных агентов поставило под угрозу фундаментальные основы генетики. С пониманием структуры и механизмов репликации прионов в инфекционной патологии появились новые взгляды и понятия, что, естественно, будет отражаться на давно открытых и прочно устоявшихся понятиях таких, как инфекционный вирус, инфекционная РНК или ДНК, репликация вирусных нуклеиновых кислот, и, как следствие, трансляция вирусспецифических белков и сборка вирусных частиц [1, 2, 5].

Было показано, что прионный белок может существовать в двух формах. Его нормальная или клеточная форма, обозначенная как PrP^c , обнаруживается в организме всех млекопитающих, в том числе и человека. Ген, кодирующий синтез PrP^c , высокоактивен, и очень высокие уровни его экспрессии выявляются в нейронах, где концентрация иРНК для PrP^c в 50 раз выше, чем в глии. Показано, что нормальный прионный белок PrP^c играет чрезвычайно важную роль в жизнедеятельности организма: участвует в передаче нервных импульсов, играет определенную роль в поддержании циркадных ритмов, регулируя суточные циклы активности и покоя в клетках, органах и в организме целом [11-12].

В организме людей и животных, страдающих прионными заболеваниями, прионный белок обнаруживается в другой форме, обозначаемой как PrP^{sc} [9].

Конверсия PrP^c в PrP^{sc} - посттрансляционный процесс, включающий глубокое конформационное изменение, лежащее в основе размножения инфекционных прионов. Инфекционный прионный белок, в отличие от нормального (PrP^c), обладает высокой устойчивостью к нагреванию до 80°, УФ- облучению, проникающей радиации и действию протеазы К. Выявленные свойства позволили в лакоиничной форме сформулировать понятие "прион", определив его как *"малую белковую инфекционную частицу, устойчивую к инактивирующим воздействиям, которые модифицируют нуклеиновые кислоты"*. Перечисленные свойства инфекционного прионного белка однозначно свидетельствуют о том, что прионы являются новым классом инфекционных агентов, принципиально отличающихся от мира простейших, бактерий, грибов, вирусов.

Хотя механизм накопления инфекционного прионного белка в зараженном организме окончательно не выяснен, имеющиеся о нем сведения и представления о том, что это посттрансляционный процесс, позволяют предположить, что инфицирующий прионный белок может вызывать в здоровом организме трансформацию нормального прионного белка в его инфекционную форму в результате конформационных изменений. Становится понятным, что процесс накопления инфекционного прионного белка происходит не в результате синтеза в зараженном организме молекул PrP^{sc} de novo, а вследствие конформационных изменений уже синтезированных молекул PrP^c под влиянием инфекционного прионного белка PrP^{sc} .

Нужно сказать, что структурная близость инфекционного прионного белка PrP^{sc} и его нормальной изоформы PrP^c не дает возможности обнаружить антитела на прионный белок PrP^c при развитии прионных заболеваний людей и животных, так как этот белок воспринимается иммунной системой как "свой".

Представляют определенный интерес данные, полученные при клонировании комплементарной ДНК из клонотекки, приготовленной на основе очищенной матричной РНК из мозга хомяков, инфицированных вирусом скрепи. В результате последующего секвенирования кДНК была раскрыта структура этого загадочного инфекционного агента на уровне гена и белка. Было установлено, что последовательность кДНК вируса скрепи включает в себя 1918 аминокислот. *Важнейший факт, установленный в этом исследовании, состоит в том, что инфекционные прионы практически не содержат нуклеиновой кислоты, способной кодировать их первичную структуру, т.е. впервые в истории исследования инфекционных агентов выявлен новый класс инфекционных частиц, лишенных генетического материала* - прионов [13].

Прион является вариантом нормального белка, вырабатываемым нервными клетками

и имеющим молекулярную массу 35 кД. Описаны также другие молекулярные формы прионов, представленные более короткими полипептидами с молекулярной массой 27-31 кД [12, 29], являющиеся по-видимому протеолитическими фрагментами предшественника. Они представляют собой белок-прион, обладающий свойством, проникая в клетку, направлять вместо естественного белка (PrP^c, 35 кД) синтез себе подобных инфекционно-активных прионов. Можно констатировать, что, появившись в результате генетических мутаций или других обстоятельств, белок приобретает свойства инфекционной единицы и вызывает патологический, а затем и эпидемический процесс.

Ранее было показано, что прионы активно взаимодействуют с митохондриальной ДНК, причем это взаимодействие высокоспецифично, так как связывание прионов наблюдается только с началом репликации митохондриальной ДНК с участием, ответственным за контроль репликации митохондриальной ДНК. Связывание прионов с участием, ответственным за контроль репликации митохондриальной ДНК, может приводить к блокаде репродукции митохондрий, что для большинства тканей и, в особенности клеток ЦНС, может закончиться трагично. ДНК-связывающие или РНК-связывающие функции прионов позволяют сформулировать представления о молекулярных механизмах репродукции прионов в пораженных клетках. Предполагается, что свойство прионов взаимодействовать с митохондриальной ДНК в определенной степени объясняет механизм их цитоплазматической передачи и имеет непосредственное отношение к открытию прионов и прионизации у дрожжей [15].

Согласно гипотезе Викнер [16], прионы являются естественными компонентами всех эукариотических клеток. В клетках они существуют в двух молекулярных формах: в нативной или глобулярной, когда 4 основных альфа-спиральных домена организованы в плотную структуру, и в развернутой форме, когда наблюдается раскрытие гидрофобного "кора" белка. Первая форма способна выполнять функции трансляционного репрессора на уровне трансляции собственной иРНК. Вторая молекулярная форма регуляторно неактивна. В связи с этим синтез деспирализованной формы приона сопровождается накоплением белка и неконтролируемой трансляцией матричной РНК, кодирующей клеточный прион. Такой механизм синтеза и накопления белка не противоречит основным законам генетики, объясняет патогенез заболевания, а также длительность инкубационного периода.

Изучение локализации прионов в тканях животных и человека показало, что после внутримозгового заражения болезнью Крейтцфельда - Якоба прионы обнаруживаются в ЦНС, лимфоузлах, селезенке, тимусе, почках, печени, спинномозговой жидкости и в периферической крови, где они размножаются. Все пораженные органы содержат до 10 млн инфекционных единиц на 1 г ткани, однако эти органы, за исключением головного мозга, не подвергаются никаким патологическим изменениям.

Таким образом, изучение прионов и связанных с ними заболеваний является новой быстро развивающейся областью биомедицинских исследований, с широким применением молекулярно-биологических методов изучения структуры прионных белков. Результаты этих исследований позволяют в определенной степени обосновать новое направление дальнейших подходов к терапии прионных болезней, а также способствуют выяснению причин таких распространенных нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона и др. Благодаря исследованиям прионов и прионовых болезней, уже сейчас существует возможность определить группу риска по возникновению врожденных прионовых болезней еще до появления неврологических нарушений.

В тоже время, несмотря на определенные успехи в изучении природы прионов и прионовых болезней, лечение прионовых заболеваний все еще зависит от дальнейших успехов молекулярной и клеточной биологии и химии белка, что может привести к расшифровке процессов репликации прионов и понять патогенетические механизмы этих заболеваний.

ЛИТЕРАТУРА

1. Агабян А.С. Биолог. журн. Армении, 5, 31-38, 1973.
2. Агабян А.С. Биолог. журн. Армении, 6, 40-46, 1974.
3. Агабян А.С., Авакян Т.А., и др. Сб. научн. трудов ассоциации врачей-интернистов, выпуск 4, 15-19, Ереван, 2002
4. Агабян А.С., Аветисян И.В., и др. Нейрохимия, 2, 207-209, 1998.
5. Агабян А.С. Акопян С.М. Журн. клин. и эксп медицины, 4, 12-17, 1974.
6. Завалишин И.А., Верещагин Н.В. и др. Вестник РАМН, 9, 50-56, 1997.
7. Зуев В.А. Медленные вирусные инфекции человека и животных, М., "Медицина", 256с., 1988.
8. Тер-Аванесян М.Д., Паушкин С.В. и др. Молекул. биология, 32, 32-42, 1998.
9. Deslys J.P., Lasmez C.I. et al. Lancet, 349, 30-31, 1997.
10. Gajdusek D.C. Subviral pathogenesis of plants and animals: Viroids and Prions, New York, 483-544, 1985.
11. Hill A.E., Desbruzais M., Joines S., et al, Nature, 389, 448-450, 1997.
12. Laftus B., Rogers M. Gene, 185, 215-219, 1997.
13. Prusiner S.B. Annual Rev., Microbiol, 48, 655-686, 1994.
14. Sigurdsson B. Brit. Vet. J., 110, 255-270, 1954.
15. Taylor D.M. Brit. med., Bull, 49, 810-821, 368-381, 1993.
16. Wickner R.B., Marison D.C., Edskes H.K. Seminars in virol, 7, 215-223, 1997.

Поступила 10.IV.2002

Գրախոսություն • Библиография • Bibliography

Биол. журн. Армении, 3 (55), 2003

**Г.Г. Шлегель. История микробиологии:
Пер. с нем. — М.: Едиториал УРСС, 2002, - 304с.**

Ганс Шлегель — всемирно известный микробиолог из Геттингена, Германия, обрадовал своих почитателей новой фундаментальной книгой. Его «История микробиологии», изданная в 1999г. и вышедшая в переводе на рус.яз. в 2002г., несомненно, заслуживает большого интереса широкой общественности. Книга охватывает большой период развития микробиологии вплоть до 60-х годов прошлого века. В ней с высоким профессионализмом изложены основные пути становления и развития микробиологии в широком аспекте, представлены биографии наиболее выдающихся ученых и краткие обзоры наиболее важных работ по различным направлениям микробиологии.

Широкий охват излагаемых направлений, глубокое знание излагаемых вопросов и обилие представленного фактического материала позволяют рекомендовать эту книгу в качестве ценного учебного пособия по микробиологии и родственным ей отраслям науки. В наше время подобную книгу мог бы написать лишь Г.Шлегель — человек исключительной эрудиции и энциклопедических знаний.

Ознакомление с книгой и представленным богатым материалом убеждает читателя в огромной роли микробиологии в развитии медицины, сельского хозяйства, химии, промышленности и многих отраслей науки. Именно на одноклеточных организмах были установлены принципиально важные закономерности жизнедеятельности, разработаны и сформулированы концепции, послужившие основой развития биохимии, генетики и современной биотехнологии.

Зарождение микробиологии определило установление инфекционной роли микроорганизмов и заложило основы развития эпидемиологии, иммунологии и химиотерапии. Не подлежит сомнению огромное значение изучения микроорганизмов для выявления основных закономерностей изменчивости и в целом — наследственности. Генетика бактерий явилась основой современной молекулярной биологии и геной инженерии с ее захватывающими дух успехами по управлению наследственностью микроорганизмов, растений и животных.

Содержание книги охватывает главы, посвященные истории становления и развития микробиологии и в этом аспекте — концепциям возникновения жизни и роли микробов в природных процессах. Автор освещает основные этапы создания главных методов изучения микроорганизмов: питательные среды, стерилизация, принципы получения чистых культур. Отдельные главы посвящены открытию возбудителей инфекционных заболеваний, процессам брожения и вызывающим их организмам. Значительное место занимают аноксигенные и оксигенные фототрофные бактерии (2 главы), по одной главе уделено открытию и изучению хемолитографов, свободной и симбиотической фиксации атмосферного азота. Подробно изложены история и основные этапы изучения метаболизма и ферментов микроорганизмов в свете единства биохимических процессов. Много ценного и нового читатель узнает из глав, посвященных истории изучения структуры и функции клетки, экологии и систематики микроорганизмов. В главе «Микология» кратко излагается

история изучения низших и высших грибов и вклад микологов в развитие микробиологии.

По-видимому, следует пожелать в последующих переизданиях книги включить в нее главы, посвященные истории изучения других одноклеточных организмов – синезеленых микроводорослей и простейших.

Безусловно, большой интерес представляют главы «Бактериофаги и плазмиды», «Мутации и перенос генов» и «Регуляция обмена веществ», которые наглядно свидетельствуют об основополагающей роли изучения микроорганизмов в развитии вирусологии, генетики, молекулярной биологии и генной инженерии.

Отдельный раздел книги включает биографии ученых, внесших наиболее существенный вклад в развитие различных разделов микробиологии. Особый интерес представляют биографии и приводимые выдержки из оригинальных работ этих ученых, что позволяет ясно представить их истинную роль в становлении и развитии отдельных научных направлений, а не судить по пересказам – порой не соответствующим истине – других авторов. Книга богато иллюстрирована, снабжена именным и предметным указателями и списком основной литературы.

Выход в свет перевода книги Г.Шлегеля – крупное событие для стран СНГ, и эту традицию необходимо продолжить.

Э. Африкан

Լրիվ • Хроника • Chronics

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

ВАГАН ОСИПОВИЧ КАЗАРЯН

(к 85-летию со дня рождения)

1-го января 2003г. исполнилось 85 лет со дня рождения крупного физиолога растений, педагога и общественного деятеля академика Национальной академии наук Республики Армения, доктора биологических наук, профессора Вагана Осиповича Казаряна.

В.О.Казарян родился 1-го января 1918г. в селении Хндзореск Горисского района, в семье рабочего. Начальное образование получил в Горисской неполной средней школе, по окончании которой поступил в Горисский педагогический техникум.

В 1934г. окончив техникум, В.О.Казарян два года работает преподавателем неполной средней школы в селе Караундж. В 1936г. для продолжения учебы направляется в Ереван и поступает на биологический факультет Ереванского государственного университета, тогда же публикует свои первые работы по физиологии растений.

В 1941г. по окончании университета В.О. Казарян, проходя 6-месячные курсы в Тбилисском артиллерийском училище, в звании лейтенанта призывается в Ереванскую специальную военно-артиллерийскую школу №17, где преподает молодым курсантам. В 1943 году поступает в аспирантуру при кафедре физиологии и анатомии растений Ереванского государственного университета.

В 1945 году В.О.Казарян досрочно защищает кандидатскую диссертацию, посвященную влиянию интенсивности и качества света на фотопериодическую реакцию высших растений.

По окончании аспирантуры В.О.Казарян переходит в основном на научную работу во вновь организованный Институт ботаники АН АрмССР на должность старшего научного сотрудника, затем - заведующего лабораторией физиологии растений.

В 1949 году В.О.Казарян поступает в докторантуру Института физиологии растений АН СССР им. К.А.Тимирязева, через 2 месяца назначается директором Института ботаники и Ботанического сада АН АрмССР, которым он бессменно руководил в течение 40 лет.

Больших творческих успехов Ваган Осипович достиг после 1951 года, когда в Институте физиологии растений АН СССР им К.А.Тимирязева с успехом защитил диссертацию на степень доктора биологических наук, в том же году ему было присвоено звание профессора.

Создав современно оснащенную лабораторию физиологии растений и сплотив вокруг себя молодые способные кадры, он начинает разработку актуальных вопросов проблемы онтогенеза высших растений.

В 1965 году В.О.Казарян избирается членом-корреспондентом АН АрмССР, а в 1974 - действительным членом АН АрмССР. В 1970 году избирается академиком-секретарем Отделения биологических наук и членом Президиума АН АрмССР.

Ваган Осипович принадлежит к тому поколению ученых, которые все свои силы и энергию без остатка отдали науке.

В его работах принципиально новые объяснения получили такие важные вопросы, какими являются вопросы светового режима растений, фотопериодизма, физиологической связи между главной и боковыми почками двулетних овощных и технических культур, флоэмы и феллодермы, восстановления хлорофилла и интенсивности фотосинтеза, зависимости ассимиляционной деятельности листьев от метаболической активности корней.

направленности транспорта пластических веществ в ходе онтогенетического развития, вегетативного роста, периодичности плодоношения, фитотехнических мероприятий, трофической и гормональной сферы растений и т.д.

Перу В.О.Казаряна принадлежат более 300 научных работ, среди которых шесть монографий, посвященных в основном теоретическим вопросам онтогенетического развития, а также физиологическим аспектам эволюции высших растений. Работы В.О.Казаряна публикуются и цитируются в мировой научной литературе по фитофизиологии, принося автору широкую известность, как одному из ведущих физиологов растений.

В первом монографическом труде "Стадийность развития и старения однолетних растений" (1952) В.О.Казарян на основании многочисленных экспериментов и глубокого анализа данных опровергает господствующее мнение, согласно которому в основе старения и отмирания однолетних растений лежит истощение, якобы вызванное плодоношением.

В монографии "Физиологические особенности двулетних растений" (1954) он анализирует физиологическую природу корреляции между главными и боковыми почками двулетних при прохождении яровизации, что в дальнейшем послужило основой для разработки способов корневого выращивания капусты и свеклы.

В монографии "Физиологические основы онтогенеза растений" (1959) В.О.Казарян вскрыл внутренние противоречия индивидуального развития растений, выявил биологические особенности онтогенеза основных жизненных форм, одновременно обосновал механизм омоложения растений.

Монография "Старение высших растений" (1969) посвящена одному из важнейших вопросов биологической науки - старению высших растений.

На основе экспериментальных данных и анализа физиологической сущности корне-лиственной корреляции, как основу целостности, В.О.Казарян разрабатывает общую теорию старения высших растений на уровне целостного организма.

Согласно развиваемой им концепции, В.О.Казарян рассматривает старение как процесс постепенного и необратимого затухания корне-лиственной функциональной корреляции, выражающийся в уменьшении как массы, так и поглотительной и метаболической активности корней, сочетающийся с сокращением поверхности листьев и ослаблением их функциональной активности.

В этой монографии дано понятие коэффициента корнеобеспеченности листьев - отношение массы активных корней к поверхности листьев, анализированы его изменения в онтогенезе и роль в старении растений.

Экспериментально доказывается, что ослабление роста и следующее за ним старение начинается с возникновения корневой недостаточности в связи с плодоношением, увеличением расстояния между корнями и листьями, переходом активной корне-лиственной связи от главных осей к периферийным у кустарников и полукустарников, ослаблением проводящей системы и т.д.

Эта монография принесла В.О.Казаряну особое признание и привлекла большое внимание как наших ученых, так и зарубежных. Она переведена на французский и немецкий языки.

В.О.Казарян получил специальное приглашение от программного комитета XI международного ботанического конгресса на симпозиум, посвященный новым открытиям и идеям в биологии. Доклад вызвал большой интерес.

В.О.Казарян является также одним из авторов и главным редактором уникального труда "Научные основы облесения и озеленения Армянской ССР" (1974). Являясь директором Института ботаники АН АрмССР, он направляет деятельность ведущих ученых Института на внедрение результатов научных исследований в практику озеленения и лесоразведения республики. Упомянутая монография посвящена этой проблеме. В ней подробно анализируются лесорастительные районы Армении, рекомендуются эффективные приемы создания лесных культур в различных почвенно-климатических условиях, оптимальные варианты смещения и размещения, а также создания декоративных парков, скверов, лесопарков и зеленых массивов. Этот труд стал настольной книгой работников лесного хозяйства и озеленителей.

Следующий монографический труд В.О.Казаряна "Физиологические аспекты эволюции от древесных к травам" (1990), изданный издательством "Наука", посвящен теоретическим обобщениям, касающимся физиологических аспектов филогенеза основных жизненных форм высших растений.

Автор книги показал, что в ходе длительной эволюции развитию подвергались также жизненные формы высших растений. В этом процессе уменьшилась вегетативная масса и сократились коммуникационные пути между листьями и корнями. В результате усилился обмен веществ между этими органами, т.е. повысился уровень корне-лиственной интеграции.

Таким образом, эволюционная морфофизиологическая трансформация от древесных к травам приводит к прогрессивному возрастанию общего уровня корне-лиственной интеграции.

Теоретические достижения В.О.Казаряна с успехом применялись при разработке новых технологий в области сельского хозяйства, на основании которых получены несколько авторских свидетельств.

Неоценим вклад академика В.О.Казаряна в многотомную Армянскую энциклопедию. Он является автором многочисленных научно-популярных работ, где очень доступно излагались различные вопросы ботанической науки.

Важной задачей научных работников он считал широкое обсуждение полученных результатов и обмен опытом. В этой связи следует упомянуть ту огромную работу, которую проделал В.О.Казарян для организаций Всесоюзного симпозиума по онтогенезу высших растений (Ереван, 1966) и Всесоюзной конференции, посвященной физиологическим и экологическим аспектам эволюции жизненных форм высших растений (Ереван, 1988).

Академик В.О.Казарян занимался также педагогической деятельностью. С 1945 по 1948 годы был доцентом в Армянском педагогическом институте, а с 1948 по 1968 годы заведовал кафедрой физиологии и анатомии растений биологического факультета Ереванского государственного университета. Первостепенной задачей ученого он считал подготовку высококвалифицированных кадров. Под его руководством защитились примерно 50 кандидатских и докторских диссертаций.

40 лет руководя Институтом ботаники и Ботаническим садом Академии наук Армении, В.О.Казарян вложил много сил и энергии для повышения качества научных исследований, для создания и укрепления научно-экспериментальной базы. Он очень многое сделал для Ботанического сада АН Армении, для его благоустройства, создания коллекций и их обогащения.

В.О.Казарян имеет большие заслуги в научно-общественной жизни республики. Он являлся членом Президиума АН, членом комиссии по проблеме Севана при Совете Министров АрмССР, заместителем редактора "Докладов" АН АрмССР, членом редколлегий "Биологического журнала Армении", членом регионального Научного совета физиологии и биохимии растений, членом Всесоюзного Совета ботанических садов и председателем Армянского общества охраны природы, председателем двух Ученых советов: по защите докторских диссертаций по ботанике и кандидатских по физиологии растений, членом Советского райкома КП Армении, членом советского районного исполнительного комитета Совета народных депутатов. Неоднократно избирался депутатом городского Совета и членом его президиума, а также председателем постоянной комиссии депутатов по благоустройству и озеленению города, членом Ереванского горкома КП Армении.

Академик Ваган Осипович Казарян отличался человеколюбием и требовательностью к себе и окружающим, добротой и способностью быть учителем и воспитателем, обладая высокими человеческими и моральными качествами.

В день 85-летия со дня рождения выдающегося ученого академика Вагана Осиповича Казаряна все коллеги, товарищи и ученики-продолжатели его дела вспоминают его добрым именем.

В.А. Давтян

Биолог. журн. Армении, 3 (55), 2003

ԼԵՎՈՆ ԱՐՇԱԼՈՒՅՍԻ ՍԱՏԻՆՅԱԼ
(ծննդյան 80-ամյակի առթիվ)



Հայաստանի գիտական հասարակայնությունն այսօր նշում է կենսաբանական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր, Հայաստանի Հանրապետության Գիտությունների Ազգային Ակադեմիայի վաստակավոր գործիչ, Բնապահպանության և կենսագործունեության անվտանգության միջազգային ակադեմիայի, Հայաստանի Վիրաբուժական գիտությունների իսկական անդամ, Ուղեղի հետազոտության միջազգային կազմակերպության անդամ, Անգլիայի պարապեզային կազմակերպության պատվավոր անդամ, ՀՀ ԳԱԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի նյարդա-ներզատչական փոխհարաբերությունների լաբորատորիայի վարիչ, ֆիզիոլոգ Լևոն Արշալույսի Մատինյանի ծննդյան 80 և գիտա-մանկավարժական գործունեության 55-ամյակը:

Լ.Ա. Մատինյանը ծնվել է 1923 թվականի սեպտեմբերի 11-ին Թբիլիսիում: Նրա գիտական հետազոտությունները

հիմնարար-կիրառական են, բազմաբնույթ, նվիրված են երկվամբների գործունեության վրա Հայաստանի հանքային ջրերի ազդեցության ֆիզիոլոգիական մեխանիզմների ուսումնասիրությանը, արյունաստեղծման համակարգի համեմատաֆիզիոլոգիական մեխանիզմների, մարդու և կենդանիների օրգանիզմների կենսաոլիթների մեխանիզմների պայմանական ռեֆլեքսների դրսևորման անհատական և պատմական օրինաչափություններին, օրգանիզմի փոխհատուցող-հարմարողական գործունեության էվոլյուցիոն առանձնահատկություններին, վնասված կենտրոնական նյարդային համակարգի առանձնահատկությունների և դրանց հիմքում ընկած ֆիզիոլոգիական մեխանիզմների բացահայտման օրինաչափությունների ուսումնասիրությանը: Այդ հետազոտությունների հիման վրա մշակվել են ողնուղեղի վնասումների բուժման նոր եղանակներ: Հատկապես կարևոր տեղ է գրավում վնասված նյարդերի ախտահարումների, ստոմատոլոգիական հիվանդությունները կենդանական և բուսական ծագման տարբեր ֆերմենտներով և դրանց ու ֆիզիկական գործոնների զուգակցումով բուժման համար մշակված Լ. Մատինյանի և նրա աշակերտների մեթոդները, որոնք այսօր հաջողությամբ կիրառվում են նյարդավիրաբուժության, վիրաբուժության, ատամնաբուժական կլինիկաներում:

Հայրենական Մեծ Պատերազմի տարիներին պրոֆեսոր Լ. Մատինյանը մշակել է էվակաչափաբերապիայի մեթոդը, որը հաջողությամբ ներդրվել է կլինիկաներում և բուժել բազմաթիվ զինվորների վերքեր:

Մեր հոբելյարը հեղինակ է 250 գիտական աշխատանքների, ներառյալ 5 մենագրության, որոնցից մեկը թարգմանվել է անգլերեն և տպագրվել ՍՍՆ-ում, հեղինակ է 2 գյուտարարական աշխատանքի՝ գրանցված ՀՀ Պետական գրանցամատյանում և 5 մեթոդական հանձնարարականների ու 3 նորարարական առաջարկության: Նրա ղեկավարությամբ պաշտպանվել են 2 դոկտորական և 11 թեկնածուական թեզեր:

Թբիլիսիի Բժշկական ինստիտուտը գերազանցությամբ ավարտելուց հետո Լ.Ա. Մատինյանը անցել է Երևանի Բժշկական ինստիտուտին կից թերապիայի գծով օրդինատուրան, միաժամանակ (1946թ.) աշխատելով Հայաստանի ԳԱ Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտում, սկզբում

որպես ավագ լաբորանտ, ապա կրտսեր, հետագայում ավագ գիտական աշխատող: Եղել է ինստիտուտի գիտական գծով քարտուղարը, իսկ 1983-1993թթ. նույն ինստիտուտի գիտական գծով փոխտնօրենը՝ միաժամանակ ղեկավարել է նյարդա-ներզատչական փոխհարաբերությունների լաբորատորիան:

Ներկայումս հանդիսանում է Լ. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի գիտական աստիճաններ շնորհող խորհրդի նախագահը և ղեկավարում է Հայկական Ֆիզիոլոգիական Ընկերությունը:

Պրոֆեսոր Լ.Ա. Մատինյանը իր գիտական անբասիր զործունեության համար պարգևատրվել է «Հայրենական Մեծ Պատերազմի», «Աշխատանքի Վետերան», «Հաղթանակի 50-ամյա տարելիցը Հայրենական պատերազմում» և այլ մեդալներով: 20-րդ հարյուրամյակում գիտության մեջ ունեցած նվաճումների համար Լ.Մատինյանը 1997թ. արժանացել է «Տարվա Մարդ» կոչմանը և պարգևատրվել է 2000-ամյա փառքի ոսկյա ու միջազգային արձաթյա մեդալներով: Հորեյլանի առթիվ Բնապահպանության և կենսագործունեության միջազգային ակադեմիան նրան պարգևատրել է Մ.Վ. Լոնոնոսովի անվան ոսկե մեդալով:

Այսօր էլ պրոֆեսոր Լ. Մատինյանը լի է գիտական-ստեղծագործական եռանդով, շարունակում է կատարել մեծածավալ ու բազմաբնույթ ֆիզիոլոգիական հետազոտություններ: Նա աչքի է ընկնում իր համեստությամբ, աշխատասիրությամբ: Ցանկանում ենք մեր հորեյլային քաջառողջություն և երկարակեցություն:

**ԴԴ ԳՍԱ Լ.Ա. Օրբելու անվան Ֆիզիոլոգիայի ինստիտուտի
գիտության գծով փոխտնօրեն, կզդ Խ.Յ. Նահապետյան**

Լաբորատորիայի վարիչ, կզդ Ռ.Ա. Հարությունյան

Ավանդադրված հոդվածի ռեֆերատ
Реферат депонированной статьи
Abstract of deponated article

Биол. журн. Армении, 3 (55), 2003

УДК 577.15.591.8

ПЕРОКСИСОМАЛЬНЫЕ ПРОТЕАЗЫ И ПЕПТИД-ГИДРОЛАЗЫ *ASPERGILLUS NIGER* R-3 / Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А. - Ереванский государственный университет, Ереван, 2003 - 6с - Библиогр. 10 назв. - Рус. - Деп. N 70 БЖА 2003

Ферментные системы, расщепляющие пептиды и белки, широко распространены в природе и имеют большое значение для выяснения механизмов метаболического контроля в азотном обмене. Выяснение механизма действия гидролитических ферментов важно для понимания процессов жизнедеятельности, протекающих в пероксисомах, которые обладают активностью оксидазы D-аминокислот, каталазы и уратоксидазы.

Для получения общей картины относительно распределения протеаз, пептид гидролаз *Aspergillus niger* R-3, выращенной на мелассе, гомогенат культуры подвергали ультрацентрифугированию. При использовании в качестве субстрата синтетических пептидов пептидазная активность обнаруживается в надосадках, полученных посредством центрифугирования при 700g, 25000g, и располагается в убывающем порядке: DL-аланил - DL-аланин > глицил - DL-валин, а при 100000g - DL-аланил - DL-аланин > глицил - D-валин > глицил - DL-валин. Установлено, что в пероксисомальных двух фракциях *A.niger* R-3 (полученных изопикническим центрифугированием в градиенте 0,5М раствора сахарозы и 15% перколла), обладающих активностью оксидазы D-аминокислот, проявляются активности протеаз, составляющие в I фракции - 73%, во II - 26 %.

Исследования активности пептидаз в этих фракциях показали, что при использовании в качестве субстрата глицил-D-валина активность фермента в I фракции превышает исходную активность в 1,5 раза, а при глицил-DL-валине активность фермента увеличивается как в I (93%), так и во II (75%) фракциях. Равномерное проявление активности фермента в I и во II фракциях, составляющей 51%, 54% соответственно, наблюдается при использовании в качестве субстрата DL-аланил - DL-аланина. Надо отметить, что высокая активность протеаз и пептидаз у *A.niger* R-3 в этих фракциях коррелирует с активностью пероксисомальной оксидазы D-аминокислот.

Исследования действия протеаз, пептид-гидролаз и оксидаз D-, L-аминокислот в пероксисомальных фракциях *A.niger* R-3 показали, что посредством изопикнического центрифугирования в градиенте 0,5М раствора сахарозы и 15% перколлы становится возможным выявление активности протеаз и щелочных (рН 8,3) пептид-гидролаз *A.niger* R-3.

Aspergillus niger R-3-ի բջիջներից 0,5М սախարոզի և 15% պերկոլի գրադիենտում իզոպիկնիկ ցենտրիֆուգման մեթոդով անջատված L-, D-ամինաթթվային օքսիդազի ակտիվությանը օժտված պերօքսիսոմալ ֆրակցիաներում հնարավոր է դառնում հայտնաբերել նաև պրոտեազային և պեպտիդ հիդրոլազային ակտիվությունները:

In the peroxisomes fractions of *Aspergillus niger* R-3 possessed oxidase activity of L-, D-amino acids by isopicnic centrifugation in gradient of 0,5M sucrose and 15% percoll it becomes possible to detect the activities of protease and peptide-hydrolases.

ԲՈՎԱՆԴԱԿՈՒԹՅՈՒՆ

Օրիգինալ հոդվածներ

Մովսիսյան Վ.Մ. Ջրօգտագործման միջպետական և միջազգային փոխհարաբերությունների և համագործակցության մի քանի հիմնահարցեր	183
Հովհաննիսյան Ռ.Գ., Կարստենս Ռ.Պ. Օտարածին էքզոնի հյուսվածքասպեցիֆիկ սպլայսինգը ֆիբրոբլաստների աճի գործոնի պրե-մՈՆԹ-ի ռեցեպտոր 2-ի cis էլեմենտների կարգավորման ազդեցությամբ	191
Բուրյակո Ի.Ա., Ստապովիչ Ն.Ի., Դուբատովկա Ս.Ի., Լոբանով Ա.Գ., Անտրանիկյան Գ. Օսլա յուրացնող կաթնաթթվային բակտերիաների մեկուսացումը և բնութագիրը	198
Շամցյան Մ.Մ., Աֆրիկյան Է.Գ., Անտրանիկյան Գ. Կաթնաթթվի անընդհատ ստացումը	204
Շամցյան Մ.Մ., Բոչկովա Ա.Պ., Պանտյուկ Օ., Անտրանիկյան Գ., Աֆրիկյան Է.Գ. Միկրոօրգանիզմների աճի կարգավորիչ հիդրոպտերինի ազդեցությունը կաթնաթթվային խմորման վրա	210
Աբելյան Վ.Հ., Բալայան Մ.Ս. Լակտոսախարոզի ֆերմենտատիվ սինթեզը	214
Վարդանյան Ն.Ս., Հակոբյան Վ.Պ. Սետաղների կենսատեխնոլոգիայի համար կարևոր քենոլիթոտրոֆ բակտերիաների տարածվածությունը Հայաստանի սուլֆիդային հանքավայրերում	220

Համառոտ հաղորդումներ

Գևորգյան Մ.Լ., Դավթյան Մ.Ա. Արգինազի ինակտիվացումը յոդացետատով	228
Գրիգորյան Վ.Գ. Հրազդան գետի ջրի որակը և սեզոնային դինամիկան	231
Նիկողոսյան Վ.Գ., Բաղդասարյան Ի.Բ. Ազոտֆիքսող մանրէների համակենցությունների ածխածնի տարբեր աղբյուրների օգտագործման և ազոտի ֆիքսման ակտիվության մասին	234
Նիկողոսյան Վ.Գ., Բաղդասարյան Ի.Բ. Դիագնոտրոֆների ազոտֆիքսացիայի խթանումը ազոտֆիքսող մանրէների համակենցությունում զարգացող բակտերիաների կողմից	238
Վարդանյան Ն.Ս. Պիրիտի տարրալվացումը ծծումբ և երկաթ օքսիդացնող բակտերիաների և նրանց համակենցությունների կողմից	242
Նավասարդյան Լ.Ա. Քաղցած շաքարասկերի սպիտակուցի ջրալույծ ֆրակցիայի փոփոխությունները ազոտային սննդառության վերականգնման ժամանակ	245

Ակնարկներ

Աղաբալյան Ա.Ս. Պրիոնները որպես ինֆեկցիոն ոչ նուկլեինային ազեոնների նոր, հատուկ տեսակ	248
--	-----

Գրախոսություն

Աֆրիկյան Է.Գ. Հ.Գ. Շլեգել. Միկրոբիոլոգիայի պատմություն	253
--	-----

Լրատու

Վահան Օսիպի Ղազարյան (ծննդյան 85-ամյակի առթիվ)	255
Լևոն Արշալույսի Մատինյան (ծննդյան 80-ամյակի առթիվ)	258

Ավանդադրված հոդվածի ռեֆերատ

Պապոյան Ա.Ռ., Հովհաննիսյան Ս.Պ., Դավթյան Մ.Ա. <i>Aspergillus niger</i> R-3 ի պերօքսիտմալ պրոտեազները և պեպտիդ հիդրոլազները	260
--	-----

СОДЕРЖАНИЕ

Оригинальные статьи

Мовсисян В.М. Актуальные проблемы межгосударственного и международного сотрудничества в области водопользования в Армении	183
Оганесян Р.Г., Карстенс Р.П. Ткане-специфичный сплайсинг чужеродного экзона под регуляцией <i>cis</i> элементов пре-мРНК рецептора 2 фактора роста фибробластов ..	191
Буряко И.А., Астапович Н.И., Дубатовка С.И., Лобанок А.Г., Антраникян Г. Выделение и характеристика крахмал утилизирующих молочнокислых бактерий	198
Шамцян М.М., Африкян Э.К., Антраникян Г. Непрерывное получение молочной кислоты	204
Шамцян М.М., Бочкова А.П., Пантук О., Антраникян Г., Африкян Э.К. Влияние регулятора роста микроорганизмов гидроптерина на молочнокислое брожение ...	210
Абелян В.А., Балаян А.М. Ферментативный синтез лактосахарозы	214
Варданян Н.С., Акопян В.П. Распространение хемолитотрофных бактерий для биотехнологии металлов в сульфидных месторождениях Армении	220

Краткие сообщения

Геворкян М.Л., Давтян М.А. Инактивация аргиназы иодацетатом	228
Григорян В.Г. Качество воды р. Раздан и его сезонная динамика	231
Никогосян В.Г., Багдасарян И.Б. Об использовании различных источников углерода и активность азотфиксации сообществ азотфиксирующих микроорганизмов	234
Никогосян В.Г., Багдасарян И.Б. Стимуляция азотфиксации диазотрофов бактериями, развивающимися в сообществе азотфиксирующих микроорганизмов	238
Варданян Н.С. Выщелачивание пирита серо- и железоокисляющими бактериями и их ассоциациями	242
Навасардян Л.А. Изменения в водорастворимой фракции белка голодавших дрожжей при восстановлении азотного питания	245

Обзоры

Агабалиян А.С. Прионы - новый, особый тип инфекционных безнуклеиновых агентов	248
---	-----

Библиография

Африкян Э.К. Г.Г. Шлегель. История микробиологии	253
--	-----

Хроника

Ваган Осипович Казарян (к 85-летию со дня рождения)	255
Левон Аршалуйсович Матинян (к 80-летию со дня рождения)	258

Реферат депонированной статьи

Папоян А.Р., Оганесян С.П., Давтян М.А. Пероксисомальные протеазы и пептид-гидролазы <i>Aspergillus niger</i> R-3	260
---	-----

CONTENTS

Original articles

Movsesyan V.M. Actual problems of interstate and international co-operation for water-supply in Armenia	183
Hovhannisyan R.H., Carstens R.P. Cell type specific splicing of a heterologous exon mediated by <i>cis</i> elements from fibroblast growth factor receptor 2 Pre-mRNA	191
Bouriako I.A., Astapovich N.I., Dubatouka S.I., Lobanok A.G., Antranikian G. Isolation and characterization of starch-utilizing lactic acid bacteria	198
Shamtsyan M.M., Afrikian E.G., Antranikian G. Continuous production of lactic acid	204
Shamtsyan M.M., Bochkova A.P., Pantyuk O., Antranikian G., Afrikian E.G. Influence of microbial growth regulator hydropterine on lactic acid fermentation	210
Abelyan V.H., Balayan A.M. Enzymatic synthesis of lactosucrose	214
Vardanyan N.S., Hakobyan V.P. Ecology of chemolithotrophic bacteria important for biotechnology of metals in sulfide ore deposits of Armenia	220

Short communications

Gevorkyan M.L., Davtyan M.A. The inactivation of arginase by iodoacetate	228
Grigoryan V.G. The quality of water of Hrazdan river and its seasonal dynamics	231
Nikoghosyan V.G., Bagdasaryan I.B. On nitrogen fixation and use of different sources of carbon by communities of the nitrogen-fixing microorganisms	234
Nikoghosyan V.G., Bagdasaryan I.B. Stimulation of nitrogen-fixation diazotrophs by bacteria growing in the communities of the nitrogen-fixing microbes	238
Vardanyan N.S. Pyrite oxidation by sulphur and iron oxidizing bacteria and their associations	242
Navasardyan L.A. Changes in water-soluble fraction of starved yeast protein during the restoration of nitrogen nutrition	245

Reviews

Agabalyan A.S. Prions - the new type infectious nucleic free agents	248
---	-----

Bibliography

Afrikian E.G. H.G. Schlegel. History of microbiology	253
--	-----

Chronics

Vahan Osipovich Kazaryan (to 85 th anniversary of birthday)	255
Levon Arshaluysovich Matinyan (to 80 th anniversary of birthday)	258

Abstract of deponated article

Papoyan A.R., Hovhannisyan S.P., Davtyan M.A. Peroxisomal proteases and peptidase-hydrolases of <i>Aspergillus niger</i> R-3	260
--	-----