

ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022

Сборник статей XIII Международной
конференции ученых-биологов

(г. Пермь, ПГНИУ, 24–25 октября 2022 г.)



Пермь 2023

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

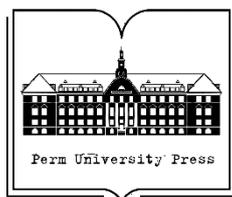
«Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ПФИЦ УрО РАН

ПО Всероссийские общества генетиков и селекционеров

МОО «Микробиологическое общество» ООО «Имбиоком»

СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022

*Сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов
(г. Пермь, ПГНИУ, 24–25 октября 2022 г.)*



Пермь 2023

УДК 55+57+58+59+613

ББК 28.0

С37

Симбиоз-Россия 2022 [Электронный ресурс] : сборник статей
С37 XIII Международной конференции ученых-биологов (г. Пермь, ПГНИУ, 24–25 октября 2022 г.) / гл. ред. А. А. Елькин ; отв. ред. М. Я. Лямин ; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2023. – 30,7 Мб ; 909 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/sborniki/Simbioz-Russia-2022.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-3960-1

Сборник включает статьи XIII Международной конференции ученых-биологов «Симбиоз-Россия 2022». Работы посвящены различным проблемам в области биологических наук: микробиологии и биотехнологии, ботаники и генетики, зоологии позвоночных и беспозвоночных, экофизиологии растений и экологии почв, фундаментальной и прикладной медицине. Статьи сборника охватывают широкий спектр научных проблем и представляют интерес для научных работников, преподавателей вузов, аспирантов и студентов.

УДК 55+57+58+59+613

ББК 28.0

*Издается по решению ученого совета биологического факультета
Пермского государственного национального исследовательского университета*

Главный редактор **А. А. Елькин**
Ответственный редактор **М. Я. Лямин**

Редакционная коллегия:
В. А. Черешнев, М. А. Бакланов, С. В. Боронникова,
О. З. Еремченко, В. Е. Ефимик

Рецензенты: научный сотрудник лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ ИЭРиЖ УрО РАН, канд. биол. наук **М. П. Золотарев**
зав. лабораторией экологической паразитологии Института систематики и экологии животных СО РАН, д-р биол. наук **В. Ю. Крюков**

ISBN 978-5-7944-3960-1

© ПГНИУ, 2023

ПРЕДСЕДАТЕЛЬ ОРГКОМИТЕТА

Красильников Д. Г., доктор политических наук, профессор, ректор ПГНИУ, Пермь, Россия

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ПРЕДСЕДАТЕЛЯ ОРГКОМИТЕТА

Елькин А. А., к.б.н., доцент, декан биологического факультета ПГНИУ, Пермь, Россия

ЧЛЕНЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСКОЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА

Бакланов М.А., к.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия

Боронникова С.В., д.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия

Еремченко О.З., д.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия

Ефимик В.Е., к.б.н., заведующий кафедрой ПГНИУ, Пермь, Россия

Жук В.В., к.б.н., доцент, заместитель декана биологического факультета ПГНИУ, Пермь, Россия

Ившина И.Б., академик РАН, зав. лаб. «ИЭГМ УрО РАН», профессор ПГНИУ, Пермь, Россия

Календарь Р.Н., к.б.н., профессор, вед науч. сотрудник лаборатории биоинформатики и системной биологии частного учреждения «National Laboratory Astana», (Назарбаев Университет Астана) г. Нур-Султан, Республика Казахстан

Лямин М.Я., к.б.н., доцент, заместитель декана биологического факультета ПГНИУ, Пермь, Россия

Старчич Эрьявец М., PhD, профессор Люблянского университета, Любляна, Словения

Устинова О.Ю., д.б.н., зам. директора Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, Пермь, Россия

Черешнев В.А., академик РАН, науч. руководитель ИИФ УрО РАН, зав. кафедрой ПГНИУ, Екатеринбург, Россия

Шумихин С.А., к.б.н., директор учебного ботанического сада ПГНИУ, Пермь, Россия

Щетко В.А., к.б.н., начальник НПЦБГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси», г.Минск, Республика Беларусь

ЧЛЕНЫ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА

Арисова А.К., аспирант, ПГНИУ, Пермь

Боталова К. И., заместитель декана биологического факультета ПГНИУ, Пермь

Ефимик Е.Г., к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь

Заморина С.А., д.б.н., в.н.с. «ИЭГМ УрО РАН», профессор ПГНИУ, Пермь

Кайгородов Р.В., к.б.н, доцент ПГНИУ

Крайнева Т.С., аспирант, ПГНИУ, Пермь, Россия

Крашенинников А.Б., к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь, Россия

Кузнецова М.В., д.м.н., в.н.с. «ИЭГМ УрО РАН», ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера, Пермь

Кузнецова Т.В., зам. декана по учебной работе ПГНИУ, Пермь

Максимов А.Ю., к.б.н., с.н.с. «ИЭГМ УрО РАН», доцент ПГНИУ, Пермь

Матвеева Г.К., к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь

Пахоруков И.В., аспирант ПГНИУ, Пермь

Сайдакова Е.В., д.б.н., зав. лаб. «ИЭГМ УрО РАН», доцент ПГНИУ, Пермь

Ушаков В.Ю., к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь

Храмцов П.В., к.б.н., н.с. ИЭГМ УрО РАН, доцент ПГНИУ, Пермь

Чертова М.А., к.б.н., зам. директора учебного ботанического сада ПГНИУ, Пермь

Шибанова Н.Л., к.б.н., доцент ПГНИУ, Пермь

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

doi:10.17072/simbioz-2022-5-11

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОПЕПТИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS*

Абубакирова А.М., Лутфуллина Г.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. Работа посвящена подбору условий культивирования для максимального накопления биомассы и продукции липопептидов с поверхностно-активными свойствами штаммов *Bacillus intestinalis* GM2 и *Bacillus subtilis* GM5, а также выделению и характеристике антимикробной активности липопептидов. При проведении экспериментов авторами установлены оптимальные условия культивирования штаммов-продуцентов, показана высокая антимикробная активность липопептидов в отношении грамположительных тест-культур.

Ключевые слова: *Bacillus subtilis*, *Bacillus intestinalis*, культивирование, выделение липопептидов, поверхностно-активные свойства.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF LIPOPEPTIDES FROM *BACILLUS*

Abubakirova A.M., Lutfullina G.F.

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. The study aimed to characterize and optimize growth conditions for enhancing the biomass and production of lipopeptides with surface-active properties by *Bacillus intestinalis* GM2 and *Bacillus subtilis* GM5 strains, as well as isolation and characterization of antimicrobial activity of lipopeptides. During the experiments, the authors established optimum growth conditions for lipopeptide-producing strains, and reported high antimicrobial activity of lipopeptides against gram-positive test cultures.

Keywords: *Bacillus subtilis*, *Bacillus intestinalis*, growth conditions, isolation of lipopeptides, surface-active properties.

Введение.

Бактерии рода *Bacillus* широко распространены в почве и водной среде. *Bacillus* способны выдерживать высокие и низкие температуры, широкий диапазон pH среды, продуцировать огромное количество разных вторичных метаболитов, образовывать споры, которые помогают бактериям переживать неблагоприятные условия среды.

Также *Bacillus* являются продуцентами разных групп антимикробных метаболитов и гидролитических ферментов, которые применяются в медицине, сельском хозяйстве и ветеринарии в качестве лекарственных препаратов, пробиотиков, биопрепаратов и инсектицидов [1].

Bacillus продуцируют широкий спектр пептидов, которые синтезируются нерибосомными пептид синтетазами. Эти пептиды различаются структурно и выполняют различные функции. Особое значение имеют три семейства циклических липопептидов бацилл, а именно сурфактины, итурины и фенгицины/плипастатины, которые обладают высокой антибактериальной активностью, в основном, против патогенных и условно-патогенных бактерий [2]. Механизм действия нерибосомных пептидов *Bacillus* заключается в пермеабиллизации и разрушении клеточной мембраны патогенных бактерий [3].

Бактерии рода *Bacillus* используются в промышленном производстве препаратов на основе циклических липопептидов. Штаммы дикого типа *Bacillus subtilis*, выделенные из различных источников, показали огромный биосинтетический потенциал этого вида. Антибактериальная и противогрибковая активность *B. subtilis* обусловлена продукцией активных вторичных метаболитов [3]. Таким образом, разнообразная структура и высокая антимикробная активность нерибосомных циклических липопептидов обуславливает интерес к их выделению и дальнейшему исследованию.

Целью работы являлась оптимизация условий культивирования, выделение и сравнительная характеристика антимикробных свойств липопептидов бактерий рода *Bacillus*.

Материалы и методы

В работе использовали ризосферные штаммы *Bacillus intestinalis* GM2 и *Bacillus subtilis* GM5 с фунгистатической активностью в отношении фитопатогенных микромицетов и антибактериальной активностью в отношении условно-патогенных бактерий [4]. В качестве бактериальных тест-культур использовали *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*.

Для исследования динамики роста штаммов бацилл GM2 и GM5 при различных условиях использовали среду soybean medium nutrition (SMN) следующего состава (г/л): маннит – 26.2, соевая мука – 21.9, NaNO₃ – 3.1, MnSO₄*4H₂O – 0.2 (pH 7.5). Для культивирования бактерий использовали среду LB (Lysogeny broth) (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0 и среду LA (г/л): триптон – 10, дрожжевой экстракт – 5, NaCl – 5, агар-агар (2 %) – 20. Бактерии культивировали в термостате-шейкере ИКА®KS 4000 при температуре 30 или 37°C при интенсивности качания 100 или 200 об/мин.

Выделение липопептидов с поверхностно активными свойствами из бесклеточного супернатанта *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 проводили по методу кислотного осаждения [5]. Исследование накопления липопептидов с поверхностно-активными свойствами в бесклеточном супернатанте *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 проводили по методу вытеснения нефти [6].

Для исследования антимикробной активности липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 бактериальные тест-культуры засеивали с помощью бактериологической петли штрихом на поверхность среды LA в чашке Петри. На расстоянии 1.5-2 см друг от друга в асептических условиях делали лунки диаметром 7 мм с помощью стерильного сверла. Полученные фракции липопептидов стерилизовали фильтрованием через мембранный фильтр (СAMEO®, GVS) с диаметром пор 0.22 мкм. В лунки вносили по 30 мкл стерильных растворов липопептидов в концентрации 3 мг/мл. В качестве контроля использовали раствор ДМСО: дистиллированная вода (2:1). Чашки с посевами инкубировали при 37°C в течение 24-48 часов. Антимикробную активность оценивали по диаметру зоны подавления роста тест-культур.

Антимикробную активность липопептидов в отношении культур *M. luteus* и *B. cereus* исследовали также на среде LB. В питательную среду LB вносили инокулят в концентрации

2%. В качестве контролей использовали среду LB и LB с добавлением раствора ДМСО:дистиллированная вода (2:1). В опытные образцы наряду с инокулятом тест-культур вносили растворы липопептидов *B. subtilis* GM5 или *B. intestinalis* GM2 в концентрации 0.1 мг/мл. Для исследования динамики роста бактериальной тест-культуры через каждые 2 ч проводили отбор культуры для измерения ОП₅₉₀ на спектрофотометре.

Результаты и обсуждение

Влияния температуры, pH и интенсивности качания на динамику роста бактерий.

Динамику роста бактерий и накопление липопептидов с поверхностно-активными свойствами исследовали на среде SMN. При культивировании штамма *B. intestinalis* GM2 при 30°C максимальное накопление биомассы наблюдали на 48 час, при 37°C – на 72 час. Оптическая плотность культур на эти часы роста была в 2 раза выше по сравнению с таковой на 24 и 48 час соответственно (Рисунок 1А). При культивировании штамма *B. subtilis* GM5 при 30°C и 37°C максимальное накопление биомассы наблюдали на 24 час (Рисунок 1Б). Дальнейший анализ динамики роста показывал снижение оптической плотности, что свидетельствует о переходе культуры штамма GM5 к стадии отмирания. Таким образом, установили, что максимальный прирост биомассы для *B. intestinalis* GM2 происходит при температуре 30°C на 48 час, а при температуре 37°C – на 72 час роста. Для *B. subtilis* GM5 оптимальной температурой для роста является 37°C, и максимальная оптическая плотность культуры достигается на 24 час культивирования.

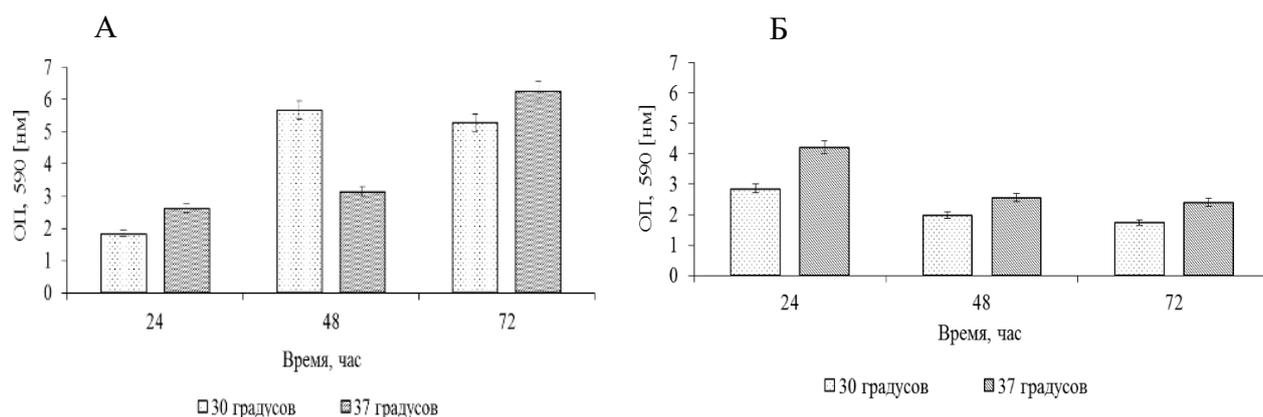


Рисунок 1 – Динамика роста клеток *B. intestinalis* GM2 (А) и *B. subtilis* GM5 (Б) в течение 72 час при температуре 30 и 37°C.

Оптимальным для роста *B. intestinalis* GM2 является диапазон pH от 5.0 до 8.0, для *B. subtilis* GM5 – от 6.0 до 8.0. В кислой среде наблюдали ингибирование роста культур обоих штаммов. Таким образом, для культивирования бактерий *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5 оптимальным является pH среды в диапазоне 6.0-7.0, при котором наблюдается максимальный прирост биомассы (Рисунок 2А).

Максимальное накопление биомассы наблюдали при интенсивности качания 200 об/мин, так как штаммы *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5 являются аэробными микроорганизмами. При уменьшении аэрации (100 об/мин) наблюдали замедленный рост обоих штаммов: оптическая плотность культур снижалась в 2 раза (Рисунок 2Б).

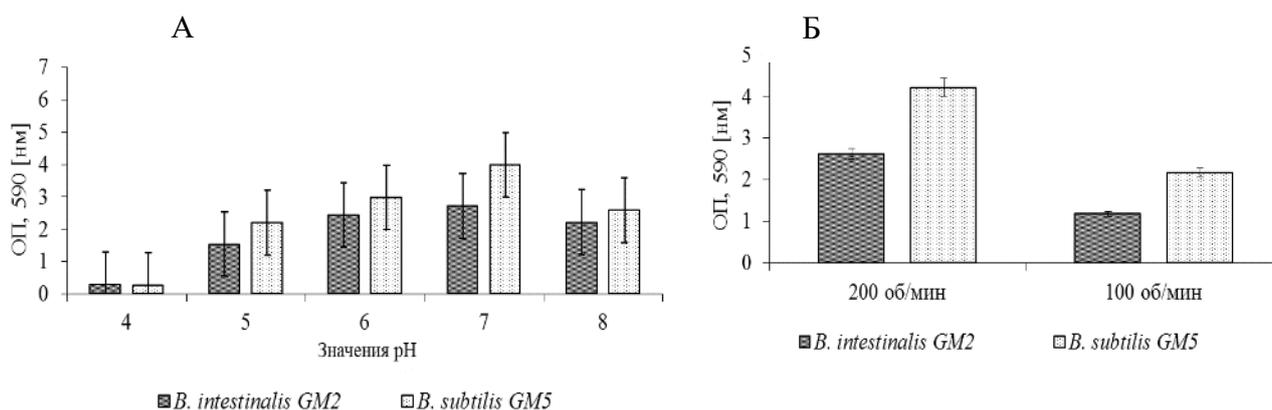


Рисунок 2 – Рост клеток *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5 на среде SMN с разными значениями pH (А) и аэрации (Б) на 24 час культивирования.

Метод вытеснения нефти. Исследование на вытеснение нефти проводили для определения способности липопептидов с поверхностно-активными свойствами образовывать прозрачную зону на поверхности нефти. Диаметр чистой зоны на поверхности нефти коррелирует с активностью биосурфактантов по вытеснению нефти [6].

Показано, что, ПАВ, синтезируемые в среду культивирования штаммом *B. subtilis* GM5, активнее вытесняли нефть по сравнению с ПАВ *B. intestinalis* GM2. На 24 час культивирования эффективность ПАВ, синтезируемых штаммом GM5, была в 3 раза выше относительно ПАВ штамма GM2. Таким образом, *B. subtilis* GM5 продуцируют ПАВ с более высокими биосурфактантными свойствами, чем *B. intestinalis* GM2 (Таблица 1).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика биосурфактантной активности ПАВ штаммов бацилл GM2 и GM5

Штамм	Диаметр вытесненной нефти (мм)		
	24 ч	48 ч	72 ч
<i>B. intestinalis</i> GM2	10±1.0	40±2.0	20±1.0
<i>B. subtilis</i> GM5	30±1.5	70±3.5	75±3.75

Выделение липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2.

Максимальный выход суммарной фракции липопептидов из бесклеточного супернатанта *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5, культивированных на среде SMN при 37°C, pH 7.0 и интенсивности качания 200 об/мин, составил 0.042 и 0.192 г/л сухого вещества соответственно.

Исследование антимикробной активности липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 с помощью метода лунок. Исследование антимикробной активности липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 проводили с помощью метода лунок. Липопептиды в концентрации 3 мг/мл ингибировали рост бактерий с грамположительным морфотипом: зона ингибирования *B. cereus* составила 16±0.75 и 15.5±0.77 мм соответственно, зона ингибирования *M. luteus* составила 21±1.0 и 15±0.75 мм соответственно. Показали, что липопептиды штамма *B. subtilis* GM5 эффективнее ингибировали рост *B. cereus* и *M. luteus* в сравнении с липопептидами *B. intestinalis* GM2. Антибактериальная активность липопептидов штаммов GM5 и GM2 отсутствовала в отношении других тест-культур с грамположительным (*E. faecalis*, *S. aureus*) и грамотрицательным (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. freundii* и *S. marcescens*) морфотипом (Рисунок 3, таблица 2). Избирательная активность липопептидов связана со

строением клеточной стенки, а именно наличием у грамотрицательных бактерий наружной мембраны.

Таблица 2 – Диаметр зоны подавления роста тест-культур (мм)

Тест-культуры	<i>Bacillus intestinalis</i> GM2	<i>Bacillus subtilis</i> GM5	Контроль
<i>Bacillus cereus</i>	15.5±0.77	16±0.75	7±0.35
<i>Enterococcus faecalis</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35
<i>Micrococcus luteus</i>	15±0.75	21±1.0	7±0.35
<i>Staphylococcus aureus</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35
<i>Escherichia coli</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35
<i>Citrobacter freundii</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35
<i>Serratia marcescens</i>	7±0.35	7±0.35	7±0.35

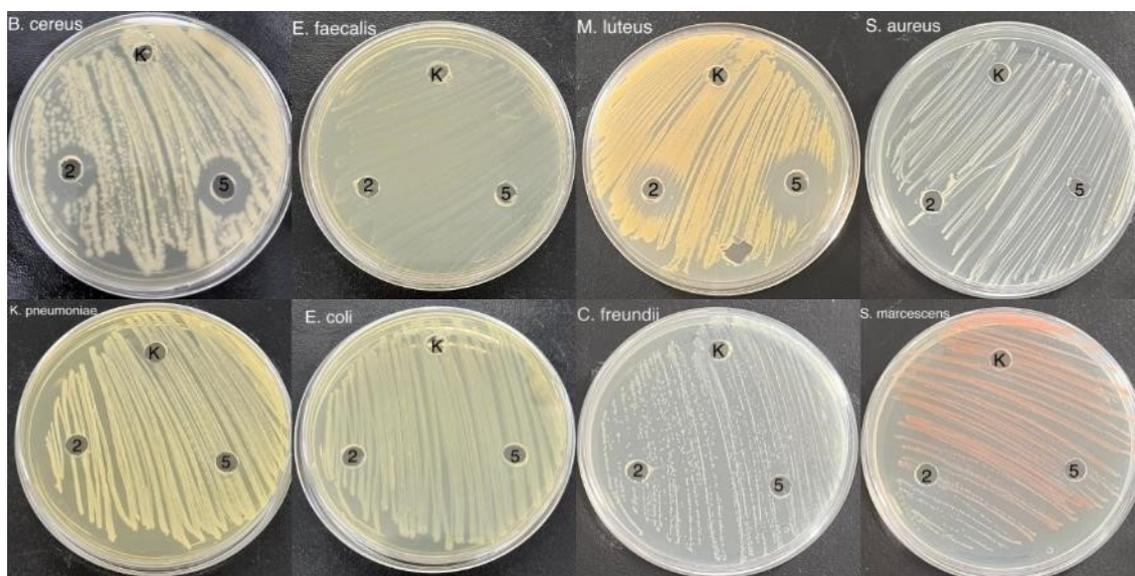


Рисунок 3 – Антимикробная активность фракции липопептидов *B. subtilis* GM5 (5) и *B. intestinalis* GM2 (2), контроль (ДМСО: дистиллированная вода (2:1)) (К).

В работе Torres с соавторами было показано, что антимикробная активность ПАВ штамма *subtilis subsp. subtilis* CBMDC3f наблюдалась по отношению к *B. cereus* MBC1 и *S. aureus* ATCC 29213 при концентрации липопептидного комплекса 1-2 мг/мл [7]. В работе Chen с соавторами показано, что штамм *B. subtilis* SK.DU4 синтезировал комплекс бактериоциноподобного пептида и итуриноподобного липопептида, которые обладали антимикробным действием в отношении *M. luteus* MTCC106 (зона ингибирования роста составила 12 мм для бактериоциноподобного пептида и 11 мм для итуриноподобного липопептида) [8]. В работе Sharma показано, что сурфактин *Bacillus amyloliquefaciens* ST34 проявлял антимикробную активность в отношении ряда как грамотрицательных (*E. coli* ATCC 13706, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *K. pneumoniae* ATCC 10031, *Serratia sp.* SM14, *Enterobacter sp.* E11), так и грамположительных (*B. cereus* ST18, *Enterococcus sp.* C513, *Micrococcus sp.* AQ4S2, *S. aureus* C2) бактерий. При концентрации сурфактина 0.26 мг/мл зона ингибирования роста бактерий составляла 13-17 мм [9].

Исследование антимикробной активности липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B. intestinalis* GM2 в жидкой культуре. Антибактериальную активность липопептидов *B. subtilis* GM5 и *B.*

intestinalis GM2 исследовали в отношении *M. luteus* и *B. cereus* в жидкой культуре. Фракция липопептидов *B. subtilis* GM5 в 4 раза эффективнее ингибировала рост *M. luteus* по сравнению с фракцией липопептидов *B. intestinalis* GM2. Сравнительный анализ динамики роста *M. luteus* показал, что в присутствии липопептидов рост тест-культуры сильнее ингибировался в экспоненциальной фазе роста и раннем стационаре, а в позднем стационаре ингибирующий эффект частично снижался. Так, на 24 час фракция липопептидов *B. intestinalis* GM2 ингибировала рост *M. luteus* на 38.6%, на 30 час – на 18.2% относительно контроля, что свидетельствует о частичной адаптации бактерий *M. luteus* к антимикробным липопептидам *B. intestinalis* GM2. Фракция липопептидов *B. subtilis* GM5 ингибировала рост *M. luteus* на 78.6% на 24 час и 72.7% на 30 час роста.

Фракция липопептидов *B. subtilis* GM5 в 2 раза эффективнее ингибирует рост *B. cereus* по сравнению с фракцией липопептидов *B. intestinalis* GM2. Анализ динамики роста *B. cereus* показал, что в присутствии липопептидов рост тест-культуры также сильнее ингибируется в экспоненциальной и стационарной фазе роста, а в позднем стационаре ингибирующий эффект снижается. Так, на 16 час культивирования липопептиды *B. intestinalis* GM2 ингибировали рост *B. cereus* на 69.4%, а липопептиды *B. subtilis* GM5 – на 83.3% относительно контроля.

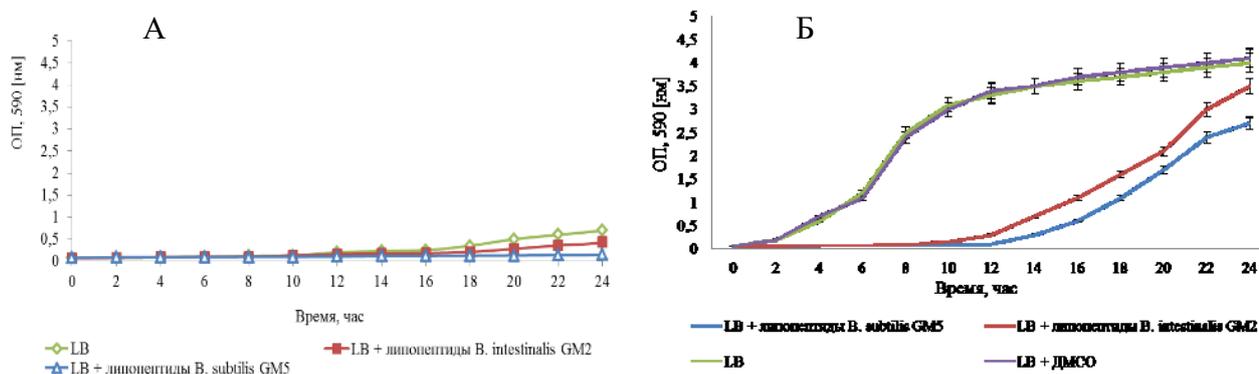


Рисунок 4 – Антибактериальная активность липопептидов *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5 в отношении *M. luteus* (А) и *B. cereus* (Б).

Таким образом, оптимальными условиями культивирования для максимального накопления биомассы и продукции липопептидов с поверхностно-активными свойствами штаммов GM2 и GM5 являются pH в диапазоне от 6.0 до 8.0 и интенсивность качания 200 об/мин. Для штамма *B. intestinalis* GM2 оптимальной температурой является 30°C, для *B. subtilis* GM5 – 37°C. Суммарные фракции липопептидов, выделенные из бесклеточного супернатанта штаммов *B. intestinalis* GM2 и *B. subtilis* GM5, проявили высокую антимикробную активность в отношении изолятов *M. luteus* (зона ингибирования составила 15±0.75 и 21±1.0 мм соответственно) и *B. cereus* (15.5±0.77 и 16±0.75 мм). В жидкой культуре фракция липопептидов *B. subtilis* GM5 в 4 раза эффективнее ингибировала рост *M. luteus* и в 2 раза рост *B. cereus* по сравнению с фракцией липопептидов *B. intestinalis* GM2.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-34-90130 и Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Библиографический список

1. Садунова А.В. Общая характеристика бактерий рода *Bacillus* // В.: Дальневосточный федеральный университет. – 2014. – 66 с.
2. Sumi C.D., Yan B. W., Yeo I.C., Nahm Y.T. Antimicrobial peptides of the genus *Bacillus*: a new era for antibiotics // *Can J Microbiol.* – 2015. – V.61. – №2. – P. 93-103.
3. Kovacs A.T. *Bacillus subtilis* // *Trends Microbiol.* – 2019. – V.27. – No.8. – P. 724-725.
4. Hadieva G.F., Lutfullin M.T., Pudova D.S., Akosah Y.A., Shagimardanova E.I., Mardanov A.M., Sharipova M.R. Data on the genome analysis of the probiotic strain *Bacillus subtilis* GM5 // *Data in Brief.* – 2019. – V.23. – P. 1-6.
5. Wei Y.H., Wang L.C., Chen W.C., Chen S.Y. Production and characterization of fengycin by indigenous *Bacillus subtilis* F29-3 originating from a potato farm // *Int J Mol Sci.* – 2010. – V.11. – P. 4526-4538.
6. Morikawa M., Hirata Y., Imanaka T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants // *Biochim Biophys Acta.* – 2000. – V.1488. – №3. – P. 211-218.
7. Torres M.J., Petroselli G., Daz M., Erra Balsells R., Audisio M.C. *Bacillus subtilis subsp. subtilis* CBMDC3f with antimicrobial activity against gram-positive foodborne pathogenic bacteria: UV-MALDI-TOF MS analysis of its bioactive compounds // *World. J. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V.31. – №6. – P. 929-940.
8. Chen Y., Liu S.A., Mou H., Ma Y., Li M., Hu X. Characterization of lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus licheniformis* MB01 from marine sediments // *Front. Microbiol.* – 2017. – V.8. – P. 871.
9. Sharma D., Ansari M.J., Gupta S., Al Ghamdi A., Pruthi P., Pruthi V. Structural characterization and antimicrobial activity of a biosurfactant obtained from *Bacillus pumilus* DSVP18 grown on potato peels // *Jundishapur. J. Microbiol.* – 2015. – V.8. – №9. – P. 1-8.

РАЗЛОЖЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ГАЛОФИЛЬНЫМИ БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА SALINISPHAERACEAE

Алеев В.С.^{1,2}, Пьянкова А.А.², Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² «Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН» – филиал ФГБУН ПФИЦ
УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Выделенные с территории Верхнекамского месторождения солей четыре штамма семейства *Salinisphaeraceae* продемонстрировали рост на глюкозе, галактозе, фруктозе, глицерине, рамнозе, аргинине, сорбите, твин 80 и додекане в качестве единственного источника углерода и энергии. У всех штаммов был выявлен *alkB*-ген, кодирующий алкан-1-монооксигеназу. Нуклеотидная последовательность гена *alkB* штамма SHV1 сходна с таковой у типового штамма *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T на уровне 94,32%.

Ключевые слова: Верхнекамское месторождение солей, *Salinisphaeraceae*, гены алкан-1-монооксигеназы, секвенирование, додекан, деструкция.

DEGRADATION OF ORGANIC COMPOUNDS BY HALOPHILIC BACTERIA OF THE *SALINISPHAERACEAE* FAMILY

Aleev V.S.^{1,2}, Pyankova A.A.², Plotnikova E.G.^{1,2}

¹Perm State University, Perm, Russia

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch RAS, Perm, Russia

Abstract. Four strains of the *Salinisphaeraceae* family isolated from the territory of the Verkhnekamsk salt deposit showed growth on glucose, galactose, fructose, glycerol, rhamnose, arginine, sorbitol, tween 80, and dodecane as the sole source of carbon and energy. All strains had the *alkB* gene encoding alkane-1-monooxygenase. The nucleotide sequence of the *alkB* gene of the SHV1 strain is similar to that of the type strain *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T at the level of 94.32%.

Keywords: Verkhnekamsk salt deposit, *Salinisphaeraceae*, alkane-1-monooxygenase genes, sequencing, dodecane, hydrocarbons destruction.

Семейство *Salinisphaeraceae* в настоящее время включает в себя три рода: *Salinisphaera*, *Abyssibacter* и *Salifodinibacter*. Представители данного семейства встречаются в морских экосистемах [1-7], а также в районах промышленной добычи солей [8-10]. Адаптивность к широкому диапазону солености и местообитаний на основе различных механизмов защиты от солевого стресса позволяет использовать галофильные микроорганизмы в биотехнологических целях [11]. Ввиду способности галофильного типового штамма вида

Salinisphaera hydrothermalis использовать додекан в качестве единственного источника углерода и энергии [2], представители данного семейства потенциально могут быть применены при биоремедиации засоленных почв и водоемов.

Ранее в ходе исследований четыре штамма микроорганизмов, выделенных из шахтных глинистых отложений Верхнекамского месторождения калийно-магниевого и натриевых солей (ВМКМС), были отнесены к семейству *Salinisphaeraceae* (класс *Gammaproteobacteria*, порядок *Nevskiales*) на основании анализа гена 16S рНК. Штаммы SWV1 и RV14 имели низкое сходство по гену 16S рНК с типовым штаммом *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T (95,94% и 96,63% соответственно) и представляют большой интерес. С целью описания штаммов SWV1 и RV14 в качестве новых таксонов проведена их эколого-физиологическая характеристика. Не была выявлена способность штаммов к росту на дизельном топливе, а также в геноме штаммов не был установлен ген алкан-1-монооксигеназы при использовании праймеров TS2S и Deg1RE [12, 13].

Цель исследования – изучение способности новых штаммов семейства *Salinisphaeraceae* осуществлять разложение различных органических субстратов, в том числе додекана, с целью описания их в качестве новых таксонов.

Культивирование микроорганизмов проводилось на агаризованной среде ASW [2] с добавлением 70 г/л NaCl. Способность разлагать органические субстраты исследовалась при культивировании в жидкой ASW при концентрации 70 г/л NaCl, а также с добавлением глюкозы, галактозы, фруктозы, глицерина, рамнозы, аргенина, сорбита, твин 80, сукцината в концентрации 0,2 М/л. Способность использовать додекан в качестве единственного источника углерода и энергии проверяли в жидкой ASW при концентрации 70 г/л NaCl с добавлением додекана в концентрации 1 г/л. Рост штаммов оценивали при определении оптической плотности культуры (ОП₆₀₀) на спектрофотометре UV-Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) на 7 день культивирования.

Исследование наличия генов деструкции алифатических углеводов (*alkB*-генов) проводилось с использованием праймеров *alkBwf* и *alkBwr* [14]. Для обнаружения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в горизонтальном 1% агарозном геле в буфере TBE x 1 (Трис – 10,8 г/л, борная кислота – 5,5 г/л, 0,5М ЭДТА – 4 мл, вода дистиллированная – 79,7 мл/л) при комнатной температуре, напряжении 5-15 В/см в течение 20 минут – 2,5 часов. Агарозные гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл) в течение 5-10 минут и фотографировали в УФ-свете с помощью системы гель-документирования BioDocAnalyze («Bio-Rad Laboratories», США). Для определения размеров фрагментов использовали маркер молекулярных масс ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия). Секвенирование *alkB*-генов осуществляли с применением набора реактивов Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit на автоматическом секвенаторе Genetic Analyser 3500XL («Applied Biosystems», США) в Лаборатории молекулярной биологии и генетики Естественного научного института при Пермском государственном национальном исследовательском университете. Филогенетический анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводился с использованием программ Sequence Scanner v. 2.0., MEGA X [<http://megasoftware.net>]. Поиск гомологичных последовательностей осуществлялся в базе данных GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева проводили в программе MEGA X. В ходе исследований все четыре штамма показали способность к росту на всех исследуемых субстратах (глюкоза, галактоза, фруктоза, глицерин, рамноза, аргинин, сорбит, твин 80), кроме сукцината. Деструкция

додекана всеми бактериальными штаммами также была подтверждена (таблица). У исследуемых штаммов был проведен скрининг на наличие *alk*-гена – ключевого гена деструкции алифатических углеводов. Длина исследуемого фрагмента *alkB*-гена составляла около 500 п.н. Данный ген также был выявлен у всех исследуемых штаммов (рисунок 1).

Таблица – Рост штаммов рода *Salinisphaera* на органических субстратах

Органические субстраты	<i>Salinisphaera hydrothermalis</i> EPR70 ^T *	SHV1	SHV6	SWV1	RV14
глюкоза	+	+	++	+	+
галактоза	+	+	+	+	+
фруктоза	+	++	+	+	+
глицерин	+	+	++	+	++
рамноза	+	+	+	+	+
аргинин	-	+++	+++	+++	+++
сорбит	+	++	++	+++	++
твин 80	+	+++	+	+++	+
сукцинат	+	-	-	-	-
додекан	+	+++	++	++	++

Примечание. (+) – ОП₆₀₀ = 0,2-0,3; (++) – ОП₆₀₀ = 0,4-0,7; (+++) – ОП₆₀₀ = 0,8-1,0; (-) – изменения ОП₆₀₀ не наблюдалось. *Данные для *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T отражают наличие или отсутствие способности к деструкции данных соединений [2].

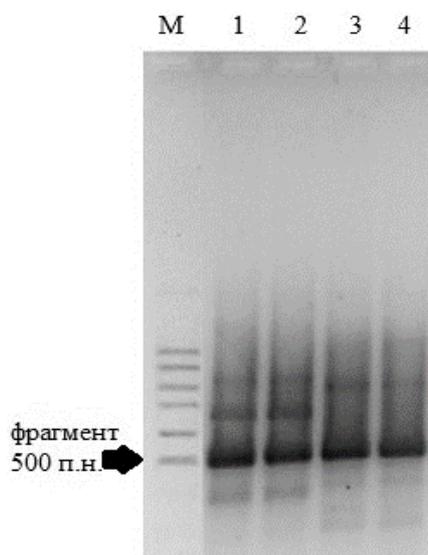


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации гена *alkB*, кодирующего алкан-1-монооксигеназу. М – ДНК 100+ bp DNA Ladder («Евроген», Россия), 1 – SHV1, 2 – SHV6, 3 – RV14, 4 – SWV1.

На настоящий момент проведены секвенирование и анализ нуклеотидной последовательности гена алкан-1-монооксигеназы у штамма SHV1, который продемонстрировал наилучшую способность к деструкции додекана (таблица). Сходство с *alkB*-геном типового штамма *Salinisphaera hydrothermalis* EPR70^T составило 94,32%. Было

построено филогенетическое дерево *alkB*-генов штамма SHV1 с использованием метода neighbor-joining (рисунок 2).

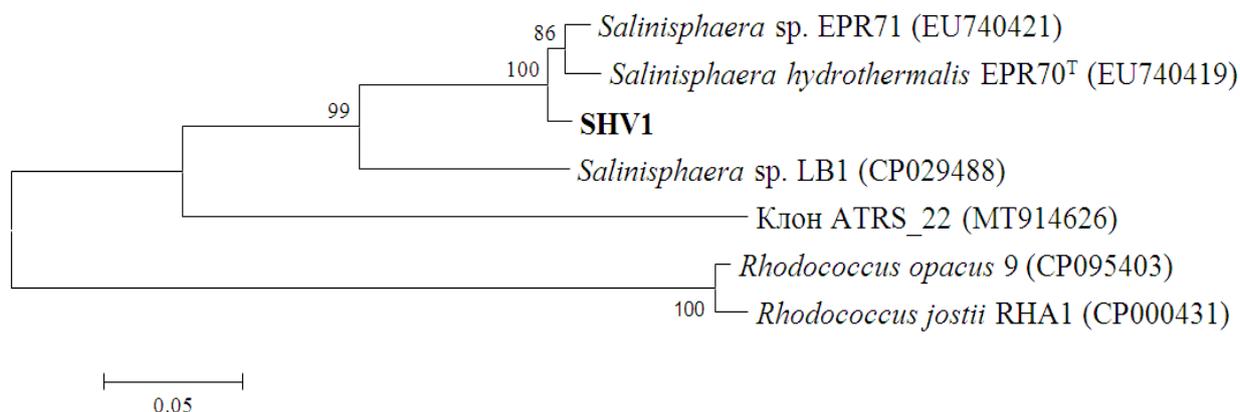


Рисунок 2 – Положение *alkB*-гена исследуемого штамма SHV1 на филогенетическом дереве. В скобках указаны номера в GenBank. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap» анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Эволюционные расстояния рассчитаны с использованием метода «Jukes-Cantor». Масштаб соответствует 5 нуклеотидным заменам на каждые 100 нуклеотидов.

В результате исследований была выявлена способность использования галофильными бактериями семейства *Salinisphaeraceae* (штаммами SHV1, SHV6, SWV1, RV14) в качестве единственного источника углерода и энергии таких субстратов, как глюкоза, галактоза, фруктоза, глицерин, рамноза, аргинин, сорбит, твин 80. У всех исследуемых штаммов, в том числе потенциально представляющих новые таксоны (штаммов SWV1 и RV14), обнаружены гены алкан-1-монооксигеназы и выявлена способность к деструкции данными штаммами додекана (в присутствии 70 г/л NaCl). Дальнейшее исследование штаммов будет продолжено.

Работа выполнена в рамках государственного задания АААА-А19-119112290008-4.

Библиографический список

1. *Salinisphaera shabanensis* gen. nov., sp. nov., a novel, moderately halophilic bacterium from the brine-seawater interface of the Shaban deep, red sea / A. Antunes [et al.] // *Extremophiles*. – 2003. – V. 7. – P. 29-34.
2. *Salinisphaera hydrothermalis* sp. nov., a mesophilic, halotolerant, facultatively autotrophic, thiosulfate-oxidizing gammaproteobacterium from deep-sea hydrothermal vents, and emended description of the genus *Salinisphaera* / M. Crespo-Medina [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2009. – V. 59. – P. 1497-1503.
3. *Salinisphaera dokdonensis* sp. nov., isolated from surface seawater / G.D. Bae [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2010 – V. 60. – P. 680-685.
4. *Salinisphaera orenii* sp. nov., isolated from a solar saltern / S.J. Park [et al.] // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2012. – V. 62. – P. 1877-1883.
5. *Salinisphaera japonica* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from the surface of a deep-sea fish, malacocottus gibber, and emended description of the genus *Salinisphaera* / Y.

- Shimane [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2013. – V. 63. – P. 2180-2185.
6. *Salinisphaera aquimarina* sp. nov., isolated from seawater / L. Tang [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 68. – P. 1130-1134.
 7. *Abyssibacter profundi* gen. nov., sp. nov., a marine bacterium isolated from seawater of the Mariana Trench / S. Zhou [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2018. – V. 68. – P. 3424-3429.
 8. Kelly S.A., Megaw J., Gilmore B.F. Draft genome sequence of *Salinisphaera* sp. strain KSM-18, an obligately halophilic bacterium isolated from a Triassic salt mine // Cameron Thrash J. Microbiol. Resour. Announc. – 2018. – V. 7. – P. 1-2.
 9. *Salinisphaera halophila* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from brine of a salt well / Y.J Zhang [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2012 – V. 62. – P. 2174-2179.
 10. *Salifodinibacter halophilus* gen. nov., sp. nov., a halophilic gammaproteobacterium in the family *Salinisphaeraceae* isolated from a salt mine in the Colombian Andes / M. Paula Parada-Pinilla [et al.] // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2020. – V. 70. – P. 1-11.
 11. Kunte H., Lentzen G., Galinski E. Industrial production of the cell protectant ectoine: protection mechanisms, processes, and products / H. Kunte, // Curr. Biotechnol. – 2014. – V. 3. – P. 10-25.
 12. Molecular screening for alkane hydroxylase genes in Gram-negative and Gram-positive strains / T.H.M. Smits [et al.] // Environmental Microbiology. – 1999. – V. 1(4). – P. 307-317.
 13. Алеев В.С., Плотникова Е.Г., Пьянкова А.А. Новые бактерии семейства *Salinisphaeraceae* из соляной шахты Верхнекамского месторождения // Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования, Пермь, 2021, С. 7-10.
 14. Low-abundance *Dietzia* inhabiting a water-flooding oil reservoir and the application potential for oil recovery / P. Gao [et al.] // BioMed Research International. – 2019. – V. 2019. – P. 1-11.

МОДИФИКАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА СИНТЕТИЧЕСКИМИ И БИОПОЛИМЕРАМИ

Баташева С.Н., Крючкова М.А.

*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский Федеральный университет,
Казань, Россия*

Аннотация. Проведена успешная модификация химически синтезированных серебряных наночастиц, стабилизированных цитратом, рядом синтетических полимеров и биополимеров.

Ключевые слова: наночастицы серебра, ИК-спектр, гиперспектральная микроскопия, темнопольная микроскопия.

MODIFICATION OF SILVER NANOPARTICLES WITH SYNTHETIC AND BIOPOLYMERS

S.N. Batasheva, M.A. Kryuchkova

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Successful modification of chemically synthesized citrate-stabilized silver nanoparticles with a range of synthetic polymers and biopolymers was performed.

Keywords: silver nanoparticles, IR spectrum, hyperspectral microscopy, dark-field microscopy.

Была проведена модификация химически синтезированных серебряных наночастиц, стабилизированных цитратом, рядом синтетических полимеров и биополимеров. Для работы химические серебряные частицы получали цитратным методом [1, 2]. Водный раствор (90 мг, 500 мл) AgNO_3 нагревали до 100°C на магнитной мешалке, при перемешивании добавляли 10 мл 1% цитрата натрия. Цвет раствора менялся спустя 10 минут после добавления цитрата натрия. У синтезированных частиц охарактеризовали дзета-потенциал и диаметр. Значение гидродинамического диаметра и дзета-потенциал наночастиц измеряли в воде при 25°C , с использованием анализатора Malvern Zetasizer Nano ZS. Среднее значение гидродинамического диаметра синтезированных серебряных наночастиц составило $59,35 \pm 0,41$ нм, заряд поверхности частиц отрицательный, $-33,1 \pm 0,5$ мВ.

Для модификации были использованы следующие полиэлектролиты (в конечной концентрации): полиэтиленимин (PEI) (3,3 %), полиаллиламин гидрохлорид (ПАН) (33 мг/мл), метилцеллюлоза (0,33%), полиэтиленгликоль 1500 (PEG) (33 мг/мл), декстрин (33 мг/мл), полистиросульфонат натрия (PSS) (33 мг/мл), полидиаллилдиметиламмоний хлорид (PDADMAC) (3,3 %), полиакрилат натрия (ПАА) (33 мг/мл), ДНК из эритроцитов цыпленка (50 мкг/мл, часть образцов готовилась в присутствии MgCl_2 150 mM), РНК дрожжей (50 мкг/мл, часть образцов готовилась в присутствии MgCl_2 150 mM), пектин (16,7 мг/мл), хитозан (6,7 мг/мл). После модификации суспензии наночастиц центрифугировали (13000 об/мин, 15

мин (Heraeus Pico 17, Thermo Fisher Scientific, США)) и отмывали осадок 3 раза dH₂O. Полученные модифицированные наночастицы характеризовали с помощью ИК-спектроскопии с преобразованием Фурье (ИК-фурье-спектрометр ФТ-801, оснащенный приставкой НПВО, Симекс, Россия), темнопольной гиперспектральной микроскопии (микроскоп Olympus BX51 (Япония), оснащенный конденсором темного поля CytoViva® (CytoViva, США)) и динамического светорассеяния (Zetasizer Nano ZS, Malvern, Великобритания). Успешная модификация наночастиц проявлялась в изменениях размеров и дзета-потенциалов частиц (Таблица 1), а также гиперспектрального профиля наночастиц. Так, после обработки всем полиэлектролитами, кроме ДНК и РНК, наблюдалось увеличение размера наночастиц.

Таблица 1 – Гидродинамический диаметр и зета-потенциал модифицированных серебряных наночастиц

	Тип наночастиц	Гидродинамический диаметр, нм	Индекс полидисперсности	Z-потенциал, mV
1	AgNP	40,25 ± 2,956	0,639 ± 0,130	-50,7 ± 0,819
2	AgNP-полидофамин	961,5 ± 40,29	0,271 ± 0,057	-7,12 ± 0,061
3	AgNP-пектин	188,9 ± 1,890	0,206 ± 0,007	-32,4 ± 0,643
4	AgNP-декстрин	200,4 ± 3,024	0,523 ± 0,047	-13,8 ± 0,451
5	AgNP-метилцеллюлоза	99,61 ± 6,098	0,467 ± 0,016	-10,6 ± 0,635
6	AgNP-хитозан	113,5 ± 2,381	0,425 ± 0,009	33,0 ± 0,462
7	AgNP-ДНК	40,24 ± 0,5693	0,492 ± 0,031	-50,1 ± 2,21
8	AgNP-Mg-ДНК	171,5 ± 3,143	0,401 ± 0,007	-34,5 ± 0,1
9	AgNP-РНК	43,81 ± 1,010	0,765 ± 0,051	-55,6 ± 0,551
10	AgNP-Mg-РНК	200,7 ± 3,292	0,479 ± 0,007	-14,6 ± 0,404
11	AgNP-ПАН	76,70 ± 0,9644	0,513 ± 0,005	46,4 ± 0,416
12	AgNP-PEG	1120 ± 45,28	0,306 ± 0,031	7,64 ± 0,324
13	AgNP-PSS	220,6 ± 6,493	0,516 ± 0,041	-24,2 ± 0,361
14	AgNP-PAA	94,28 ± 1,261	0,359 ± 0,008	-41,5 ± 0,569
15	AgNP-PEI	85,78 ± 0,1562	0,286 ± 0,022	52,0 ± 0,525
16	AgNP-PDADMAC	59,42 ± 0,5143	0,441 ± 0,025	40,1 ± 0,808

В случае ДНК и РНК не наблюдалось изменения размера и дзета-потенциала частиц, что может указывать на незначительное взаимодействие данных биополимеров с наночастицами в отсутствие ионов Mg²⁺. В присутствии ионов магния происходила успешная модификация наночастиц нуклеиновыми кислотами, вероятно, благодаря образованию солевых мостиков между карбоксильными группами цитрата и фосфатными группами ДНК и РНК (Рисунок 1).

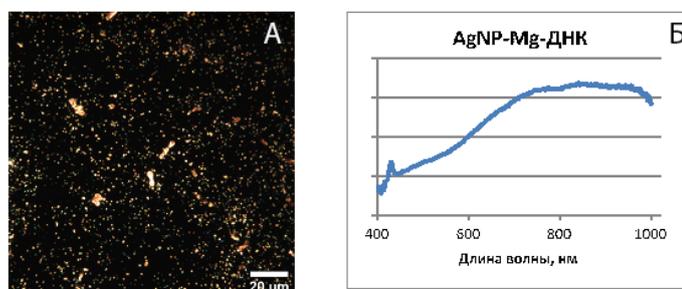


Рисунок 1 – Визуализация наночастиц серебра с помощью темнопольной микроскопии (А), гиперспектральный профиль наночастиц серебра, модифицированных ДНК цыпленка с добавлением ионов магния.

После модификации полиэлектролитами наблюдались изменения в ИК-спектре серебряных наночастиц с появлением полос, характерных для модифицирующих полиэлектролитов (Рисунок 2).

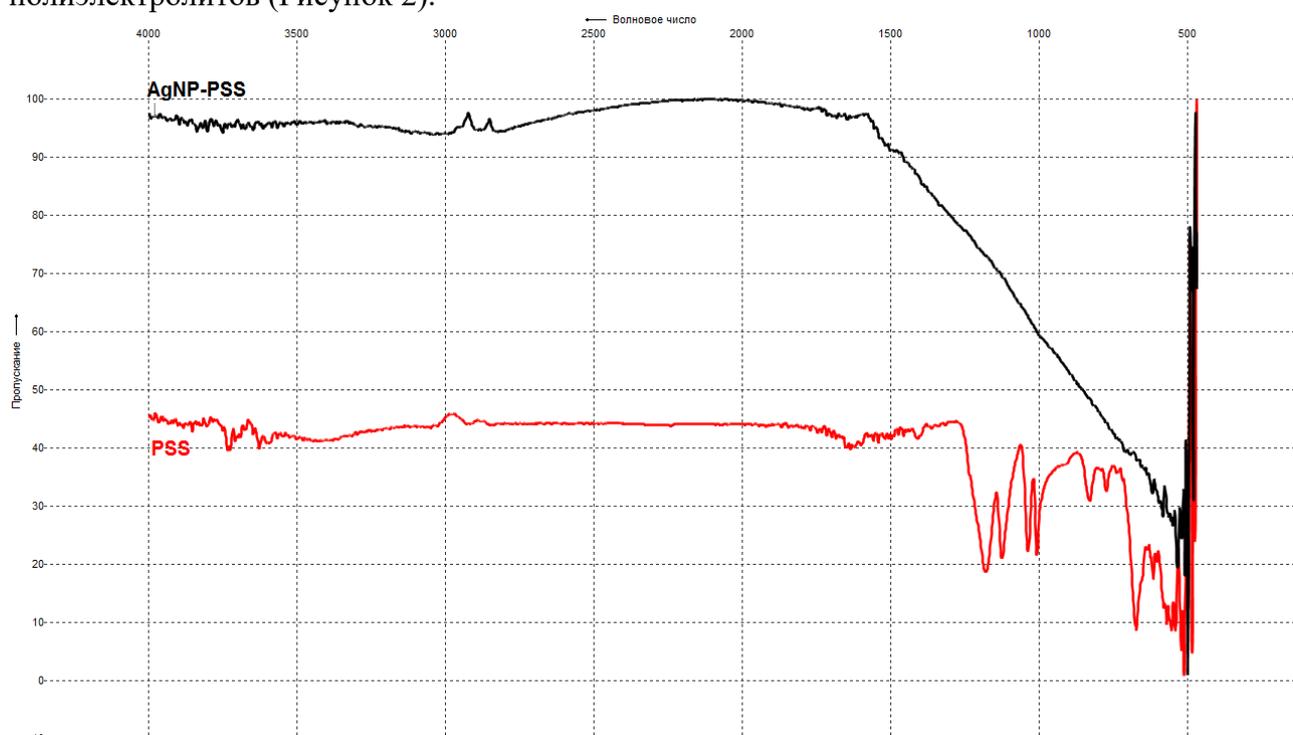


Рисунок 2 – Типичный ИК-спектр наночастиц серебра, модифицированных PSS, и исходный ИК-спектр полимера.

В ИК-спектре частиц, обработанных РНК, не наблюдалось никаких изменений по сравнению со спектром исходных частиц, что подтверждает неспособность РНК модифицировать цитрат-стабилизированные серебряные наночастицы в отсутствие многовалентных катионов. После модификации наночастиц некоторыми полиэлектролитами (хитозан, полидофамин, полистирол сульфат) происходила значительная агломерация наночастиц, что было заметно на темнопольных изображениях. Наиболее стабильные суспензии получались при обработке наночастиц полисахаридами (пектином и декстрином). Таким образом, изменение гиперспектрального профиля наночастиц серебра показало успешную модификацию исследуемыми полимерами и полисахаридами.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда номер проекта 21-74-10034.

Библиографический список

1. Konnova S. A. et al. Silver nanoparticle-coated “cyborg” microorganisms: rapid assembly of polymer-stabilised nanoparticles on microbial cells //RSC Advances. – 2015. – Т. 5. – №. 18. – С. 13530-13537.
2. Rozhin A. et al. Biogenic silver nanoparticles: Synthesis and application as antibacterial and antifungal agents //Micromachines. – 2021. – Т. 12. – №. 12. – С. 1480.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ АДЬЮВАНТОВ НА ОСНОВЕ БЕТА-ГЛЮКАНОВ ДРОЖЖЕЙ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Волосникова Е.А., Есина Т.И., Сысоева Г.М., Каплина О.Н., Даниленко Е.Д.

Институт медицинской биотехнологии Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Новосибирская область, Бердск, Россия

Аннотация. Разработан способ получения β -глюканов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Адьювантные свойства полученного препарата β -глюканов исследовали на модели иммунной реакции, индуцированной введением антигена овальбумина. Методом иммуноферментного анализа продемонстрировано усиление продукции антител на антиген у мышей опытных групп под действием β -глюканов по сравнению с группой положительного контроля.

Ключевые слова: бета-глюкан, адьювант, иммуногенность, овальбумин.

OBTAINING NEW VACCINE ADJUVANTS BASED ON BETA-GLUCANS FROM YEAST AND THEIR BIOLOGICAL PROPERTIES

Volosnikova E.A., Esina T.I., Sysoeva G.M., Kaplina O. N., Danilenko E.D.

Institute of Medical Biotechnology of Federal Budgetary Research Institution “State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing (IMBT, FBRI SRC VB “Vector”, Rospotrebnadzor), Berdsk, Novosibirsk region, Russia

Abstract. A method for obtaining β -glucans from the cell walls of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast has been developed. The adjuvant properties of the resulting beta-glucan preparation were studied in the model of the immune response induced by antigen (ovalbumin) administration. It was shown that the production of antibodies to antigen in mice of the experimental groups increased under the influence of β -glucans compared with the positive control group.

Keywords: beta-glucan, adjuvant, immunogenicity, ovalbumin.

Необходимость использования в составе вакцин веществ с адьювантной активностью обусловлена невысокой иммуногенностью многих современных вакцин, а также необходимостью повышения иммуногенности вакцин при однократной вакцинации [1].

Тестирование многих полисахаридов, таких как α -глюканы (модифицированный декстран), β -глюканы (дрожжевые полисахариды и лентинан), β -фруктаны (инулин), маннан

и хитозан показало наличие у них адъювантной активности. Это неудивительно, учитывая тот факт, что многие полисахариды играют важную роль в передаче сигнала и активации клеток иммунной системы [2, 3]. Бета-глюканы совместимы с живыми векторными вакцинами, относительно безопасны, а их производство не отличается трудоемкостью. Кроме того, β -глюканы характеризуются минимальным риском образования токсических метаболитов или накопления в тканях организма. Благодаря этим преимуществам их применение в сочетании с любым типом вакцины, в том числе, векторными или ДНК-вакцинами, может быть целесообразным и перспективным [4].

Нами была разработана методика и получены образцы β -глюканов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-448. В качестве сырья для выделения β -глюканов использовался клеточный дебрис, полученный при выделении двуспиральной РНК на этапе разрушения биомассы. Дебрис растворяли в буфере, содержащем 1 %-ный раствор SDS (додецилсульфат натрия) и 0,4 М хлорида натрия. От балластных белков освобождались путем обработки дебриса протеолитическим ферментным комплексом «Протосутилиин ГЗх» (производство ПО «СИББИОФАРМ» г. Бердск), в количестве 5 мг комплекса на 10 г клеточного дебриса. Продолжительность ферментативного гидролиза составляла 6 ч при 50 °С. После этого полупродукт шестикратно отмывали раствором 1 %-ного SDS, затем трехкратно – деионизованной водой и центрифугировали (10000 об/мин, 20 мин, 30 °С). Полученный осадок, содержащий целевые β -глюканы, растворяли в деионизованной воде (30 °С) и подвергали воздействию ультразвука (частота 24 кГц/с в течение 15 минут, циклами по 5 мин с интервалом в 2 мин для охлаждения) на ледяной бане. Полученную суспензию титровали 1 М гидроксидом натрия до значения рН 10,0 и подвергали термической обработке в термостате при 60 °С в течении 45 мин. Полупродукт центрифугировали (10000 об/мин, 20 мин), осадок отмывали десятикратно деионизованной водой с последующим центрифугированием (10000 об/мин, 20 мин). Полученный осадок растворяли в деионизованной воде и сушили при 50 °С в течении 12 часов. Отработанная схема позволяет получать около 800 мг препарата β -глюканов из 5 г клеточного дебриса. Содержание основного продукта β -глюканов в полученном препарате составляет 80 – 88%.

На основании литературных данных для скрининга биологической (адъювантной) активности препаратов β -глюканов была выбрана модель развития специфической иммунной реакции, вызванной введением антигена альбумина куриного яйца – овалбумина (ОВА). Данная модель была использована авторами работы [5] для оценки адъювантных свойств β -глюканов.

Исследование проведено на 24 самках мышей линии BALB/c массой 18-20 г, возрастом 2 месяца, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская обл.). Эксперименты были одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждены протоколом Биоэтической комиссии №5 от 01.10.2020).

Адъювантные свойства препаратов β -глюканов анализировали на модели иммунной реакции, индуцированной введением антигена ОВА, в соответствии с описанным [6]. Животных рандомизировали на группы по 6 мышей в каждой: 1-ая группа – физиологический раствор; 2-ая группа – ОВА 10 мкг/мышь в 0,2 мл; 3-я группа – ОВА 10 мкг/мышь + β -глюкан, 1 мг/мышь; 4-ая группа – ОВА 10 мкг/мышь + β -глюкан, 2 мг/мышь.

Иммунизацию мышей ОВА (положительный контроль) проводили внутримышечно, в дозе 10 мкг/мышь двукратно с интервалом 14 дней, в объеме 0,2 мл. Перед введением препаратов мышам опытных групп препарат β -глюкана смешивали с раствором овалбумина

в соотношении 1:1 по объему и вводили внутримышечно в объеме 0,2 мл на мышь. Доза ОВА составляла 10 мкг/мышь (500 мкг/кг), дозы β -глюкана 1 или 2 мкг/мышь (50 или 100 мг/кг). Отрицательным контролем являлись животные, которым вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Через 7 дней после второй иммунизации животных подвергали эвтаназии мгновенной дислокацией шейных позвонков, забирали кровь на анализ. В образцах сыворотки крови определяли титры антител к овальбумину методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Оптическую плотность растворов в лунках планшета измеряли при длине волны 450 нм с использованием фотометра для микропланшет Multiskan Ascent. В сыворотках иммунизированных животных по полученным результатам оптической плотности определяли титры антител

Установлено, что совместное введение мышам ОВА с препаратами β -глюканов приводило к более интенсивной продукции антител у мышей опытных групп по сравнению с группой положительного контроля (мышь, которым вводили только ОВА).

Таблица – Влияние β -глюкана на титры специфических антител у мышей линии BALB/c иммунизированных ОВА

Группа	Доза ОВА, мкг/мышь	Доза β -глюкана, мг/мышь	Титры антител
Контроль 1, физиологический раствор	-	-	1: 220
Контроль 2, ОВА	10	-	1: 54 000
Опыт 1 (ОВА + β -глюкан, 1 мг/мышь)	10	1	1: 3000000
Опыт 2 (ОВА + β -глюкан, 2 мг/мышь)	10	2	1: 7000000

Таким образом, на экспериментальной модели специфической иммунной реакции показано, что сочетанное применение препарата β -глюкана с антигеном овальбумином приводит к повышению синтеза специфических антител в 6-12 раз. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности продолжения работ по исследованию адьювантных свойств препаратов β -глюканов.

Работа выполнена в рамках государственного задания, Тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адьювантов».

Библиографический список

1. Criscuolo E., Caputo V., Diotti R.A., Sautto G.A., Kirchenbaum G.A., Clementi, N. Alternative methods of vaccine delivery: an overview of edible and intradermal vaccines // Journal of Immunology Research. – 2019. – V.2019.
2. Petrovsky N. Comparative safety of vaccine adjuvants: a summary of current evidence and future needs // Drug safety. –2015. – V. 38. – № 11. – P. 1059-1074. doi: 10.1007/s40264-015-0350-4

3. Fesel P.H., Zuccaro A. β -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants // *Fungal Genetics and Biology*. – 2016. – V.90. – P.53-60.
4. Курашова С.С., Дзагурова Т.К., Ишмухаметов А.А., Егорова М.С., Баловнева М.В., Соцкова С.Е., Ткаченко Е.А. Адъюванты на основе углеводов для производства вакцин // *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. – 2018. – Т. 18. – № 2. – С. 81-91.
5. Jin Y., Li P., Wang F. β -glucans as potential immunoadjuvants: A review on the adjuvanticity, structure-activity relationship and receptor recognition properties // *Vaccine*. – 2018. – V. 36. – P. 5235–5244.
6. Zhang W., Oda T., Yu Q., Jin J.O. Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* Has Powerful Immune-Modulatory Effects Compared to Three Other Fucoidans // *Mar. Drugs*. – 2015. – V. 13, – № 3 – P. 1084-1104.

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

Гапонова И. И., Щетко В. А., Романова Л. В.

Институт микробиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь

Аннотация. Антимикробная активность штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г обусловлена, выделением в среду культивирования органических кислот. Штамм обладает антибиотикорезистентностью к некоторым антибиотикам аминогликозидной и цефалоспориновой группы, проявляет чувствительность к пенициллиновой, тетрациклиновой, рифампициновой группе антибиотиков, макролидам, а также к хлорамфениколу.

Ключевые слова: молочнокислые бактерии, активность, антибиотикорезистентность.

SOME PROPERTIES OF LACTIC ACID BACTERIA *LACTOBACILLUS HELVETICUS*

Haponava I. I., Schatko V. A., Ramanava L. V.

Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Abstract. The antimicrobial activity of the strain of lactic acid bacteria *Lactobacillus helveticus* BIM В-461 G is due to the release of organic acids into the cultivation medium. The strain has antibiotic resistance to some antibiotics of the aminoglycoside and cephalosporin groups and exhibits sensitivity to penicillin, tetracycline and rifampicin antibiotic groups, macrolides as well as to chloramphenicol.

Keywords: lactic acid bacteria, activity, antibiotic resistance.

Введение. Одними из самых перспективных бактерий – объектов биотехнологии являются микроорганизмы рода *Lactobacillus*, которые широко используют как естественную конкурентную микробиоту. Молочнокислые микроорганизмы содержатся в молоке, мясе, ферментированных овощах и напитках, придавая продуктам определенные органолептические свойства – вкус и аромат пищи. Они производят органические вещества, которые определяют их антагонистические свойства, используемые в медицине, ветеринарии, животноводстве, пищевой промышленности и др. [1, 2].

Способность лактобактерий к ферментации сахаров с последующим снижением рН из-за синтеза молочной и других органических кислот, является важным фактором подавления роста нежелательных микроорганизмов. Низкий рН делает органические кислоты жирорастворимыми, что позволяет им преодолевать клеточную мембрану и достигать цитоплазмы патогенов [3].

В современной медицине антибиотики являются основным средством защиты против бактериальных инфекций. Однако бактерии могут обладать устойчивостью к действию

антибиотиков, которая может быть естественной или приобретенной с помощью генетических механизмов, таких как горизонтальный перенос генов плазмидами или транспозонами [4].

Приобретенная резистентность представляет собой угрозу, так как способствует передаче генов устойчивости другим микроорганизмам. Крайне важно проводить мониторинг антибиотикоустойчивости бактериальных штаммов, используемых для производства лечебно-профилактических средств продуктов питания для человека и животных [5].

Изучение антагонистической активности и спектра антибиотикорезистентности бактерий позволяет грамотно их использовать в составе препаратов различного назначения.

Целью нашей работы было изучение антагонистической активности и антибиотикорезистентности молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г.

Материалы и методы. Объект исследования – штамм молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г.

Для изучения антагонистической активности были выбраны тест-штаммы различных таксономических групп из Коллекции микроорганизмов Института микробиологии: *Escherichia coli* БИМ В-238, *Bacillus cereus* БИМ В-108, *Staphylococcus sp.* БИМ В-1618, *Lactobacillus paracasei* БИМ В-1701, *Lactobacillus curvatus* БИМ В-1651 Г, *Pseudomonas aeruginosa* БИМ В-808 Г, *Lactobacillus fermentum* БИМ В-1009, *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, *Lactococcus lactis* БИМ В-132, *Lactobacillus delbrueckii* БИМ В-191, *Lactobacillus plantarum* БИМ В-1008.

Работы с патогенными штаммами *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, *E. coli*, проводили на базе РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси».

Для культивирования тест-штаммов использовали питательные среды MRS и МПА, для *L. helveticus* – среда на основе капустного отвара [6].

Антагонистическую активность определяли методом лунок [7]. Использовали 24 часовую клеточную культуральную жидкость молочнокислых бактерий *L. helveticus*, а также нейтрализованную до рН 7,0 бесклеточную жидкость. Чашки инкубировали в термостате при температуре, наиболее благоприятной для роста тест-штаммов. Через 24 часа измеряли зоны задержки роста, образовавшиеся вокруг лунок.

Клетки отделяли центрифугированием при 6000g×4°C×20мин. Полученный супернатант стерилизовали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм.

Исследование антибиотикорезистентности проводили путем культивирования штамма *L. helveticus* в капустной питательной среде [6] с добавлением соответствующего антибиотика в различных концентрациях при температуре 30 °С в течение 24 часов.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. В процессе своей жизнедеятельности бактерии рода *Lactobacillus* продуцируют в среду культивирования органические кислоты, которые играют главную роль в ингибирующем действии на другие микроорганизмы [3].

Изучение антимикробной активности культуральной жидкости (рН 3,8) бактерий *L. helveticus* показало, что она подавляет рост коллекционных непатогенных и условно-патогенных тест-штаммов *Escherichia coli* БИМ В-238, *Bacillus cereus* БИМ В-108, *Staphylococcus sp.* БИМ В-1618, *Lactobacillus paracasei* БИМ В-1701, *Lactobacillus curvatus* БИМ В-1651 Г, *Lactobacillus plantarum* БИМ В-1008 – диаметр подавления роста был более 10 мм, а у *Pseudomonas aeruginosa* БИМ В-808 Г, *Lactobacillus fermentum* БИМ В-1009, *Enterococcus faecalis* БИМ В-1012, *Lactococcus lactis* БИМ В-132, *Lactobacillus delbrueckii* БИМ В-191 – более 20 мм. Ингибирование роста патогенных штаммов *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*,

E. coli составило 20, 18 и 19 мм соответственно. Однако нейтрализованная до pH 7,0 бесклеточная жидкость не оказывала подавляющего эффекта на исследуемые штаммы, что может свидетельствовать об ингибирующем воздействии органических кислот (рисунок), табл. (1).

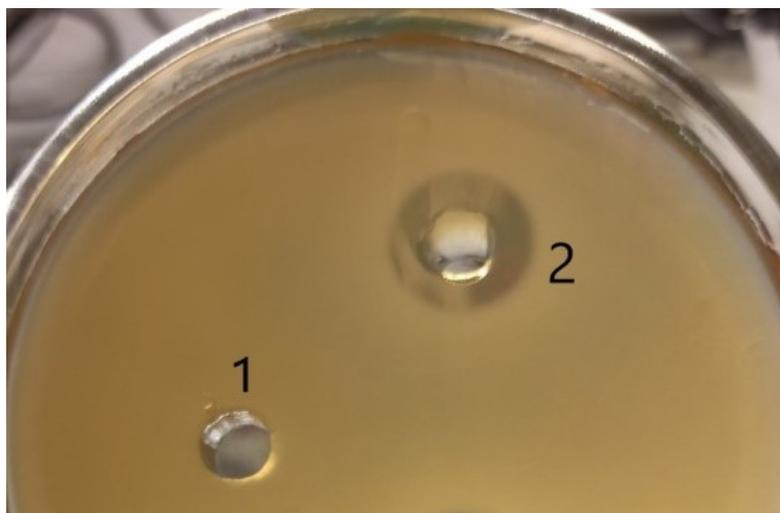


Рисунок – Антимикробная активность культуральной жидкости (pH 3,8) молочнокислых бактерий *L. helveticus* по отношению к тест-штамму *L. plantarum* 1-контроль; 2-зона подавления роста тест-штамма *L. plantarum*

Таблица 1 – Спектр антагонистической активности штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus*

тест-штамм бактерий	зона ингибирования роста тест-штамма, мм	
	культуральная жидкость, pH 3,8	нейтрализованная бесклеточная культуральная жидкость, pH 7,0
<i>Bacillus cereus</i> БИМ В-108	16	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> БИМ В-808 Г	26	–
<i>Staphylococcus sp.</i> БИМ В-1618	13	–
<i>Lactococcus lactis</i> БИМ В-132	25	–
<i>Enterococcus faecalis</i> БИМ В-1012	21	–
<i>Escherichia coli</i> БИМ В-238	14	–
<i>Lactobacillus plantarum</i> БИМ В-1008	14	–
<i>Lactobacillus fermentum</i> БИМ В-1009	30	–
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> БИМ В-191	29	–
<i>Lactobacillus paracasei</i> БИМ В-1701	13	–
<i>Lactobacillus curvatus</i> БИМ В-1651 Г	16	–
патогенные штаммы		
<i>Salmonella sp.</i>	20	–
<i>Klebsiella sp.</i>	18	–
<i>E. coli</i>	19	–

Примечание. Диаметр лунки 8 мм; «–» – отсутствие зон ингибирования роста.

Антибиотикорезистентность бактерий *L. helveticus* проводили по отношению к 11 препаратам (ампициллин, стрептомицин, канамицин, хлорамфеникол, тетрациклин, неомицин, бензилпенициллин, гентамицин, эритромицин, рифампицин, цефтазидим).

Определена минимальная ингибирующая концентрация (МИК) антибиотиков, которая необходима для прекращения роста штамма исследуемых бактерий (табл. 2).

Таблица 2 – Минимальная ингибирующая концентрация антибиотиков по отношению к молочнокислым бактериям *Lactobacillus helveticus*

Антибиотик	МИК, мкг/мл
ампициллин	3
стрептомицин	6
канамицин	100
хлорамфеникол	9
тетрациклин	10
неомицин	50
бензилпенициллин	< 0,1
гентамицин	26
эритромицин	< 0,1
рифампицин	11
цефтазидим	80

Показано, что штамм устойчив к некоторым антибиотикам аминогликозидной группы (МИК канамицин 100 мкг/мл, неомицин 50 мкг/мл, гентамицин 26 мкг/мл) и цефалоспорином (МИК цефтазидим 80 мкг/мл), чувствителен к пенициллиновой группе (МИК ампициллин 3 мкг/мл, бензилпенициллин менее 0,1 мкг/мл), а также к антибиотикам групп тетрациклинового (МИК тетрациклин 10 мкг/мл) и рифампицинового (МИК рифампицин 11 мкг/мл) ряда, макролидам (МИК эритромицин менее 0,1 мкг/мл) и хлорамфениколу (МИК 9 мкг/мл).

Закключение. Антимикробная активность штамма молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 Г обусловлена выделением в среду культивирования значительного количества органических кислот (титруемая кислотность-226⁰T) [6]. За счет этого метаболита, культура подавляет рост широкого ряда непатогенных и условно-патогенных коллекционных штаммов, а также таких патогенных микроорганизмов как *Salmonella sp.*, *Klebsiella sp.*, *E.coli*.

Штамм обладает антибиотикорезистентностью к некоторым антибиотикам аминогликозидной и цефалоспориновой группы, проявляет чувствительность пенициллиновой, тетрациклиновой, рифампициновой группе антибиотиков, макролидам, а также к хлорамфениколу.

Библиографический список

1. Belicová A., Mikulášová M., Dušínský R. Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese [Electronic resource] // J BioMed Res. International. – 2013. – Vol. 2013. – Mode of access: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/760298>. – Date of access: 22.12.2021.
2. Cintas L. M. [et al.] Bacteriocins of lactic acid bacteria // Food Sci. Tech. Int. – 2001. – Vol. 7. – P. 281-305.
3. Haller D. [et al.] Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin // System. Appl. Microbiol. – 2001. – Vol. 24. – P. 218-226.
4. Huiling G. [et al.] Characterization of Antibiotic Resistance Genes from *Lactobacillus* Isolated from Traditional Dairy Products // J Food Science. – 2017. – Vol. 82. – № 3. – P. 724-730.

5. Ispirli H., Dertli E. Isolation and characterisation of lactic acid bacteria from traditional koumiss and kurut // *Int. J Food Properties*. – 2017. – Vol. 20. – P. 2441-2449.
6. Гапонова И. И., Щетко В. А., Романова Л. В. Подбор питательной среды для культивирования и изучения динамики роста молочнокислых бактерий *Lactobacillus helveticus* БИМ В-461 // *Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты*. – 2021. – Т. 13. – С. 42-51.
7. Егоров Н. С. Микробы-антагонисты и биологические методы определения антибиотической активности / Н. С. Егоров. – М.: Высш. шк., 1965. – 211 с

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS RUBER* ИЭГМ 455 К ХЛОРИДУ РТУТИ

Гольшева А.А.¹, Литвиненко Л.В.², Ившина И.Б.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

² Институт экологии и генетики микроорганизмов, Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация: На примере штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 455 рассматриваются адаптивные реакции актинобактерий в ответ на воздействие хлорида ртути. Устойчивость планктонных и иммобилизованных клеток к ртути варьировала от 0,04 до 0,64 мМ в зависимости от условий эксперимента соответственно. Выявлены морфофизиологические изменения бактериальных клеток, которые, по-видимому, способствуют снижению токсического воздействия ртути на микроорганизмы. У исследованного штамма родококков не обнаружены мобильные генетические элементы (плазмиды).

Ключевые слова: Актинобактерии, устойчивость, хлорид ртути, адаптационные изменения, морфофизиологические изменения.

ADAPTATION POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA *RHODOCOCCLUS RUBER* IEGM 455 TO MERCURY CHLORIDE

Golysheva A.A.¹, Litvinenko L.V.², Ivshina I.B.^{1,2}

¹Perm State University, Perm, Russia

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of Ural branch of Russian Academy of Sciences – the branch of Perm Federal Research Center of Ural Branch of Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract: Adaptive reactions of actinobacteria in response to exposure to mercury chloride are considered on the example of the *Rhodococcus ruber* IEGM 455. The resistance of planktonic and immobilized cells to mercury ranged from 0.04 to 0.64 mM depending on the experimental conditions respectively. Morpho-physiological changes in bacterial cells have been identified, which seem to contribute to reducing the toxic effects of mercury on microorganisms. *Rhodococcus* do not contain mobile genetic elements (plasmids).

Keywords: *Actinobacteria*, resistance, mercury chloride, adaptation changes, morpho-physiological changes.

На фоне быстрой индустриализации и расширения городов концентрация тяжелого металла (ТМ) ртути (Hg) в окружающей среде неуклонно повышается. По данным ВОЗ, ртуть занимает десятое место в списке наиболее опасных химических веществ [1]. По официальным

данным, общий объем выбросов ртути российскими предприятиями, обязанными отчитываться о ее эмиссии, составил 3,9 т. Однако еще в исследовании 2015 г. общий объем выбросов ртути в атмосферу составлял для территории России 39 т, из которых 77% приходилось на процессы, при которых ртуть используется в качестве примеси [2].

В окружающей среде ртуть обычно находится в двух степенях окисления либо в виде Hg (0), либо в виде Hg (II), последняя наиболее распространена в водных объектах [3]. Природными источниками ртути являются процессы естественного выветривания ртутьсодержащих горных пород, а также вулканические извержения. К основным промышленным источникам ртути относятся сжигание угля, сточные воды промышленных предприятий, производство цветных металлов. Интенсивный кругооборот ртути и ее соединений обусловлен стойкостью, природной атомизацией, амальгамацией благородных металлов, способностью пребывать в различных фазовых состояниях, растворимостью в атмосферных осадках, способностью к абсорбции почвой и растениями [4]. Hg не подвергается биологическому разложению, даже в незначительных количествах может представлять угрозу для жизни и здоровья человека, может вызывать повреждение центральной нервной системы, дыхательной и сердечно-сосудистой систем, мутации ДНК. Опасность Hg (II) обусловлена ее способностью связываться с сульфгидрильными или дисульфидными группами в белках, что приводит к дезактивации ферментов. Отравление может сопровождаться раздражительностью, потерей памяти, депрессией, потерей веса и усталостью, паранойей, галлюцинациями, потерей концентрации [5, 6]. В биологических системах, чаще всего в морских, образуется наиболее опасное соединение ртути – метилртуть. Метилирование ртути опосредуется в основном сульфатредуцирующими и железоредуцирующими бактериями [7].

Удаление соединений ртути является важной потребностью современной биотехнологии. Существующие традиционные физико-химические методы, такие как ионный обмен, осаждение, мембранная фильтрация, являются дорогостоящими и генерируют побочные продукты в окружающую среду. Биоремедиация является устойчивым, экологически безопасным и экономичным методом удаления Hg (II) из водных растворов. Одной из перспективных групп микроорганизмов для биотехнологических способов ремедиации загрязненных территорий от ртутных загрязнений являются актинобактерии рода *Rhodococcus*. Родококки способны к биodeградации широкого спектра органических ксенобиотиков; имеют высокую способность к биосорбции и биоаккумуляция ионов ТМ; занимают доминирующее положение в процессах естественного самоочищения открытых экосистем; обладают экологической пластичностью бактериальных клеток; у них отсутствуют выраженные патогенные свойства; не мицелиальный характер роста [8, 9, 10]. Целью данного исследования явилось изучение адаптационного потенциала устойчивости родококков к ионам ртути на примере штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 455.

Материалы и методы. В работе использовали бактериальный штамм *R. ruber* ИЭГМ 455 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним коллекции ИЭГМ, № 285 во Всемирной федерации коллекции культур, УНУ 73559, ЦКП 780868, www.iegmcoll.ru). Родококки предварительно выращивали на мясопептонном агаре (МПА) в течение 48 ч. Жизнеспособность и морфометрические параметры бактериальных клеток изучали в условиях их культивирования в (1) мясопептонном бульоне (МПБ) и (2) жидкой минеральной среде (МС), г/л: KH_2PO_4 – 1,0; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ – 1,5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,002. В качестве единственного источника углерода в МС использовали *n*-гексадекан (C_{16}), 3,0 об.%. Физиологическое состояние культур

контролировали по изменению оптической плотности клеточной суспензии. В работе использовали хлорид ртути (HgCl_2 , ч.д.а.) в концентрации от 0,02 до 10,00 мМ. Результаты снимали через 2 сут культивирования. В качестве абиотического и биотического контроля использовали питательные среды без внесения ртути. Для определения количественной характеристики резистентности нативных клеток актинобактерий к ртути использовали показатель минимальной ингибирующей концентрации (МИК), определяемый микролуночным методом [8]. Для изучения устойчивости иммобилизованных клеток бактерий в качестве сорбента использовали отходы древесной промышленности – сосновые опилки, которые широко доступны, дешевы и экологически безвредны. Для оценки локализации генов, кодирующих признак устойчивости актинобактерий к ТМ, применяли метод горизонтального гель-электрофореза выделения плазмидной ДНК в агарозном геле. Эксперименты проводили при помощи набора для выделения плазмидной ДНК (Евроген, Россия). Для получения и анализа изображений с гелей, окрашенных флуоресцентным красителем GelRed (Biotium, США), использовали гель-документирующую систему GelDoc XR+ (Bio-Rad Laboratories, США). В качестве контроля – маркер длин ДНК, состоящий из 10 фрагментов в диапазоне от 100 до 1000 п.н. Поиск возможных генов устойчивости актинобактерий к ТМ проводили в базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), по ключевым словам: “*Actinobacteria*”, “*Rhodococcus*”, “heavy metal resistance”, “heavy metal”, “mercury”, “cnr”, “cop”, “czc”, “mer”, “ncc”. Жизнеспособность бактериальных клеток определяли методом “Live/Dead” с помощью флуоресцирующего микроскопа Carl Zeiss Axio Imager 2 (Германия), а также красителя йоднитротетразолия хлорида (INT), 0,2% водный раствор. Данный краситель действует в качестве конкурентного кислороду акцептора электронов в электрон-транспортной цепи аэробных организмов. Неповрежденные клетки краситель окрашивал в зеленый, мертвые – в красный, живые клетки с поврежденными клеточными стенками – в оранжевый цвет. Изменения в клеточной структуре выявляли при помощи трансмиссионного электронного микроскопа JEM 1400 plus (JEOL Ltd., Япония), который находится на базе ФГБУН Институт биологических проблем Севера ДВО РАН, Магадан. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывали традиционными статистическими методами.

Результаты. По нашим данным, штамм *R. ruber* ИЭГМ 455 проявлял способность к росту в присутствии HgCl_2 . Его устойчивость к ртути варьировала от 0,04 до 0,64 мМ. При этом устойчивость к ртути у планктонных и иммобилизованных клеток при росте в МПБ не изменялась и составила 0,16 мМ. В то же время обнаружено увеличение (до 16 раз) степени устойчивости родококков к ионам Hg^{2+} при росте иммобилизованных бактерий в МС с 0,04 до 0,64 мМ по сравнению с планктонными клетками. Используемый в работе штамм более устойчив к ртути по сравнению с бактериями-спутниками водорослей *Scenedesmus quadricauda* (0,02 мМ) [11], морскими бактериями *Pseudomonas nautica* (0,05 мМ) [12], сульфатредуцирующими бактериями поверхностного слоя льда (0,00037 мМ) [13]. При исследовании жизнеспособности бактериальных клеток установлено, что в условиях загрязнения среды культивирования ионами ртути клетки сохраняли высокую (80–100%) жизнеспособность.

Нами обнаружены морфологические изменения клеток родококков при культивировании их в среде, содержащей ионы ТМ (рисунок 1 А, Б). Так, культивирование родококков в среде, содержащей ионы Hg^{2+} (рисунок 1 Б), приводит к агрегации бактериальных клеток и уменьшению размера клеток до 0,5 мкм в сравнении с контролем 4,9 мкм. Формирование клеточных агрегатов, по-видимому, снижает токсическое воздействие

ртути на бактериальную клетку. Возможно, ионы ртути ингибируют процесс деления бактериальных клеток, так как V-образные делящиеся клетки практически отсутствуют.

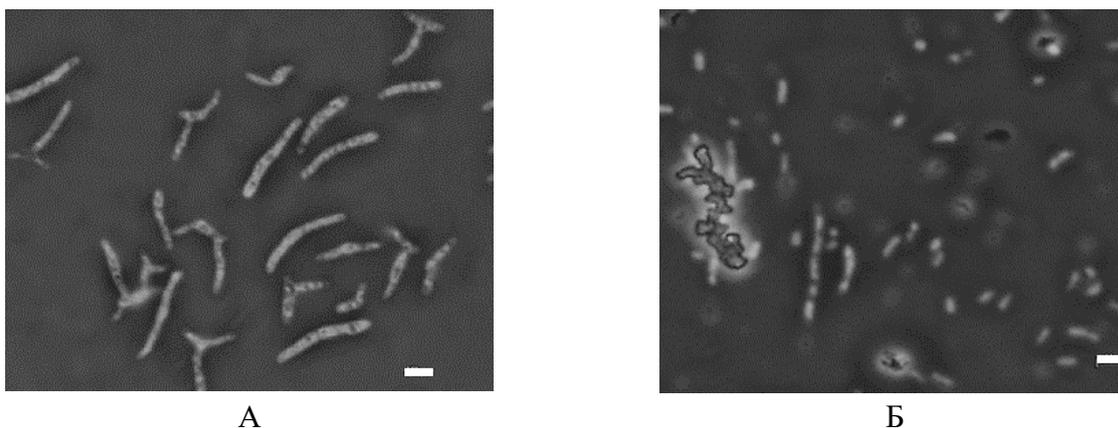


Рисунок 1 – Клетки *R. ruber* ИЭГМ 455 в световом микроскопе после 24 ч инкубирования в присутствии ртути (Ув. $\times 100$). Варианты опыта: А – МС контроль (среда без добавления Hg^{2+}); Б – МС с Hg^{2+} (0,63 мМ). Масштаб линейки: 1 мкм

Результаты электронной микроскопии показывают (рисунок 2), что бактериальная культура, адаптируясь к росту в присутствии HgCl_2 , приобретает морфологические аномалии (рисунок 2 Б, В). Скорее всего, существенными эффектами являются задержка начала роста и деления клеток и многочисленные структурные нарушения, связанные с синтезом и функцией клеточной стенки и цитоплазматической мембраны, в следствии чего клетки имеют неправильную форму и уменьшаются в размерах.

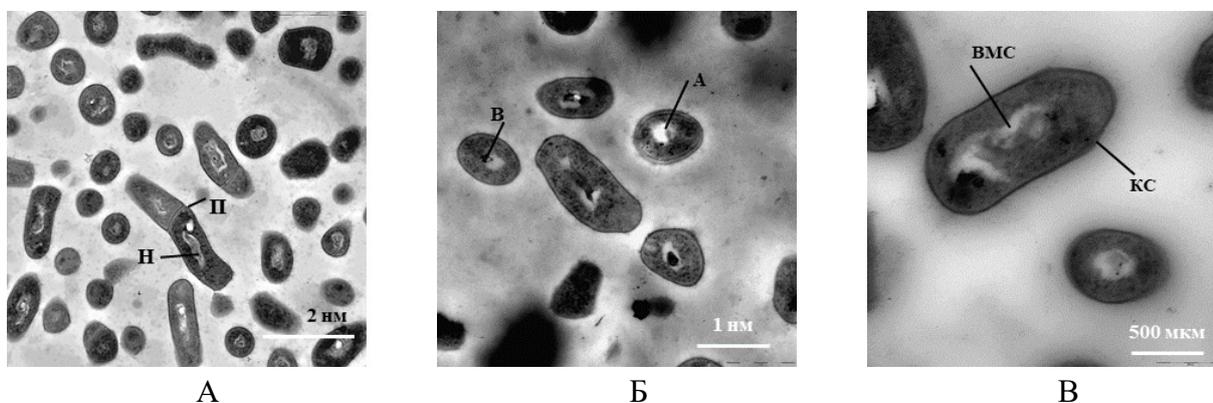


Рисунок 2 – Ультратонкие срезы клеток *R. ruber* ИЭГМ 455, выращенных на МПА
 Варианты опыта: А – МПА контроль (среда без добавления ионов ТМ), $\times 20\ 000$; Б – МПА с Hg^{2+} (0,08 мМ), $\times 30\ 000$ с контрастированием уранилацетатом; В – МПА с Hg^{2+} (0,08 мМ), $\times 60\ 000$. КС – клеточная стенка; Н – нуклеоид; ВМС – внутрицитоплазматическая мембранная система; П – поперечная перегородка; В – волютин (гранулы полифосфатов); А – артефакт (погрешность заливки).

У исследованного штамма актинобактерий плазмиды не обнаружены. В результате проведенного биоинформатического анализа выявлены наиболее распространенные кодирующие последовательности, обуславливающие устойчивость родококков к Hg^{2+} и отвечающие за синтез таких продуктов, как транспортер катионов двухвалентных металлов, белки катионной системы эффлюкса CzcD, редуктазы Hg^{2+} , белки устойчивости к ТМ ModC, CopC, CopD, а также белки сборки цитохром-С-оксидаз.

Таким образом, в результате проведенных исследований выявлены морфофизиологические изменения, способствующие адаптации родококков к ионам ртути в среде культивирования. Устойчивость иммобилизованных клеток *R. ruber* ИЭГМ 455 к Hg^{2+} в 9,14 – 1729,73 раза превышает таковую у штаммов, описанных в литературе [11–13]. Штамм *R. ruber* ИЭГМ 455 перспективен для дальнейшего использования в разработках технологии биологической очистки сточных вод, загрязненных ртутью.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по госзаданию АААА-А19-119112290008-4, АААА-А20-120081990069-3, по гранту РФФИ № 20-44-596001, а также при использовании оборудования ЦКП «Региональная профилированная коллекция алканотрофных микроорганизмов» и «Исследование материалов и веществ» Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН.

Библиографический список

1. Оценка поступления ртути в окружающую среду с территории Российской Федерации. План действий Совета Арктики по предотвращению загрязнения Арктики (АСАР/ПДСА), Федеральная служба по экологическому, технологическому и атомному надзору в сотрудничестве с Датским Агентством по охране окружающей среды. ДАООС, Копенгаген. АСАР. 2005. С. 4–21.
2. Ртутное загрязнение в России: проблемы и рекомендации / Под ред. А. Романова, О. Сперанской, О. Цитцер. Коломна: Коломенская типография, 2016. 118 с.
3. Ní Chadhain *et al.* Analysis of mercuric reductase (*merA*) gene diversity in an anaerobic mercury-contaminated sediment enrichment // *Environ. Microbiol.* 2006. V. 8. P. 1746–1752.
4. Wang Z. J. *et al.* Measurement and scaling of mercury on soil and air in a historical artisanal gold mining area in northeastern China // *Chinese Geogr. Sci.* 2019. V. 29. P. 245–257.
5. Zahir *et al.* Low dose mercury toxicity and human health // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2006. V. 20. P. 351–360.
6. Bravo *et al.* Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chloralkali plant // *Water Res.* V. 49. 2014. P. 391–405.
7. Rice K.M. *et al.* Environmental mercury and its toxic effects // *J. Prev. Med. Public Health.* V. 47. 2014. P. 74–75.
8. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Костина Л.В. Адаптационные механизмы неспецифической устойчивости алканотрофных актинобактерий к ионам тяжелых металлов // *Экология.* 2013. № 2. С. 115–123.
9. Литвиненко Л.В. Способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* аккумулировать ионы никеля // *Микробиология.* 2019. Т. 88. № 2. С. 207–216.
10. Пешкур Т.А., Ившина И.Б. Особенности аккумуляции цезия бактериальными клетками *Rhodococcus ruber* при росте на *n*-гексадекане // *Экология.* 2003. № 1. С. 84–86.
11. Тютюкова Е.А., Григорьев Ю.С. Чувствительность биотестов на основе водорослей хлорелла и сценедесмус к тяжёлым металлам // *Теоретическая и прикладная экология.* 2014. № 2. С. 57–60.
12. Иваница В.А., Бухтияров А.Е. Таксономический состав гетеротрофных бактерий одесского побережья, устойчивых к тяжелым металлам // *Морской экологический журнал.* 2004. Т. 3. № 3. С. 49–54.
13. Кондратьева Л.М., Андреева Д.В., Голубева Е.М. Факторы, влияющие на процессы сульфатредукции и метилирования ртути во льдах реки амур // *Лед и снег.* 2018. Т. 58. № 1. С. 105–116.

РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛОБИОЗОДЕГИДРОГЕНАЗ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИХ ПОИСКУ И ХАРАКТЕРИСТИКЕ

Горина С.Ю., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пушкино, Россия*

Аннотация. На основании филогенетического анализа известных генов грибов, кодирующих целлобиозодегидрогеназы (CDH), и скрининга грибов – активных продуцентов CDH были обнаружены новые целлобиозодегидрогеназы, предположительно отличающиеся по структуре и функции и имеющие высокий потенциал применения в биотехнологии.

Ключевые слова: оксидоредуктаза, целлобиозодегидрогеназа, грибы.

DIVERSITY OF FUNGAL CELLOBIOSE DEHYDROGENASES: NEW APPROACHES TO THEIR SEARCH AND CHARACTERIZATION

Gorina S.Yu., Gaidina A.S., Renfeld Zh.V., Chernykh A.M., Kolomytseva M.P.

*Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms. G.K. Skryabin RAS, FRC PNTsBI
RAS, Pushchino, Russia*

Abstract. Based on the phylogenetic analysis of known fungal genes encoding cellobiose dehydrogenases (CDH) and the screening of fungi that are active producers of CDH, new cellobiose dehydrogenases were discovered, presumably different in structure and function and having a high potential for application in biotechnology.

Keywords: oxidoreductase, cellobiose dehydrogenase, fungi.

Целлобиозодегидрогеназа (CDH; EC1.1.99.18) – внеклеточная оксидоредуктаза грибов, участвует в разложении древесины путем окисления целлобиозы и олигосахаридов до δ -лактонов с сопутствующим переносом электронов к литической полисахаридмонооксигеназе (LPMO) [1]. В структуре исследованных целлобиозодегидрогеназ обнаружено два основных домена (Рис. 1): флаводегидрогеназный домен (DH) содержащий связывающий кофактор FAD и участвующий в переносе электрона от молекулы сахара к цитохромсвязывающему гемсодержащему домену (СУТ), в свою очередь осуществляющему последовательный перенос электрона к литической полисахаридмонооксигеназе (LPMO – lytic polysaccharide monoxygenase) с последующим восстановлением иона меди активного центра LPMO [2-4].

Благодаря своим свойствам целлобиозодегидрогеназа получила широкое применение в качестве универсального биодетекторного элемента в электрохимических биосенсорах и анодах в ферментативных биотопливных элементах и биосуперконденсаторах [5].

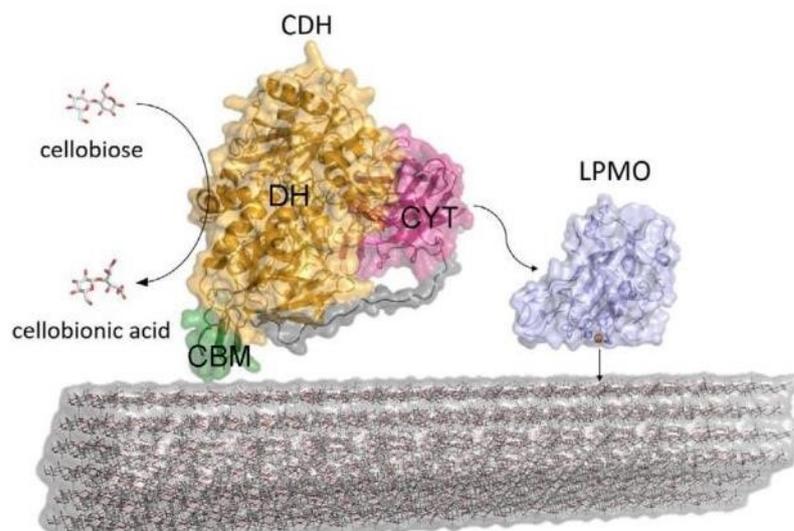


Рисунок 1 – Пространственная структура и механизм действия типичной CDH класса II. DH – дегидрогеназный домен CDH, CYT – цитохромный домен CDH, CBM – субстрат связывающий домен CDH, серым цветом отмечен линкерный участок CDH. LPMO – литическая полисахаридмонооксигеназа [2].

Согласно филогенетическому анализу генов, кодирующих CDH, целлобиозодегидрогеназы разделяют на несколько классов (Рис 2): I, II, III и IV [2, 5].

CDH I представлены в основном среди базидиальных грибов, тогда как CDH II чаще были обнаружены у аскомицетов. Ни один из представителей CDH III и CDH IV еще не выделен и не охарактеризован. Однако, согласно филогенетическому анализу гены, кодирующие CDH III и CDH IV, в основном представлены среди аскомицетов. Их продукты могут значительно отличаться по структуре и свойствам, как между собой, так и по сравнению с CDH I и CDH II, что может расширить границы биотехнологического применения неисследованных ферментов вплоть до создания принципиально новых технологий.

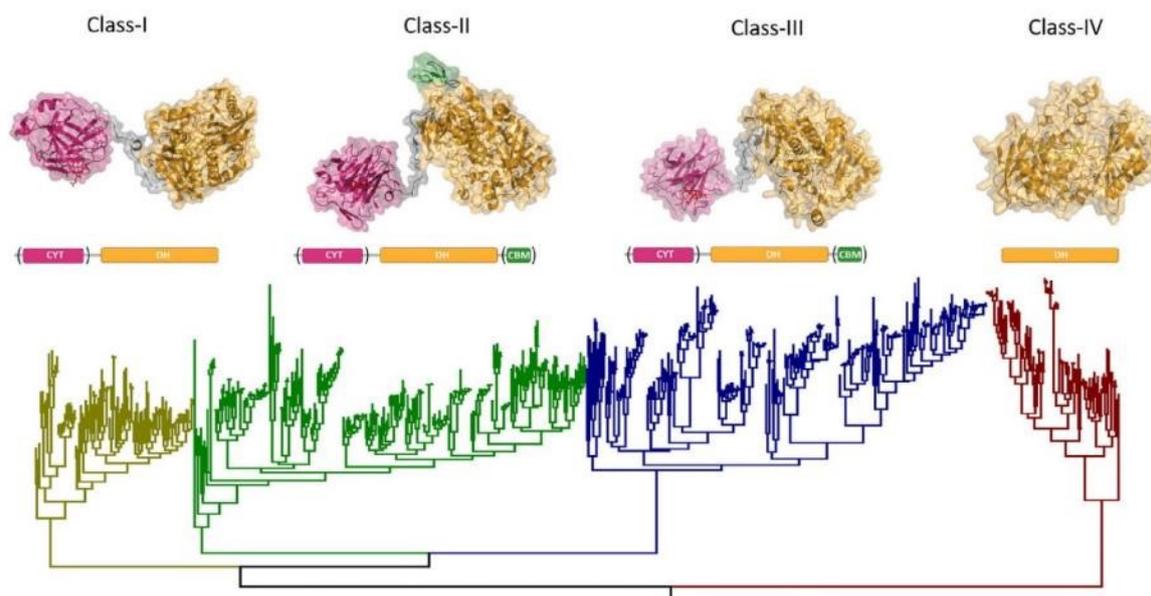


Рисунок 2 – Филогенетическая классификация грибных целлобиозодегидрогеназ [2].

Целью настоящей работы являлся скрининг новых аскомицетов – активных продуцентов CDH.

В ходе работы была впервые осуществлена модификация известного ранее метода определения целлюбиозодегидрогеназной активности грибов при твердофазном культивировании на основе образования Берлинской лазури [6], которая в дальнейшем была применена для быстрого и эффективного скрининга грибов-продуцентов CDH (Рис. 3).

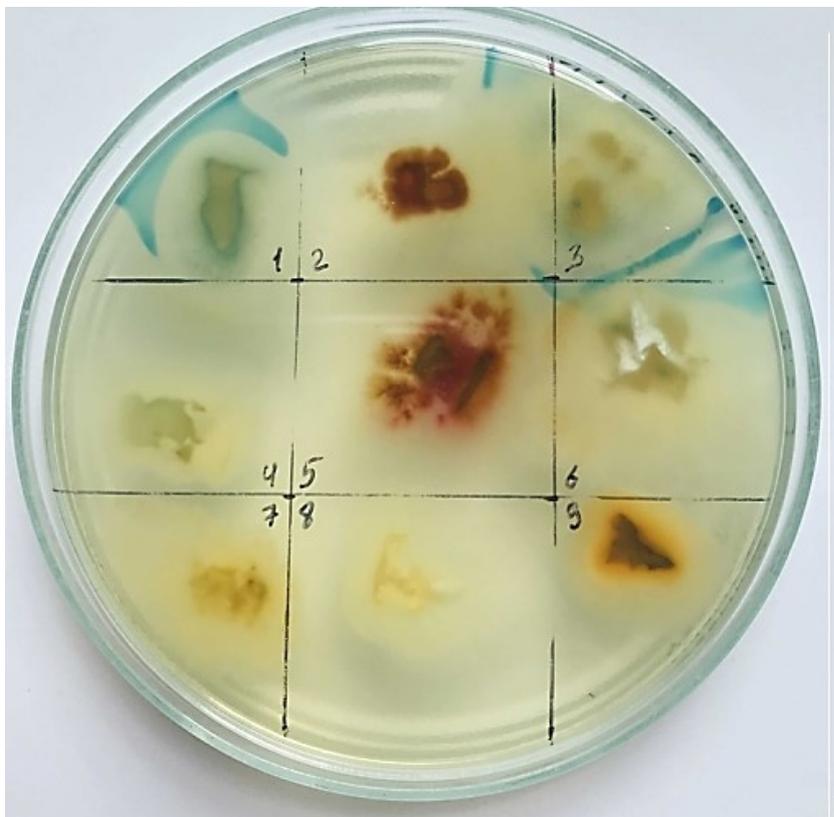


Рисунок 3 – Образование Берлинской лазури вокруг мицелия (сине-зеленое окрашивание), свидетельствующее о наличии CDH-активности грибов.

На основе разработанной методики был осуществлен широкомасштабный скрининг аскомицетов – продуцентов CDH, близких к аскомицетам с известным геномом, содержащим гены, кодирующие ранее неизученные CDH класса III.

Кроме того, применение модифицированных методов детекции CDH-активности грибов позволило осуществить быстрый и высокопроизводительный скрининг различных ростовых субстратов, при использовании которых в ходе культивирования отобранных грибов осуществляется наиболее эффективная продукция CDH.

В ходе проведенных работ были исследованы особенности физиологии продукции целлюбиозодегидрогеназ активными аскомицетами, а также изучена субстратная избирательность продуцируемых CDH. Показана способность аскомицетов продуцировать множественные ферменты с CDH-активностью, обладающих различной субстратной избирательностью.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-АНФа № 21-54-14009.

Библиографический список

1. Ayers A.R., Ayers S.B., Eriksson K.E. Cellobiose oxidase, purification and partial characterization of a hemoprotein from *Sporotrichum pulverulentum* // European Journal of Biochemistry – 1978. – V. 90. – P. 171-181.
2. Csarman F., Wohlschlager L., Ludwig R. Chapter Fifteen – Cellobiose dehydrogenase // The Enzymes – 2020. – V. 47. – P. 457-489.
3. Wood J.D., Wood P.M. Evidence that cellobiose: quinone oxidoreductase from *Phanerochaete chrysosporium* is a breakdown product of cellobiose oxidase // Biochim. Biophys. Acta.-1992. – V. 1119. – P.90-96.
4. Zámocký M., Ludwig R., Peterbauer C., Hallberg B.M., Divne C., Nicholls P., Haltrich D. Cellobiose dehydrogenase – a flavocytochrome from wood-degrading, Phytopathogenic and saprotropic fungi //Curr. Protein Pept. Sci. – 2006. – V. 7. – P.255-280.
5. Scheiblbrandner S., Ludwig R. Cellobiose dehydrogenase: Bioelectrochemical insights and applications // Bioelectrochemistry. – 2020. – V. 131. – P. 107345.
6. Vasilchenko L.G., Ludwig R., Yershevich O.P., Haltrich D., Rabinovich M.L. High-throughput screening for cellobiose dehydrogenases by Prussian Blue in situ formation // Biotechnol. J. – 2012. – V. 7. – P. 919-930.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ КАРОТИНОИДОВ У ПОЧВЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-ЛУЧЕЙ

Горовцов А.В., Вибе В.В., Гладкая А.Н., Григоренко В.В., Дубовая Д.Д., Токарева Ф.Ю.,
Вечканов Е.М.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. Каротиноидные пигменты играют важную роль в процессе жизнедеятельности разных групп организмов, так как обладают антиоксидантными, противоопухолевыми, радиопротекторными, противовоспалительными свойствами. В настоящей работе представлены результаты исследования ряда штаммов почвенных бактерий из родов *Gordonia*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Deinococcus*, *Arthrobacter* при стимуляции ультрафиолетовыми лучами и без нее. Культивирование микроорганизмов-продуцентов каротиноидов проводилась на плотной питательной среде МПА, затем культуры облучали ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 313 нм с помощью эксимерной лампы с узким спектром. Установлено, что у всех представленных штаммов, кроме *Kocuria* и *Arthrobacter* происходит значительное повышение продукции каротиноидов. У исследованных штаммов есть дальнейшая перспектива использования для промышленного получения каротиноидов.

Ключевые слова: каротиноиды, микроорганизмы, актинобактерии, УФ-лучи, антиоксиданты.

RESEARCH ON THE PRODUCTION OF CAROTENOIDS OF SOIL MICROORGANISMS UNDER THE INFLUENCE OF ULTRAVIOLET RAYS

Gorovtsov A.V., Vibe V.V., Gladkaya A.N., Grigorenko V.V., Dubovaya D.D.,
Tokareva F.U., Vechkanov E.M.

Southern Federal University, Rostov on Don, Russia

Abstract. Carotenoid pigments play an important role in the vital activity of different groups of organisms, as they have antioxidant, antitumor, radioprotective, anti-inflammatory properties. This paper presents the results of a study of a number of strains of soil bacteria from the genera *Gordonia*, *Micrococcus*, *Kocuria*, *Deinococcus*, *Arthrobacter* with and without stimulation by ultraviolet rays. Cultivation of microorganisms producing carotenoids was carried out on a dense nutrient medium of MPA, then the cultures were irradiated with ultraviolet rays with a wavelength of 313 nm using an excimer lamp with a narrow spectrum. It was found that all the presented strains, except *Kocuria* and *Arthrobacter*, have a significant increase in carotenoid production. Thus, the studied strains have a further prospect of being used for the industrial production of carotenoids.

Keywords: carotenoids, microorganisms, actinobacteria, UV rays, antioxidants.

Введение. Каротиноиды играют важную роль в защите от УФ-лучей, и это лучше всего заметно у тех микроорганизмов, которые обитают в местах подверженных интенсивной инсоляции. Например, микроорганизмы, живущие в Антарктиде, хорошо переносят УФ-В и УФ-А излучение, причем устойчивость к нему определяется содержанием каротиноидов в клетке. У микроорганизмов из кристально чистых озер Пантагонии, тоже была замечена высокая устойчивость к УФ-излучению и высокая продукция каротиноидов в клетке [2]. Высокую устойчивость к радиации демонстрировали и базидиомицеты *Sporobolomyces ruberrimus* и *Cystofilobasidium capitatum*, причем организмы-альбиносы не могли противостоять действию УФ-лучей, в отличие от других особей с высоким содержанием меланина и каротиноидов [2,4]. Таким образом, хорошо известно, что продукция каротиноидов является адаптивным признаком, помогающим микроорганизмам в защите от УФ-излучения.

У фотосинтезирующих организмов каротиноиды могут выступать в качестве своеобразных фильтров, задача которых стоит в уменьшении влияния синего и ультрафиолетового света на фотосистемы. Нижний уровень энергии синглетного возбужденного состояния каротиноидов находится ниже такового у хлорофилла, поэтому они также способны играть роль «тушителей», возбужденных синглетных состояний хлорофилла. В этом механизме каротиноиды забирают энергию возбужденного хлорофилла, тем самым возвращая его в основное синглетное состояние. В таком виде хлорофилл не подвергается фотоокислительному разрушению, поскольку не взаимодействует с молекулярным кислородом. Каротиноиды при этом рассеивают эту часть энергии в виде тепла [3].

Показано, что каротиноиды проявляют мощную биологическую активность, такую как антиоксидантная, противовоспалительная, участие в окислительном обмене клетки, радиопротекторные свойства, противоопухолевое действие, усиление регенерации клеток эпителия, провитаминная активность А. Эти ценные для здоровья свойства каротиноидов приводят к всплеску рыночного спроса на каротиноиды, особенно на полученные из природных источников.

В настоящее время для промышленного производства натуральных каротиноидов чаще используются растения. Производство искусственных каротиноидов осуществляют химическим путем с использованием невозобновляемых источников (нефтехимии), что негативно влияет на окружающую среду. Процесс культивирования растений требует значительно больших временных и финансовых затрат в противовес культивированию микроорганизмов. Для получения микробных каротиноидов могут использоваться такие микроорганизмы, как пигментные дрожжи рода *Rhodotorula*, способные развиваться на растительных отходах различного происхождения [5]. Биомассу данных дрожжей можно использовать как кормовую культуру для аквакультуры, сельскохозяйственных животных и птиц. Перспективным источником каротиноидов также является *Deinococcus radiodurans*, из которого получают деиноксантин [7]. Некоторые виды цианобактерий, такие как *Nostoc sphaeroides* и *Desmonostoc muscorum* также накапливают значительные количества каротиноидов [1,6]. Тем не менее, существует целый ряд продуцентов, не нашедших пока широкого применения в получении каротиноидных пигментов, несмотря на высокую активность синтезируемых ими веществ. Именно поэтому важно продолжать исследования по поиску новых микроорганизмов и усилению их продуктивности для получения каротиноидов.

Методы исследования. Почвенные актинобактерии родов *Gordonia*, *Kocuria*, *Micrococcus*, и *Arthrobacter*, а также бактерии р. *Deinococcus* были выделены из горизонта

урбик урбостратоземов г. Ростова-на-Дону. Все перечисленные штаммы характеризуются способностью к синтезу каротиноидных пигментов.

Для культивирования исследуемых микроорганизмов использовался мясопептонный агар. Рост культуры продолжался трое суток, за данное время штаммы успевали вырасти на среде, после чего подвергались облучению УФ-лучами. Для облучения использовался ультрафиолет с длиной волны 313 нм с помощью эксимерной лампы с узким спектром. Облучение производили в течение 10 минут с расстояния 25 см. После облучения контрольные и облученные культуры выдерживали в термостате еще 4 суток.

Для выделения каротиноидов клетки бактерий разрушались методом замораживания-оттаивания – проводилась трехкратная заморозка биомассы в жидком азоте. В перерывах между заморозкой эппендорфы помещались в термоблок «Гном» (50 °С). Далее использовался метод ультразвуковой экстракции каротиноидов с помощью ультразвуковой установки Qsonica VCX130. На эппендорфы с разрушенными бактериями и предварительно добавленным ацетоном 1,5 минуты воздействовал ультразвук с мощностью 52 Вт; паузы между озвучиваниями – 5 секунд. В полученных ацетоновых экстрактах определяли содержание каротиноидов спектрофотометрически с помощью прибора Beckman Coulter при длинах волн от 400 до 510 нм с шагом в 10 нм. После этого производилась очистка каротиноидов с помощью перевода их в гексан, удаление растворителя, перерастворение в растительном масле и определение протекторной активности выделенных каротиноидов бактерий с помощью LUX-биосенсоров на основе *Escherichia coli* MG 1655. В работе использовали рекомбинантные штаммы *E. coli* (MG 1655 (pSoxS-lux), MG1655 (pKatG-lux), MG1655 (pRecA-lux), MG1655 (pColD-lux)), содержащие плазмиды с опероном luxCDABE фотобактерии *Photobacterium luminescens*, поставленным под контроль соответствующих промоторов *E. Coli* [4,10].

Результаты исследования. При обработке культуры УФ-лучами наблюдалось значительное повышение продукции каротиноидов у штаммов *Gordonia* 8.10, *Gordonia* 8.7, *Micrococcus luteus*, *Deinococcus sp.*. На рисунке наглядно показано увеличение продукции каротиноидов штаммов р. *Gordonia* после облучения.

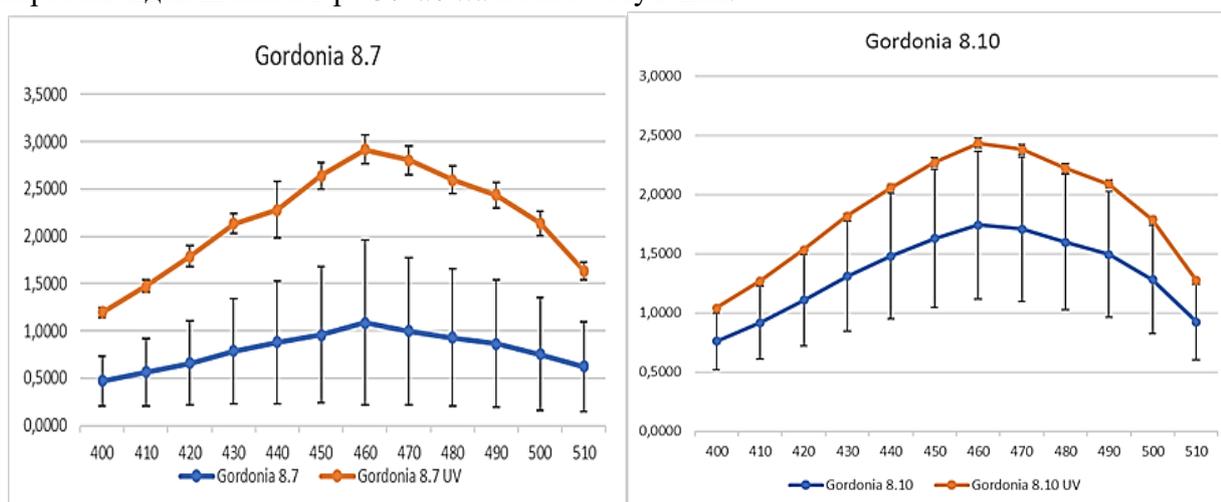


Рисунок – Изменение продукции каротиноидов штаммов *Gordonia* 8.10 и *Gordonia* 8.7.

Исходя из этого можно сделать вывод о дальнейшей перспективе использования данных микроорганизмов и стимуляции их ультрафиолетом для получения каротиноидов в промышленном масштабе.

Облучение штаммов *Kocuria*, *Arthrobacter* не дало значимого повышения продукции каротиноидов. Предположительно, исследование дало такие результаты потому, что для этих видов недостаточно 10 минут облучения, либо фаза роста в момент облучения не оптимальна и не оказывает влияния на продуктивность данных штаммов (облучение производилось на 3-и сутки от посева). Помимо облучения штаммов УФ-лучами также были проведены тесты на антиоксидантную активность с помощью биосенсорного метода. В ходе эксперимента были подтверждены антиоксидантные свойства каротиноидов исследованных микроорганизмов [8].

Заключение. В результате исследования было установлено, что облучение культур микроорганизмов-продуцентов ближним ультрафиолетовым излучением стимулирует синтез каротиноидных пигментов. Усиление продуктивности показано для штаммов, относящихся к *Gordonia sp.*, *Micrococcus luteus* и *Deinococcus sp.* Таким образом, использование данного приема может влиять на перспективы использования данных штаммов в качестве источника каротиноидных пигментов, обладающих высокой антиоксидантной активностью.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-1122 и при поддержке Программы стратегического академического лидерства Южного федерального университета («Приоритет 2030»).

Библиографический список

1. Subashchandrabose S. R., Wang, L., Venkateswarlu, K., Naidu, R., Megharaj, M. Interactive effects of PAHs and heavy metal mixtures on oxidative stress in *Chlorella sp.* MM3 as determined by artificial neural network and genetic algorithm // *Algal research*. – 2017. – Т. 21. – С. 203-212.
2. Zavilgelsky, G. B., Kotova, V. Y., Manukhov, I. V. Action of 1, 1-dimethylhydrazine on bacterial cells is determined by hydrogen peroxide / G. B. Zavilgelsky, V. Y. Kotova, I. V. Manukhov // *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. – 2007. – V. 634, №. 1-2. – P. 172-176.
3. Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей // *Вопросы современной альгологии*. – 2015. – 87 с.
4. Kreusch MG, Duarte RTD. Photoprotective compounds and radioresistance in pigmented and non-pigmented yeasts // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021 May – 3521-3532 с.
5. Червякова О. П. Получение микробной биомассы, обогащенной каротиноидами // *Успехи в химии и химической технологии*. – 2010. – Т. 24. – №. 11 (116). – С. 51-53.
6. Дидович С. В. и др. Влияние физиологического потенциала цианобактерий на растительно-микробное взаимодействие // *Биомика*. – 2018. – Т. 10. – №. 2. – С. 162-164.
7. Сазыкин И. С., Сазыкина М. А., Чистяков В. А. Способ получения деиноксантина-каротиноида микроорганизма *Deinococcus radiodurans*. – 2013.
8. Горовцов А.В., Вибе В.В., Гладкая А.Н., Григоренко В.В., Дубовая Д.Д., Токарева Ф.Ю., Вечканов Е.М. Исследование антиоксидантной активности каротиноидных пигментов почвенных актинобактерий // *Материалы Международной молодежной научной школы «Мониторинг, охрана и восстановление почвенных экосистем в условиях антропогенной нагрузки»*, Ростов-на-Дону, 27-30 сентября, 2022.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОВМЕЩНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ И АНТИБИОТИКОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

Губейко А. С., Деменчук Т.В., Воробьёва М.М.

Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь

Аннотация. Установлено, что выделенные штаммы *Escherichia coli*. обладают резистентностью к цефтриаксону, цефепиму, меропенему и амикацину, а *Salmonella* sp. – цефтриаксону, цефепиму, меропенему и ципрофлоксацину. Исходя из результата опыта эффективности совместного применения антибиотиков и пробиотика «Линекс» мы видим, что пробиотик уменьшает действие антибиотика на тест-микроорганизмы. Следовательно, использование пробиотика «Линекс» в качестве восстановления организма после или во время приема антибиотика является перспективным, что позволяет снизить риск ассоциированного с антибиотиками дисбактериоза или уменьшить его.

Ключевые слова: антибиотик, пробиотик, *Escherichia coli* и *Salmonella* sp.

EFFICIENCY OF COMBINED USE OF PROBIOTICS AND ANTIBIOTICS UNDER IN VITRO CONDITIONS

Gubeiko A.S., Demenchuk T.V., Varabyova M.M.

Polesky State University, Pinsk, Belarus

Abstract. It has been established that the isolated strains of *Escherichia coli*. are resistant to ceftriaxone, cefepime, meropenem and amikacin, and *Salmonella* sp. – ceftriaxone, cefepime, meropenem and ciprofloxacin. Based on the result of the experience of the effectiveness of the combined use of antibiotics and the probiotic «Linex», we see that the probiotic reduces the effect of the antibiotic on test microorganisms. Therefore, the use of the probiotic «Linex» as a recovery of the body after or during antibiotic intake is promising, which can reduce the risk of antibiotic-associated dysbacteriosis or reduce it.

Keywords: antibiotic, probiotic, *Escherichia coli* and *Salmonella* sp.

Введение. Бесконтрольное применение антибиотиков, в том числе и нового поколения, привело к появлению большого количества мутагенных форм микроорганизмов с высокой антибиотикорезистентностью. В ветеринарии и медицине возникла проблема – поиск новых путей лечения животных и человека лекарствами, не вызывающими антибиотикорезистентность, а также обладающими выраженным антимикробным действием на болезнетворные резистентные к антибиотикам штаммы микроорганизмы [1].

Как известно, решением данной проблемы стало изобретение пробиотиков – препаратов на основе микроорганизмов, обладающих антагонистической активностью по отношению к патогенной микрофлоре [2]. В последние годы в литературе представлены противоречивые

данные по поводу эффективности и безопасности пробиотиков, целесообразности их применения в период антибиотикотерапии, выживаемости в кислой среде желудка, способности к колонизации желудочно-кишечного тракта организма-хозяина, возможности интеграции пробиотических штаммов с облигатной микрофлорой толстой кишки [3]. Исходя из выше изложенного, в рамках настоящего исследования, мы решили проверить эффективность совместного применения антибиотиков и пробиотиков в условиях *in vitro*.

В качестве объектов исследования использовали чистые культуры микроорганизмов, входящие в состав пробиотика «Линекс». В качестве тест-организмов – условно-патогенные микроорганизмы: *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, выделенные из почвы и воды. Эти микроорганизмы, как правило, лишены болезнетворных свойств и не вызывают инфекционных заболеваний у здорового человека. Они нередко колонизируют кожу и слизистые оболочки, но способны и к длительному существованию во внешней среде.

В работе использовали три штамма *Escherichia coli*, выделенные из воды. *Salmonella* sp. выделили из воды фонтана возле магазина «Копеечка». Отбор пробы воды производили согласно ГОСТ 17.1.5.05-85. Из проб готовили суспензии в разведение 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} [4].

Идентификацию выделенных бактерий осуществляли по определителю Берджи, основанный на морфологически-тинкториальных, культуральных и биохимических свойствах микроорганизмов [5]. Питательные среды готовили из сухой среды промышленного производства в соответствии с инструкцией изготовителя. После автоклавирования питательную среду сразу же разливали в стерильные пробирки или в чашки Петри [6].

Для идентификации по культуральным свойствам *E. coli* использовали среды Кесслера и Эндо агар. Для идентификации по культуральным свойствам *Salmonella* sp. – RVS-бульон и Висмут-сульфит агар. Идентификация по тинкториальным свойствам выделенных бактерий осуществляли с помощью окраски по Граму.

Выделенные бактерии также мы идентифицировали по биохимическим свойствам в соответствии со следующими параметрами:

1. по способности расщепления лактозы (среда Эйкмана с лактозой);
2. по сульфитредуцирующей способности (Висмут сульфит агар);
3. по способности утилизировать ацетат (среда ацетатный агар);
4. по каталазоположительности;
5. по способности ферментировать лактозу, глюкозу, образовывать газ и сероводород (агар Клиглера)

Чувствительность бактерий *E. coli*, *Salmonella* sp к антимикробным препаратам определяли с помощью документов Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST).

Штаммы бактерий, входящий состав пробиотика, и штаммы тест-организмов культивировали 24 часа при температуре 37 °С. Для определения эффективности совместного применения антибиотиков и пробиотиков использовали метод наложением дисков. При этом производили посев тест-организмов сплошным «газоном» на чашках Петри содержащих ГРМ-агар. Затем на поверхность агаровой пластинки накладывали диски: первый – пропитанный антибиотиком с определенной концентрации: беталактамы антибиотики – 30 мкг цефтриаксон и цефепим, карбапенем – 10 мкг мерепонема, фторхинолоны – 25 мкг ципрофлоксацин, аминогликозид – 30 мкг амикамиц; второй – штаммами бактерий из пробиотика «Линекс» и антибиотиком, а третий – пропитанный штаммами бактерий из

пробиотика «Линекс». Инкубировали тест-организмы в течение 24 часов при температуре 37 °С, с последующим замером зон подавления роста тест-организмов.

Результаты. По культуральным свойствам на среде Эндо, выделенные бактерии, идентифицированы как *E. coli*, поскольку образовали колонии красно-малинового цвета с металлическим блеском, круглые с ровными краями и выпуклые. На среде Кесслера наблюдали придонный рост этих бактерий, на что указывает осадок темно-фиолетового цвета.

По культуральным свойствам на среде Висмут-сульфит агари и RVS – бульон бактерии, выделенные, идентифицированы как *Salmonella sp.*, поскольку колонии были черные, круглые с ровными краями, выпуклые, а в RVS – бульоне наблюдали придонный рост бактерий, на что указывает осадок. По тинкториальным свойствам колонии определены как грамтрицательные, палочковидные с округлёнными краями, что также указывает на принадлежность их к *E. coli* и к *Salmonella sp.*

Результаты идентификации по биохимическим свойствам выделенных микроорганизмов из воды на принадлежность к *E. coli* и *Salmonella sp.* представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Идентификации по биохимическим свойствам выделенных микроорганизмов из воды на принадлежность к *E. coli* и *Salmonella sp.*

Биохимические свойства	Питательные среды	<i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> . по определителю Берджи	<i>Salmonella sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i> по определителю Берджи
		Признак свойств			
По способности расщепления лактозы	среда Эйкмана с лактозой	Есть, на это указывает изменение среды с зеленого на желтый	Есть	Нет, так как среда цвет не поменяла	Нет
По сульфитредуцирующей способности	среда Висмут-сульфит агар	Нет, на это указывают колонии болотного цвета выпуклой и правильной формы	Нет	Есть, на это указывает наличие чёрных колоний на среде	Есть
По способности утилизировать цитрат	Ацетатный агар	Есть, на это указывает изменение среды с зеленого на синий.	Есть	Нет, так как среда цвет не поменяла	Нет
По каталазоположительности	Пероксид кислорода	Есть	Есть	Есть, на это указывает наличие пузырьков	Есть
По способности ферментировать лактозу, глюкозу, образовывать газ и сероводород	Агар Клиглера	Есть на глюкозу и лактозы, на это свидетельствует желтый столбик, и желтый скос; не способны образовывать сероводород, так как среда не почернела	Есть на глюкозу и лактозы; нет на сероводород	Есть на глюкозу, на это указывает желтый столбик; нет на лактозу, так как розовый скос; есть на сероводород, так как наблюдается почернение среды	Есть на глюкозу и на сероводород; нет на лактозу

Из вышесказанного следует, что по определителю Берджи выделенные бактерии по морфологическим, тинкториальным, культуральным и биохимическим свойствам соответствуют *E. coli* и *Salmonella sp.*

В рамках настоящего исследования на следующем этапе работы мы определили эффективность совместного действия антибиотиков и пробиотиков на условно-патогенные микроорганизмы (таблица 2).

Таблица 2 – Обобщающая таблица по комплексному применению антибиотиков и пробиотиков в отношении тест-организмов

Штамм исследуемой бактерии	Исследуемые антибиотики	Диаметр подавления роста штаммов бактерий (мм)		Чувствительность бактерий семейства <i>Enterobacterales</i> к антибиотикам по EUCOST
		Диски с антибиотиком	Диски с антибиотиком и пробиотиком	
<i>E. coli</i>	Цефитриаксон (30 мкг)	14±2,12	↑	Резистентные
	Цефепим (30 мкг)	15±0,35	↓	Резистентные
	Мерепенем (10 мкг)	16±0,70	↑	Резистентные
	Ципрофлоксацин (5 мкг)	25±3,53	↑	Чувствительные
	Амикацин (25 мкг)	16±1,41	↑	Резистентные
<i>Salmonella sp.</i>	Цефитриаксон (30 мкг)	14±1,41	↑	Резистентные
	Цефепим (30 мкг)	19±2,12	↑	Резистентные
	Мерепенем (10 мкг)	16±2,12	↑	Резистентные
	Ципрофлоксацин (5 мкг)	18±1,41	↑	Резистентные
	Амикацин (25 мкг)	20±3,53	↑	Чувствительные

Примечание: ↑ – повышение эффективности совместного действия антибиотика и пробиотка на исследуемый штамм бактерий; ↓ – снижение эффективности совместного действия антибиотика и пробиотка на исследуемый штамм бактерий.

Из таблицы мы видим, что *E. coli* обладают резистентностью к цефитриаксону, цефепиму, мерепенему и амикацину, а *Salmonella sp.* – цефитриаксону, цефепиму, мерепенему и ципрофлоксацин.

Исходя из данных таблицы, мы видим, что пробиотик уменьшает действие антибиотика на тест-микроорганизмы. Использование пробиотика «Линекс» в качестве восстановления организма после приема антибиотика является перспективным, постоянно развивающимся направлением медицинской науки. Следовательно, совместное применение пробиотиков с антибиотиками позволяет снизить риск ассоциированного с антибиотиками дисбактериоза или уменьшить его.

Библиографический список

1. Биологическая активность микроорганизмов-пробиотиков / Г. И. Новик [и др.] // Микробиология. – 2006. – № 2. – С. 187-194

2. Плотникова, Е.Ю. Место пробиотиков в современной клинической практике / Е.Ю. Плотникова, Ю.В. Захарова // Педиатрия. – 2018. – № 1. – С. 95–99
3. Кайбышева, В.О. Пробиотики с позиции доказательной медицины / В.О. Кайбышева, Е.Л. Никонов // Доказательная гастроэнтерология. – 2019.– Т. 8, № 3. – С. 45-54.
4. Концевая, И. И. Микробиология: культивирование и рост бактерий. Практическое руководство для студ. биологич. спец. вузов / И. И. Концевая; М-во образования РБ, Гомельский гос. ун-т им. Ф. Скорины. – Чернигов: Десна Полиграф, 2017. – 44 с.
5. Микрообъемная биохимическая идентификация энтеробактерий [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.dntrpasteur.ru/manual1_32/. – Дата доступа: 23.03.2022.
6. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: методические указания / Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России – Москва, 2004. – 91 с.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ

Двойнина Е.В., Сарагашев М.В., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Необоснованно широкое назначение антибиотиков в медицине, приобретение и их использование пациентами без рецепта, широкое применение кормовых антибиотиков в сельском хозяйстве и аквакультуре способствуют развитию и распространению устойчивости к антибиотикам. Острота проблемы с годами только нарастает. В связи с этим разработка современных методов преодоления антибиотикорезистентности бактерий является весьма актуальным направлением в фундаментальной и практической медицине.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, антимикробные препараты, профилактика, наночастицы.

MODERN METHODS OF OVERCOMING ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA

Dvoynina E.V., Saragashev M.V., Soboleva O.M.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. The unreasonably widespread use of antibiotics in medicine, the acquisition and use of them by patients without a prescription, the widespread use of feed antibiotics in agriculture and aquaculture contribute to the development and spread of antibiotic resistance. The severity of the problem is only increasing over the years. In this regard, the development of modern methods to overcome antibiotic resistance of bacteria is a very relevant direction in fundamental and practical medicine.

Keywords: antibiotic resistance, antimicrobial medication, prevention, nanoparticles.

По данным отчёта ВОЗ на апрель 2019, ежегодно от антибиотикорезистентных инфекций погибает 700 тысяч человек по всему миру, а если не принимать никаких мер, то к 2050-му году будет погибать около 10 млн. человек ежегодно [1]. Антибиотикорезистентность – это развитие у бактерий способности противостоять препаратам, которые были созданы для борьбы с ними [2]. Медицинскими причинами развития резистентности являются: необоснованное назначение антибактериальных препаратов, назначение антибактериальных препаратов при вирусных инфекциях, ошибки при выборе антибиотиков, ошибки в выборе дозирования антимикробных препаратов (АМП), неверный выбор длительности бактериальной терапии [3].

На сегодня устойчивость к противомикробным препаратам (УПП) остается одной из основных глобальных проблем, требующих решения, и только глобальные усилия могут

помочь найти решение. По масштабам экономические последствия УПП сравнимы с последствиями глобального изменения климата в 2030 г. Хотя антибиотики по-прежнему необходимы для лечения множества бактериальных и сочетанных инфекций, антибактериальная терапия будет играть важную роль в ограничении роста устойчивых к антибиотикам микроорганизмов [4].

Все вышеперечисленные факторы могут стать причиной будущей бесполезности антимикробных препаратов. Таким образом, мы рискуем вернуться в начало XX века, когда многие бактериальные инфекции могли привести к смерти. Именно поэтому перед нами стоит задача: исследовать эту область и понять, как можно предотвратить рост или же победить бактерий с устойчивостью.

Ассоциированная пневмония – третья по распространенности причина инфекций кровотока. *P. aeruginosa* была впервые выделена из гнойного отделяемого в 1882 году. Она оказалась условно-патогенным микроорганизмом у пациентов с ослабленным иммунитетом, который может выжить на сухих поверхностях больничной среды, таких как респираторное оборудование и диализные трубки. β -лактамы, такие как пенициллин, цефалоспорины и карбапенемы, ингибируют синтез пептидогликана клеточных стенок бактерий. Цефалоспорины третьего и четвертого поколения, такие как цефтазидим и цефепим, соответственно, являются наиболее эффективными β -лактамами, используемыми при лечении *P. aeruginosa*.

Устойчивость к этим антибиотикам опосредована бета-лактамазами, которые разрушают амидную связь β -лактамного кольца и делают антибиотики неэффективными. Так, у *P. aeruginosa* выявлены следующие основные классы β -лактамаз: классы А, С и D. Эндогенная β -лактамаза, такая как β -лактамаза AmpC, может индуцироваться несколькими β -лактамами, такими как бензилпенициллин и имипенем. *P. aeruginosa* может приобретать резистентность в результате генной мутации, которая приводит к сверхэкспрессии β -лактамазы AmpC [5]. Внутрибольничные инфекции, вызванные грамотрицательными бактериями, являются сложной проблемой для медицинских работников из-за устойчивости к антибиотикам [6].

На шестьдесят восьмой сессии Всемирная ассамблея здравоохранения в мае 2015 года одобрила глобальный план по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам. Его цель в том, чтобы обеспечить на как можно более длительный срок стабильность профилактики инфекционных заболеваний при помощи эффективных средств с гарантированным качеством, которые используются ответственно и которые доступны для тех, кто в них нуждается. Странам было рекомендовано разработать национальные планы действий и выполнить задачи глобального плана. К настоящему времени национальные планы имеются у 79 стран и еще 49 стран находятся в процессе их разработки [7].

По данным о потреблении антимикробных препаратов за 2010-2019 год по странам ЕС/ЕЭЗ, в среднем отмечается незначительное увеличение потребления β -лактамов на 0,6%, уменьшение потребления на 0,9% тетрациклина, потребление других антимикробных препаратов увеличилось на 2,6% [8]. Из полимиксинов большое внимание уделяется колистину, который на сегодняшний день является одним из наиболее мощных и эффективных препаратов [9]. С ним связывалось много надежд, но в октябре 2019 года в Германии при лечении колистином вспышки инфекций, вызванных бактерией вида *Klebsiella pneumoniae*, он показал низкую эффективность.

Причиной этого факта явились генетические особенности выделенного штамма *K. pneumoniae* ST307, который несет маркеры вирулентности, связанные с повышенной

контагиозностью и, помимо этого, имеет обширную устойчивость к противомикробным препаратам [10].

Разработка новых противомикробных препаратов необходима в срочном порядке и рассматривается в качестве первоочередной задачи. Последние разработки в настоящее время сосредоточены на возвращении скрининга натуральных источников для поиска новых терапевтических средств для борьбы с устойчивыми патогенами. Ниже мы приводим некоторые новые методы лечения и возможные методы профилактики, которые появились в результате программ исследований и разработок для использования против устойчивых грамотрицательных и грамположительных бактерий [11].

Для решения этих проблем прежде всего нужно заниматься профилактикой развития антибиотикорезистентности. Минздравом России была разработана стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2020 года. Уже есть некоторые результаты данного плана, были утверждены клинические рекомендации по чувствительности к антимикробным препаратам (в соответствии с Европейскими рекомендациями), был утвержден центр сотрудничества ВОЗ по вопросам контроля антибиотикорезистентности и началась подготовка национальной стратегии сдерживания антибиотикорезистентности. Был создан проект AMRmap – онлайн-платформа, которая представляет последние данные исследования антибиотикорезистентности, полученные НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России [12]. Эта онлайн-платформа предоставляет возможность отслеживать резистентность по всем регионам России. Данный Интернет-ресурс позволяет получить интерактивный доступ к данным по эпидемиологии, лекарственной устойчивости и впоследствии поможет выбрать более эффективный антибактериальный препарат в борьбе с бактериями [13].

Одной из главных целей должно стать сведение к минимуму антимикробных препаратов – тем самым мы будем уменьшать риски появления новых супербактерий. Например, при ОРВИ назначение антибиотиков не оправдано, но способствует развитию антибиотикорезистентности микроорганизмов, находящихся пока в «спящем» состоянии. Антибиотики могут спровоцировать ослабление иммунитета, что в свою очередь вызовет размножение бактериальной инфекции, застрявшей внутри организма или попавшей в него извне.

Кроме профилактики роста антибиотикорезистентности необходима борьба и с уже имеющимися резистентными бактериями. Одним из возможных лекарств могут являться бактериофаги – это вирусы, избирательно поражающие бактериальные клетки. Именно вирулентные бактериофаги могут убивать клетки бактерий, они адсорбируются на поверхности бактерии, растворяют оболочку, внедряют свою ДНК или реже РНК, которая перестраивает геном и метаболизм бактерии, тем самым заставляя бактерию производить новых бактериофагов. Когда количество бактериофагов становится критическим они лизируют бактерию и выходят наружу. Новые бактериофаги начинают поиск следующих мишеней для дальнейшего их заражения. Казалось бы, вот оно, идеальное лекарство и панацея от всех бактерий на свете, но на самом деле бактериофаги имеют огромное количество ограничений, самым главным из них является их специфичность.

Специфичность бактериофагов заключается в их белках, которые находятся в хвосте бактериофага, они выступают в роли ключа к рецепторам, находящимся на бактериальной оболочке, если бактериофаг не прикрепится к бактерии с помощью этих белков, то он просто не сможет впрыснуть свою ДНК/РНК внутрь. Из-за такой высокой специфичности крайне

тяжело подобрать необходимый бактериофаг к конкретной бактерии, т.к. это требует её точной идентификации вплоть до фаготипа.

Такая специфичность делает применение природных бактериофагов крайне затруднительным. Однако генно-модифицированные бактериофаги уже испытывают в виде экспериментального лечения [14]. Для лечения больной с хронической инфекцией *Mycobacterium abscessus* применили смесь из трех фагов. В течении шести месяцев после терапии бактериофагами состояние пациентки стало заметно лучше, это первый случай лечения микобактерий у человека бактериофагами. Так что у бактериофагов есть перспективы в будущем [15].

Полимерные наночастицы (ПНЧ) стали многообещающей альтернативой, главным образом, благодаря полимерной структуре. Полимерные материалы показали, что обладают антибиотическим действием. Среди их эффектов выделяется способность накапливаться на клеточных мембранах, что в конечном итоге способствует разрушению всей бактериальной клетки. Эти полимерные эффекты вместе с антибактериальными свойствами загруженных лекарств дают этим наносистемам много преимуществ в качестве многоцелевого подхода против различных инфекций [16]. В частности, было продемонстрировано, что современные полимерные наночастицы обладают оптимальными физико-химическими характеристиками, чтобы стать революционным терапевтическим средством против бактериальных инфекций человека. Доказано, что наночастицы этого типа безопасны, биоразлагаемы, биосовместимы, легко удаляются и нетоксичны для тканей и органов, что дает много преимуществ для доступных в настоящее время молекул. Более того, нацеливание на конкретный орган, снижение побочных эффектов многих антибиотиков и длительное накопление с течением времени в зараженной области. Кроме того, сами полимеры показали свою эффективность против множества устойчивых к антибиотикам бактерий. Таким образом, комбинация загруженных лекарств вместе с полимерными матрицами может предложить синергетический подход с инновационными результатами и может представлять собой следующий шаг в лечении бактериальных инфекций [17].

Относительно новым оружием в борьбе против бактерий стали пептиды. До того, как появился адаптивный иммунитет, в начале эволюции основной защитой являлись катионные пептиды. Эти пептиды были мощной защитой против бактерий [18]. Человеческие антимикробные пептиды, такие как дефензины и кателицидин (LL-37), находятся в лейкоцитах, а также синтезируются эпителием кожи и слизистых оболочек, помимо функции защиты они так же служат сигнальными молекулами при воспалении и необходимы для заживления ран [19]. Первыми пептидами, проявившими антимикробное действие, стали циклопены. В 1981 году Ханс Боман и его коллеги выделили их из покоящихся куколок *Hyalophora cecropia* [20].

Сейчас описано более 2700 пептидов противомикробного действия. Но механизм действия пептидов на бактериальную клетку еще не полностью изучен. Нам известны только несколько механизмов, один из которых называется «ковёр»; при этом типе пептиды накапливаются на мембране, а после достижения критической концентрации расщепляют их липидный слой [21]. Также есть механизм «тонущего плота», во время которого пептиды связываются с липидами биологических мембран и при проникновении создают щель в мембране [22].

Пептиды имеют эффект стимулирования иммунной системы, они активируют действие цитокинов, способствуют выделению гистамина и могут являться маркерами для моноцитов. Например, человеческий кателицидин LL37, локализующийся в желудочно-кишечном,

дыхательном, урогенитальном трактах, усиливает синтез IgG и макрофагов [23]. Пептид ампидацин активирует Т-клетки посредством CD 80 [24]. Таким образом, действие пептидов достаточно эффективно.

Антибиотикорезистентность начала развиваться настолько быстро, что ученые и исследователи всего мира ищут альтернативу антибиотикам или механизм сдерживания развития размножения бактерий. В поле зрения ученых появилась хищная бактерия *Bdellovibrio bacteriovorus*. Ее жертвой являются в большинстве случаев грамотрицательные бактерии, такие как сальмонеллы, кишечная палочка и несколько других бактерий. *Bdellovibrio bacteriovorus* является многообещающим кандидатом для борьбы с антибиотикоустойчивыми бактериями и, возможно, в будущем именно она сможет стать достойной заменой антибиотикам и помочь бороться с бактериальной инфекцией как людям, так и животным [25].

Подводя итоги нашего исследования, мы хотели бы ответить на главный вопрос «Существуют ли на данный момент методы решения проблемы антибиотикорезистентности?», и наш ответ определенно «ДА». Сколько человечеству понадобится времени на внедрение конкретных результатов в практическое здравоохранение, неизвестно, однако мы смотрим в будущее с надеждой. Новые открытия дают нам возможность надеяться, что человечество будет спасено.

Библиографический список

1. No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections.
2. Central of disease control and prevention About antimicrobial resistance // 2021 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html> (Дата обращения: 01.10.2022).
3. Biocides and pharmacologically active drugs as residues and in the environment: Is there a correlation with antibiotic resistance? AD Russell, DSc, FRCPath.
4. Rosini R, Nicchi S, Pizza M, Rappuoli R. Vaccines Against Antimicrobial Resistance. *Front Immunol.* (2020 Jun 3);11:1048. doi: 10.3389/fimmu.2020.01048. Erratum in: *Front Immunol.* 2020 Jul 21;11:1578.
5. to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules.* (2020 Mar 16);25(6):1340. doi: 10.3390/molecules25061340. PMID: 32187986; PMCID: PMC7144564.
6. Oliveira, J.; Reygaert, W.C. *Gram Negative Bacteria*; StatPearls Publishing: Treasure Island, FL, USA, (2019).
7. ВОЗ Шестьдесят восьмая сессия ассамблеи здравоохранения // 2015 [Электронный ресурс]. URL: https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68-REC1/A68_2015_REC1-ru.pdf?ua=1 (Дата обращения: 01.10.2022).
8. European centre of disease prevention and control Downloadable tables: Antimicrobial consumption – Annual Epidemiological Report // 2020 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/downloadable-tables-antimicrobial-consumption-annual-epidemiological-report-2019> (Дата обращения: 01.10.2022).
9. European centre of disease prevention and control Antimicrobial resistance and consumption remains high in the EU/EEA and the UK, according to new ECDC data // 2020 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/antimicrobial-resistance-and-consumption-remains-high-press-release> (Дата обращения: 01.10.2022).
10. European centre of disease prevention and control Outbreak of carbapenemase-producing (NDM-1 and OXA-48) and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST307, north-east Germany,

- 2019 // 2019 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/outbreak-Klebsiella-pneumoniae-Germany> (Дата обращения: 01.10.2022)
11. Xu, W.-C.; Silverman, M.H.; Yu, X.Y.; Wright, G.; Brown, N. Discovery and development of DNA polymerase III inhibitors to treat Gram-positive infections. *Bioorganic Med. Chem.* (2019), 27, 3209–3217.
 12. Кузьменков А.Ю., Виноградова А.Г., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Авраменко А.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap – система мониторинга антибиотикорезистентности в России. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* – 2021. – Т.23, №2. – С. 198-204. DOI: 10.36488/смас.2021.2.198-204
 13. Министерство здравоохранения России Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности // 2017 [Электронный ресурс]. URL: <https://minzdrav.gov.ru/news/2017/09/01/6039-minzdrav-rossii-razrabotal-i-vnes-v-pravitelstvo-rossiyskoy-federatsii-strategiyu-preduprezhdeniya-rasprostraneniya-antimikrobnoy-rezistentnosti-v-rossiyskoy-federatsii-na-period-do-2030-goda> (Дата обращения: 29.09.2022).
 14. BRED: A Simple and Powerful Tool for Constructing Mutant and Recombinant Bacteriophage Genomes
 15. Dedrick, R.M., Guerrero-Bustamante, C.A., Garlena, R.A. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus*. *Nat Med* 25, 730–733 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0437-z>
 16. Aminov R.I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol.* (2010);1:134.
 17. Cano, A., Ettcheto, M., Espina, M. et al. State-of-the-art polymeric nanoparticles as promising therapeutic tools against human bacterial infections. *J Nanobiotechnol* 18, 156 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00714-2>
 18. Kaufmann H, Medzhitov R, Gordon S, eds. *The Innate Immune Response To Infection* Washington, DC: ASM Press; 2004:465
 19. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:710–720.
 20. Pütsep K., Faye I. Hans G. Boman (1924–2008): pioneer in peptide-mediated innate immune defence. *Scand. J. Immunol.*, 2009, vol. 70 (3), pp. 317–326. doi: 10.1111/j.1365-3083.2009.02293.x
 21. Oren Z., Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 1998, vol. 47, pp. 451–463. doi: 10.1002/(SICI)1097-0282(1998)47:6<451::AID-BIP4>3.0.CO;2-F
 22. Toke O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Curr. Trends Pept. Sci.*, 2005, vol. 80 (6), pp. 717–735. doi: 10.1002/bip.20286
 23. Wan M., van der Does A.M., Tang X., Lindbom L., Agerberth B., Haeggström J.Z. Antimicrobial peptide LL-37 promotes bacterial phagocytosis by human macrophages. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, vol. 95 (6), pp. 971–981. doi: 10.1189/jlb.0513304
 24. Tavano R., Sega, D., Gobbo M., Papini E. The honeybee antimicrobial peptide apidaecin differentially immunomodulates human macrophages, monocytes and dendritic cells. *J. Innate Immun.*, 2011, vol. 3, pp. 614–622.
 25. Hossein Jashnsaz, Mohammed Al Juboori, Corey Weistuch, Nicholas Miller, Tyler Nguyen, Viktoria Meyerhoff, Bryan McCoy, Stephanie Perkins, Ross Wallgren, Bruce D. Ray, Konstantinos Tsekouras, Gregory G. Anderson, Steve Pressé. «Hydrodynamic Hunters», *Biophysical Journal* 2017. Vol. 112, Pages 1282-1289

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* K12 И ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *E. COLI* ПРОДУЦИРОВАТЬ АГМАТИН

Додина М.В.¹, Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Исследована способность штамма *Escherichia coli* K12 и 7 природных изолятов *E. coli*, выделенных из разных мест обитания, синтезировать агматин из аргинина в разных условиях культивирования. Установлено, что синтез агматина идет активнее при культивировании на синтетических неорганических средах с добавкой глюкозы в качестве источника углерода и энергии. Выявлена обратная зависимость продукции агматина от интенсивности перемешивания.

Ключевые слова: путресцин, агматин, аргинин, аргининдекарбоксилаза.

EVALUATION OF THE ABILITY OF THE *ESCHERICHIA COLI* K12 AND *E. COLI* FIELD ISOLATES TO PRODUCE AGMATINE

M. V. Dodina¹, A. V. Akhova^{1,2}, A. G. Tkachenko²

¹Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russian Federation

Abstract. The ability of the *Escherichia coli* K12 and 7 *E. coli* isolates isolated from different habitats to synthesize agmatine from arginine under different cultivation conditions was studied. It was demonstrated that the synthesis of agmatine is more active on synthetic inorganic culture medium with the addition of glucose as a source of carbon and energy. The inverse dependence of agmatine production on the intensity of mixing was revealed.

Keywords: putrescine, agmatine, arginine, arginine decarboxylase.

Агматин (1-(4-диаминобутил)-гуанидин) – катионное соединение, образующееся в результате декарбоксилирования аргинина. Данное вещество широко распространено в природе: агматин был найден в клетках бактерий, растений и некоторых высших форм жизни, включая млекопитающих. Основная биологическая роль агматина заключается в том, что он является метаболическим предшественником в синтезе трех основных полиаминов: путресцина, спермидина и спермина, которые необходимы для репликации ДНК, пролиферации и клеточного гомеостаза [1].

Преобразование аргинина в агматин катализирует фермент аргининдекарбоксилаза (АДК) (Рисунок).

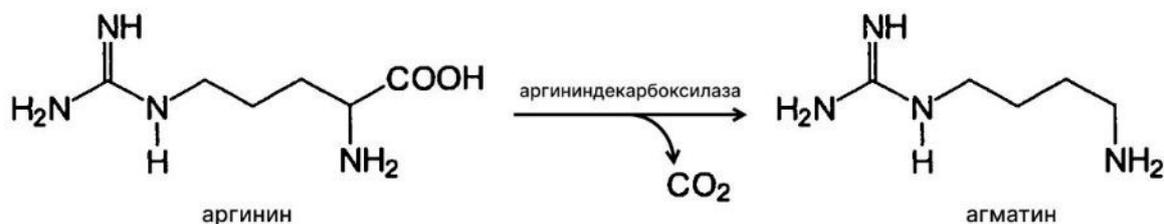


Рисунок – Реакция декарбоксилирования аргинина.

В клетках бактерий аргининдекарбоксилаза существует в двух формах: биодеградативная (индуцибельная) и биосинтетическая (конститутивная). В клетках *Escherichia coli* биодеградативная форма АДК активируется при культивировании на богатой среде, содержащей аргинин, при низких значениях pH (оптимум pH = 5,2) и в микроаэробных условиях. Для проявления активности этой формы АДК требуется пиридоксальфосфат [2]. Считается, что одной из функций биодеградативной формы АДК является защита клетки от кислотного стресса [3]. Биосинтетическая форма аргининдекарбоксилазы предположительно локализуется между цитоплазматической мембраной и слоем пептидогликана и преимущественно утилизирует экзогенный аргинин [4]. Фермент проявляет активность в слабощелочной и нейтральной среде (оптимум pH = 8,4) в присутствии пиридоксальфосфата и ионов Mg^{2+} . Контроль активности АДК осуществляется по принципу обратной связи: высокие концентрации путресцина и спермидина ингибируют фермент [2].

В организме человека агматин выполняет функцию эндогенного нейромодулятора психического стресса, и, судя по исследованиям на животных, обладает потенциалом для разработки новых лекарственных препаратов. В частности, доклинические исследования продемонстрировали благотворное влияние введения агматина на течение таких заболеваний, как депрессия, гипоксическая ишемия, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, эпилепсия и др. [5]. Предполагаются возможности использования агматина в лечении целого спектра сложных заболеваний, включая сахарный диабет, опиоидную зависимость, рак [6]. Кроме того, в последние годы агматин привлекает внимание как промежуточный продукт для производства ацилагматина. Обнаружено, что ацилагматин обладает превосходными поверхностно-активными свойствами, из-за чего используется, в частности, для производства моющих средств [7].

На данный момент существуют проблемы, связанные с крупномасштабным промышленным производством агматина в ходе химического синтеза на основе 1,4-бутандиамина или 1,4-бутилендибромида в качестве исходных материалов: стадии синтеза сложны, промежуточные продукты токсичны для окружающей среды [8]. Исходя из этого, разработка биотехнологических методов производства агматина является актуальной задачей.

Целью данного исследования является оценка способности штамма *E. coli* K12 и природных изолятов *E. coli* продуцировать агматин в зависимости от условий культивирования.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали штамм *Escherichia coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, и 7 природных изолятов *E. coli*. Природные изоляты *E. coli*, выделенные от животных фермерских хозяйств Пермского края в период 2016-2018 гг, были любезно предоставлены профессором, д.б.н., в.н.с. «ИЭГМ УрО РАН» Кузнецовой М.В. Источником выделения изолятов № 27, 30, 31, 32, 33 послужили внутренние органы цыплят-бройлеров, изолята № 46 – фекалии кролика, а изолята № 48 – фекалии свиньи.

Микроорганизмы, сохраняемые в полужидком агаре, вносили в 20 мл бульона LB в колбе Эрленмейера объемом 250 мл и культивировали при 37 °С без перемешивания в течение 16-18 ч. Полученную культуру разводили в свежей среде объемом 5 мл до оптической плотности культуры ОП600 = 0,3. Культивирование опытных культур осуществляли при 37 °С при различных скоростях перемешивания на таких средах, как бульон LB с рН равным 7,4, 5,5 и 4,0, минимальная среда М9 и физраствор (0,9% водный раствор хлорида натрия) с рН равным 7,4 и 4,0. В качестве источника углерода и энергии в физраствор и среду М9 добавляли 0,4% раствор глюкозы. Аргинин добавляли в среду из расчета 1 г/л.

Количество полиаминов определяли на 2, 6 и 24 ч после добавки субстрата (аргинина) в культуру. Количественный анализ полиаминов проводили методом ТСХ их дансилпроизводных [9].

Результаты

Поскольку агматин является промежуточным соединением аргининдекарбоксилазного пути синтеза путресцина, то измерение концентрации последнего дает представление о способности бактерий синтезировать агматин.

В ходе первой серии экспериментов со штаммом *E. coli* K12 культивирование осуществляли при разной скорости перемешивания: без перемешивания (0 об/мин) и со скоростью перемешивания 50 об/мин и 200 об/мин.

По полученным данным можно сделать вывод, что конверсия аргинина в путресцин клетками *E. coli* K12 протекает активнее на синтетических неорганических средах таких, как физраствор и М9, с добавкой глюкозы. При этом в условиях культивирования на богатой среде LB путресцина в среде обнаружено не было. Установлено, что штамм *E. coli* K12 синтезирует максимальное количество путресцина при использовании в качестве среды физраствора с рН 7,4 с добавкой 0,4 % глюкозы (377 мкМ) и физраствора с рН 4,0 и добавкой 0,4 % глюкозы (350 мкМ) при скорости перемешивания среды 0 об/мин. Конверсия субстрата в обоих случаях составила порядка 6%.

Увеличение скорости перемешивания среды культивирования и соответственно аэрации среды приводило к тому, что количество путресцина, синтезированного штаммом *E. coli* K12, уменьшалось.

Поскольку было установлено, что увеличение интенсивности перемешивания оказывает отрицательное влияние на продукцию путресцина, эксперименты с природными изолятами проводили без перемешивания.

Максимальный выход путресцина наблюдался при культивировании изолята № 46 на среде М9 с рН 7,4 и добавкой глюкозы (2176 мкМ). Конверсия субстрата в данном случае составила 37,9%. Кроме того, значительный выход путресцина был зафиксирован при культивировании изолятов № 27 (1497 мкМ) и № 33 (1533 мкМ) на среде М9 с рН 4,0 и добавкой глюкозы. Конверсия субстрата в обоих случаях составила порядка 26%.

В условиях проведенных экспериментов максимальные значения синтезированного путресцина достигаются на 24 час культивирования. Активность некоторых природных изолятов обеспечивала накопление значительных количеств путресцина уже к 6 часу культивирования. В частности, при культивировании изолята № 27 на среде М9 с рН 4,0 и добавкой глюкозы конверсия субстрата доходила до 10%.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что исследованные природные изоляты *E. coli* более перспективны для получения целевого вещества (агматина) по сравнению со штаммом *E. coli* K12.

Заключение

Обнаружены природные изоляты *E. coli*, обладающие повышенной способностью декарбоксилировать аргинин с образованием путресцина, которые могут быть использованы в качестве основы для разработки биокатализаторов для синтеза агматина и в качестве источника высокоактивных аргининдекарбоксилаз. Установлена обратная зависимость продукции путресцина от интенсивности перемешивания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (АААА-А19-119112290009-1).

Библиографический список

1. Pegg A.E., McCann P.P. Polyamine metabolism and function // *The American journal of physiology.* – 1982. – Vol. 243. – № 5. – P. 212-221.
2. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // *Microbiological Reviews.* – 1985. – Vol. 49. – № 1. – P. 81-99.
3. Richard H., Foster J. W. *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential // *Journal of Bacteriology.* – 2004. – Vol. 186. – № 18. – P. 6032-6041.
4. Buch J. K., Boyle S. M. Biosynthetic arginine decarboxylase in *Escherichia coli* is synthesized as a precursor and located in the cell envelope // *Journal of bacteriology.* – 1985. – Vol. 163. – № 2. – P. 522-527.
5. Reyes M.B., Martinez-Oyanedel J., Navarrete C., Mardones E., Martinez I., et al. Insights into the Mn²⁺ Binding Site in the Agmatinase-Like Protein (ALP): A Critical Enzyme for the Regulation of Agmatine Levels in Mammals // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – Vol. 21. – №11. – P. 4132.
6. Piletz J.E., Aricioglu F., Cheng J.T., Fairbanks C.A., Gilad V.H., et al. Agmatine: clinical applications after 100 years in translation // *Drug discovery today.* – 2013. – Vol. 18. – № 17-18. – P. 880-893.
7. Methods of producing agmatine and arginine decarboxylase: pat. 1260588A2 European Patent Office. – № 02009802.6 / Hiroshi M., Shiga K., Yukiko M., et al. – fil. 30.04.2002. – publ. 27.11.2002. – Bul. 2002/48.
8. Golding B.T., Mitchinson A., Clegg W., Elsegood M., Griffin R.J. Protecting-group strategies for the synthesis of N-4-substituted and N-1, N-8-disubstituted spermidines, exemplified by hirudonine // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.* – 1999. – Vol. 1. – № 3. – P. 349-356.
9. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // *Вопросы медицинской химии.* – 1984. – Т. 30. – № 4. – С. 127-132.

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА БИОПЛЕНКИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Евстратенко А. Л., Метлева А. С.

Кузбасская государственная сельскохозяйственная академия, Кемерово, Россия

Аннотация. В статье приведены результаты исследований на определения способности растительных экстрактов ингибировать биопленки условно-патогенных микроорганизмов на питательной среде в условиях *in vitro*. Для эксперимента были отобраны фито экстракты, обладающие способностью ингибировать рост биопленок микроорганизмов: зверобой (трава), клюква (ягода), кора дуба, гвоздика (цветок), эхинацея, тысячелистник.

Ключевые слова: биопленки, растительные экстракты, микроорганизмы, антибактериальная резистентность.

INFLUENCE OF PLANT EXTRACTS ON BIOFILMS OF OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS

Evstratenko A. L., Metleva A. S.

Kuzbass State Agricultural Academy, Kemerovo, Russia

Abstract. The article presents the results of studies to determine the ability of plant extracts to inhibit biofilms of opportunistic microorganisms on a nutrient medium *in vitro*. For the experiment, phytoextracts were selected that have the ability to inhibit the growth of biofilms of microorganisms: St. John's wort (grass), cranberry (berry), oak bark, carnation (flower), echinacea, yarrow.

Keywords: biofilms, plant extracts, microorganisms, antibacterial resistance.

Биоплёнки представляют собой развитую популяцию природных бактерий, объединенную в патогенную клетку. Из-за защитной функции матрицы бактериальные биопленки становятся стойкими к воздействию антибиотиков и других лекарственных средств, а это значит, что бактерии участвуют в возникновении воспалительного процесса, что приводит к повреждению тканей организма и уменьшает процесс фагоцитоза. На этапе созревания биопленки, при котором происходит необратимое прикрепление ее к полимерной матрице возникает чувствительность к антибиотикам, которая, вскоре, приводит к образованию микроколоний. Такие микроколонии способны полностью противодействовать антибиотиком, что и является отличительной чертой биопленок патогенных бактерий [5]. Бактерии сохраняют свою антибиотикорезистентность до тех пор, пока биопленка не будет разрушена. При ее разрушении бактерии становятся восприимчивыми к лечению антибиотиками [1].

Инфекционные болезни начинают развиваться из-за взаимодействия микробов с макроорганизмами, что в конечном итоге может привести к затруднениям в лечении инфекции и возникновению осложнений у сельскохозяйственных животных [3]. Поиск препаратов, способных разрушать биопленочные образования является актуальным на сегодняшний день, ведь восприимчивость к антибактериальным агентам способствует сильному затруднению при лечении воспалительных процессов в организме сельскохозяйственных животных [5]. Самыми перспективными способами борьбы с патогенными биопленками является применение растительных экстрактов и продуктов их метаболизма. Воздействия экстрактов растений достаточно, чтобы предотвратить развитие воспалительного процесса и снизить риск возникновения осложнений болезни у сельскохозяйственных животных [2]. Растительные экстракты являются менее токсичными при лечении сельскохозяйственных животных из-за природного происхождения [6].

Многие ученые занимались изучением воздействия водных экстрактов на биопленках различных видов микроорганизмов (таб.1).

Таблица 1 – Рост биопленок микроорганизмов к водным экстрактам из растительного сырья

Растительный экстракт	Микроорганизмы, обладающие чувствительностью к растительному экстракту	Источник литературы
Экстракт зверобоя	<i>Escherichia coli</i> , <i>Shigella dysenteriae</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	[4]
Экстракт клюквы	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	[6]
Экстракт коры дуба	<i>S. aureus</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	[1]
Экстракт цветка гвоздики	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	[5]
Экстракт эхинацеи	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , и <i>Candida albicans</i>	[3]
Экстракт тысячелистника	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	[2]

Цель исследования – определить способность растительных экстрактов из растений, прорастающих на территории СФО ингибировать биопленки условно-патогенных микроорганизмов – основных возбудителей заболеваний сельскохозяйственных животных.

Задачей исследования является изучение способности растительных экстрактов подавлять рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*.

Материалы и методы исследования.

В качестве ингибиторов роста биопленок были выбраны следующие растительные экстракты двух форм (водно-глицериновые и водорастворимая форма): экстракт травы зверобоя, экстракт ягоды клюквы, экстракт коры дуба, экстракт цветков гвоздики, экстракт эхинации, экстракт тысячелистника.

В качестве тест-культур использовали микроорганизмы: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*.

Биопленки выращивали на стерильных мембранных дисках на среде МПА в термостате при температуре 37 °С в течение 6 суток. В первый день в стерильные чашки Петри помещали мембраны в ламинарный бокс и стерилизовали их ультрафиолетовым излучением с каждой стороны, затем разведенные культуры в физ. растворе по Стандарту мутности (БАК-10), добавляли на каждую мембрану отдельно и оставляли на ночь в ламинарном боксе. На следующий день мембранные диски с высохшей жидкостью сеяли на питательную среду МПА и инкубировали в термостате при температуре 37 °С 24 часа. На следующий день мембранные диски пересевали на свежесваренную питательную среду МПА, инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение двух суток. После этого мембранные диски промывали в стерильном физ. растворе в каждой отдельной пробирке, затем мембраны сеяли на свежесваренную питательную среду МПА и инкубировали при температуре 37 °С сутки. На следующий день мембраны с культурами: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*, сеяли на питательный агар МПА с экстрактами: водно-глицериновый экстракт травы зверобоя, водорастворимая форма экстракт зверобоя, водно-глицериновый экстракт клюквы (ягода), водно-глицериновый экстракт коры дуба, водорастворимая форма экстракт коры дуба, водно-глицериновый экстракт гвоздики (цветок), водно-глицериновый экстракт эхинацеи, водорастворимая форма экстракт эхинацеи, водно-глицериновый экстракт тысячелистника (9 чашек) и на агар без экстракта (1 чашка), инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение суток.

Результаты исследования.

Следующие растительные экстракты обладают способностью сдерживать рост биопленок условно-патогенных микроорганизмов.

Водорастворимая форма экстракт зверобоя, концентрация – 5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *S. aureus*.

Водно-глицериновый экстракт клюквы (ягода), концентрация – 2% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. faecalis*, *P. mirabilis*, не значительное подавление роста микроорганизма-*B. cereus*.

Водно-глицериновый экстракт коры дуба, концентрация – 2,5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *P. mirabilis*, не значительное подавление роста микроорганизма -*B. cereus*.

Водорастворимая форма экстракт коры дуба, концентрация – 5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, не значительное подавление роста микроорганизма -*B. cereus*.

Водно-глицериновый экстракт гвоздики (цветок), концентрация – 2,5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*.

Водно-глицериновый экстракт эхинацеи, концентрация – 2,1% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *B. cereus*.

Водорастворимая форма экстракт эхинацеи, концентрация – 5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus*.

Водно-глицериновый экстракт тысячелистника, концентрация – 2,5% подавляет рост биопленок микроорганизмов: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*, *B. cereus* (таб. 2).

Таблица 2 – Рост биопленок на среде с растительными экстрактами. – роста нет; + рост есть, +/- слабый рост

№ п/п	Название растительного сырья	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>P.mirabilis</i>	<i>B.cereus</i>
1	Контроль без экстрактов	+	+	+	+	+
2	Водно-глицериновый экстракт травы зверобоя, ω – 5%	+	+	+	+	+
3	Водорастворимая форма экстракт зверобоя, ω – 5%	-	-	+	+	+
4	Водно-глицериновый экстракт клюквы (ягода), ω – 2%	+	+	-	+	+/-
5	Водно-глицериновый экстракт коры дуба, ω – 2,5%	+	+	+	-	+/-
6	Водорастворимая форма экстракт коры дуба, ω – 5%	-	+	+	+	+/-
7	Водно-глицериновый экстракт гвоздики (цветок), ω – 2,5%	-	-	-	-	-
8	Водно-глицериновый экстракт эхинацеи, ω – 2,1%	-	-	+	-	-
9	Водорастворимая форма экстракт эхинацеи, ω – 5%	-	+	-	-	-
10	Водно-глицериновый экстракт тысячелистника, ω – 2,5%	-	-	-	-	-

Вывод. Подавляют рост биопленок условно-патогенных микроорганизмов такие экстракты как: водорастворимая форма экстракт зверобоя, водно-глицериновый экстракт клюквы (ягода), водно-глицериновый экстракт коры дуба, водорастворимая форма экстракт коры дуба, водно-глицериновый экстракт гвоздики (цветок), водно-глицериновый экстракт эхинацеи, водорастворимая форма экстракт эхинацеи, водно-глицериновый экстракт тысячелистника.

Закключение. В связи с выявленными способностями растительных экстрактов подавлять формирование биопленок необходимо проводить дальнейшие исследования, направленные на разработку лекарственных препаратов на растительной основе для лечения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

Библиографический список

1. Anna A. Tolmacheva, Dmitry G. Deryabin. Antibacterial and Anti-Quorum Sensing Molecular Composition Derived from *Quercus cortex* (Oak bark) Extract // *Molecules* – 2015. Vol. 20, № 9. – P. 115-125
2. Austin Jaehyun Kim, Kate Nelson, Angelle Bullard-Roberts. The Chemical and Antibacterial Evaluation of St. John's Wort Oil Macerates Used in Kosovar Traditional Medicine // *Frontiers in Microbiology* – 2017. Vol. 10, № 3. – P. 21-34
3. Dorota Wojnicz, Dorota Tichaczek-Goska, Kamila Korzekwa. Study of the impact of cranberry extract on the virulence factors and biofilm formation by *Enterococcus faecalis* strains isolated from urinary tract infections // *International Journal of Food Sciences and Nutrition* – 2016. Vol. 67, № 8. – P. 1005-1016
4. Fariba Fathi, Maryam Sadrnia, Mohammad Arjomandzadegan. In vitro and in vivo evaluation of antibacterial and anti-biofilm properties of five ethnomedicinal plants against oral bacteria by TEM // *Phytomedicine*. – 2021. Vol. 11, № 2. – P. 180–189
5. Gislene G. F. Nascimento, Juliana Locatelli, Paulo C. Freitas, Giuliana L. Silva. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria // *Brazilian Journal of Microbiology*– 2015. – Vol. 4, № 2. – P. 118-130.
6. Kerry L. LaPlante, Simon A. Sarkisian, Suzanne Woodmansee, David C. Rowley, Navindra P. Seeram. Effects of Cranberry Extracts on Growth and Biofilm Production of *Escherichia coli* and *Staphylococcus* / *Phytotherapy Research*. – 2012. Vol. 26, № 9. – P. 1371-1374.

ФИТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ АКТИНОБАКТЕРИЙ *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* NG28 – ПРОДУЦЕНТА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ

Елисеева А.Д.^{1,2}, Мочалова Е.М.¹, Максимов А.Ю.^{1,2}

¹Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

²Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. Исследовано влияние инокуляции культуры актинобактерии *R. erythropolis* NG28 – продуцента нитрилгидратазы на рост растений томатов скороспелого сорта «Балконное чудо». Выявлено стимулирование роста модельных растений штаммом NG28 по сравнению с вариантами с внесением термоинактивированных бацилл, а также культуры *R. erythropolis* A1, не проявляющей нитрилтрансформирующей способности, выражающееся в повышении морфометрических показателей более чем на 10%.

Ключевые слова: ауксин, индол-3-ацетонитрил, *Rhodococcus erythropolis*, нитрилаза.

PHYTOSTIMULATING ACTIVITY OF THE CULTURE OF ACTINOBACTERIA *RHODOCOCCUS ERYTHROPOLIS* NG28 – PRODUCER OF NITRILE HYDRATASE

Eliseeva A.D.^{1,2}, Mochalova E.M.¹, Maksimov A.Yu.^{1,2}

¹ Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

² Perm State National Research University, Perm, Russia.

Abstract. The effect of inoculation of the culture of the actinobacterium *R. erythropolis* NG28, a producer of nitrile hydratase, on the growth of tomato plants of the precocious variety «Balcony Miracle» was investigated. Stimulation of the growth of model plants with the NG28 strain was revealed in comparison with the variants with the introduction of thermo-inactivated bacteria, as well as the culture of *R. erythropolis* A1, which does not exhibit nitriltransforming ability, expressed in an increase in morphometric indicators by more than 10%.

Keywords: auxin, indole-3-acetonitrile, *Rhodococcus erythropolis*, nitrilase.

Метаболизм нитрилов свойственен многим группам микроорганизмов, однако обнаруживается лишь у небольшой части изолятов проявляющих его видов и, как правило, слабо выражен. В то же время бактерии, обладающие высоким уровнем биосинтеза ферментов нитрилаз и нитрилгидратаз, имеют большое значение для биотехнологии [1]. Биокаталитический синтез акриламида – основы производства широкого спектра современных полимерных материалов, направляемый клеточной массой бактерий–продуцентов нитрилгидратаз, является первым успешным примером применения биокатализа в крупнотоннажном химическом синтезе [2].

Соединения, содержащие нитрильные группы, являются естественными метаболитами растений и некоторых бактерий. В частности, индол-3-ацетонитрил (ИАН) является предшественником индолилуксусной кислоты (ИУК) – фитогормона ауксина, стимулирующего рост корневой системы растения, в одном из минорных путей его биосинтеза [3-5]. Известно, что растения секретируют исходное соединение в составе экссудата ризосферы корней в почву. Этим объясняется обнаруженное у некоторых нитрилтрансформирующих бактерий свойство – стимулировать рост растений при внесении в почвенную среду [5,6]. Однако такая способность зависит от многих факторов: специфичности ферментов – их возможности трансформировать ИАН в ИУК, транспорта субстрата и продукта трансформации через клеточную мембрану, от возможности бактерий утилизировать ИУК, а также от других аспектов взаимодействия бактерий и растений и от множества средовых факторов. Ростстимулирующее воздействие известно у продуцентов ферментов нитрилаз, но мало исследовано у бактерий – продуцентов нитрилгидратаз, потенциально также способных к трансформации ИАН в ИУК в двустадийной реакции [7,8]. Также известно, что индол-3-ацетонитрил является эффективным индуктором нитрилгидратазной активности у некоторых культур бактерий [8].

Для анализа влияния на рост модельных растений ранее селекционированного в Лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН штамма *Rhodococcus erythropolis* NG28, обладающего нитрилгидратазной активностью, проведен эксперимент по инокуляции культуры, выращенной до стационарной фазы, отмытой и ресуспендированной в дистиллированной воде, в почвенную среду в количестве 50 мг по сухому весу клеток на 200 г по сухому весу садовой почвы. В качестве модельного растения использован скороспелый низкорослый сорт томатов закрытого грунта «Балконное чудо».

Эксперимент был проведен в трёх вариантах:

1 – Контроль, без внесения живых бактериальных культур (внесена инактивированная биомасса бактерий *R. erythropolis* NG28).

2 – Штамм *R. erythropolis* A1 без нитрилгидролизующей активности.

3 – Штамм *R. erythropolis* NG28 – продуцент нитрилгидратазы (табл. 1).

В инокулированный грунт высаживали 15-суточные проростки растений, выращенные предварительно в равных условиях в лотках в том же грунте без добавок.

Выращивание проводили в условиях светокультуры в фитотроне при температуре 25°C в условиях 15-часового фотопериода (рисунок 1).



Рисунок 1 – Культивирование растений в фитотроне.

Результаты измерения морфометрических параметров после культивирования в течение 40-ка суток представлены в таблице.

Таблица – Средние морфометрические параметры томатов на 40-ые сутки роста

Вариант	Длина корня, см	Длина побега, см	Сырая масса, г		Сухая масса, г	
			Корня	Побега	Корня	Побега
1	4.4±	14.6±	1.23±	8.41±	0.15±	0.91±
	1.31	1.32	0.35	0.41	0.04	0.21
2	4.8±	15.2±	1.38±	9.56±	0.16±	0.95
	1.43	1.84	0.15	1.54	0.07	0.17
3	7.7±	16.7±	1.85±	12.7±	0.27±	1.34±
	1.49	2.17	0.71	1.91	0.09	0.19

Обнаружено, что при выращивании томатов в контрольном варианте с термически инактивированной биомассой наблюдается сворачивание верхних листьев и пожелтение нижних листьев, что свидетельствует о диспропорции минерального обмена.

Морфометрические показатели обывного варианта, содержащего культуру *R. erythropolis* NG28 – продуцент нитрилгидратазы, более чем на 10% превышали таковые в контрольном варианте и в варианте с культурой *R. erythropolis* A1, не обладающей нитрилгидролизующей активностью. Опытные растения имели равномерную ярко-зеленую окраску. Отмытая корневая система была наиболее развита по длине, по степени развития и по весовым показателям, имела здоровый вид без повреждений, пятен и поражения патогенами.

Таким образом, в результате эксперимента выявлено влияние добавления культуры *R. erythropolis* NG28 – продуцента нитрилгидратазы, стимулирующее рост модельных растений. Данная культура представляется перспективной для получения микробных препаратов, нормализующих корневую микрофлору и стимулирующих продуктивность растений.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3.

Библиографический список

1. Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Козлов С.В., Демаков В.А, Влияние нитрилов и амидов на рост и нитрилгидратазную активность штамма *Rhodococcus* sp. gt 1 // Прикл. биохим. микробиол. – 2003. – Т.39. – №1. – С.63-68.
2. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Козлов С.В., Овечкина Г.В., Олонцев В.Ф. Гидролиз акрилонитрила клетками нитрилконвертирующих бактерий, иммобилизованными на волокнистых углеродных адсорбентах // Биотехнология. – 2010. – № 4. – С. 51-58.
3. Kobayashi M., Izui H., Nagasawa T., Yamada H.. Nitrilase in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid from indole-3-acetonitrile: cloning of the *Alcaligenes* gene and site-directed

- mutagenesis of cysteine residues // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90. – №1. – C. 247-251.
4. Mascharak P.K. Structural and functional models of nitrile hydratase // Coordin. Chem. Rev. – 2002. – V. 225. – P. 201-214.
 5. Bartling D., Seedorf M., Mithöfer A. et al. Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid // Eur. J. Biochem. – 1992. – V. 205. – P. 417-424.
 6. Duca D., Rose D.R., Glick B.R. Characterization of a nitrilase and a nitrile hydratase from *Pseudomonas* sp. strain UW4 that converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid // Appl. Environ. Microbiol. – 2014. – V.80. – №15. – P.4640-4649.
 7. Zhao Y.X., Guo L.L., Sun S.L., Guo J.J., Dai Y.J. Bioconversion of indole-3-acetonitrile by the N₂-fixing bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC 7333 and its *Escherichia coli*-expressed nitrile hydratase // Int. Microbiol. – 2020. – V.23. – №2. – P.225-232.
 8. Kobayashi M., Fujita T., Shimizu S. Hyperinduction of nitrile hydratase acting on indol-3-acetonitrile in *Agrobacterium tumefaciens* // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1996. – V. 45. – №1-2. – P. 176-181.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ ИОННЫЕ КАНАЛЫ

Зырянова П.И., Уласевич С.А.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия.

Аннотация. В настоящей работе описано исследование кальциевых каналов клеточной линии C2C12 с помощью электрохимических методов, ионоселективных электродов. Активация каналов осуществляется с помощью норадреналина.

Ключевые слова: кальциевые каналы, ионные каналы, норадреналин, клеточная коммуникация.

STUDY OF SIGNAL TRANSMISSION THROUGH ION CHANNELS

Zyrianova P.I., Ulasevich S.A.

ITMO University, Infochemistry Scientific Center, St. Petersburg, Russia

Abstract. This paper describes the study of calcium channels in the C2C12 cell line using electrochemical methods and ion-selective electrodes. The channels are activated by noradrenaline.

Keywords: calcium channels, ion channels, noradrenaline, cellular communication.

Ионные каналы представлены в виде интегральных мембранных белков, которые контролируют канал нескольких ионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Cl^-) через липидные мембраны в клетках. Перенос ионов по открытому ионному каналу определяется электрохимическим градиентом для конкретных ионов через рассматриваемую мембрану [1]. Ионные каналы способствуют выполнению ряда функций. Так, они регулируют рН, объем клетки и внутриклеточную концентрацию различных ионов, обеспечивают пассивный транспорт ионов и воды через мембрану [2]. В свою очередь, кальциевые каналы помимо вышеперечисленных функций принимают участие в электрогенезе, поддержании определенной внутриклеточной концентрации ионов кальция, инициации секреции медиаторов и гормонов, формировании кратковременных и долговременных форм синаптической пластичности в центральной нервной системе, регуляции экспрессии генов и т. д. Для изучения ионных каналов в возбужденных тканях используются различные электрофизиологические, биохимические, фармакологические, генетические и другие методы. В представленной работе применяются электрофизиологические методы, которые заключаются в регистрации потенциалов и токов, протекающих через мембрану возбудимой клетки [3].

Данное исследование направлено на исследование внеклеточных коммуникаций и взаимодействий по ионным каналам. Измерение внеклеточного тока проводилось с помощью

ионоселективных электродов (ИСЭ), которые обладают такими преимуществами как высокая эффективность, точность и избирательность.

ИСЭ были изготовлены на углеродном волокне и модифицированы полиэлектролитами (полиэтиленимин (PEI) и поли(4-стиролсульфонат) (PSS)) методом послойного осаждения (МПО). Схема сборки ИСЭ представлена на рисунке 1. Сборка МПО была успешно реализована на катионообменной мембране, которая включает ионофор, обратимо связывающийся с определенным ионом. Такой подход обеспечивает высокую стабильность при измерении и хранении датчиков [4,5]. ИСЭ были погружены в растворы соответствующих солей (KCl, NaCl, CaCl₂). Далее проводилась калибровка полученных электродов на стандартных растворах соответствующих солей (концентрации растворов: 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻² моль/л). Значения потенциала непрерывно контролировалось с помощью потенциостата. Электродвижущая сила измерялась между рабочим ИСЭ и электродом сравнения.

Миоциты C2C12 были выбраны в качестве контрольной клеточной линии для исследования кальциевых каналов из-за их высокой чувствительности к ионам Ca²⁺. Так, после предварительной калибровки электроды погружали в среду с клетками для обнаружения ионов кальция. Активация кальциевых каналов проходила добавлением рецептора, связанного с G-белком, норадреналина в различных концентрациях. В ходе работы проводилось фиксирование скачков тока, которые связаны с клеточной коммуникацией и доказывают ее активность во время активации каналов.

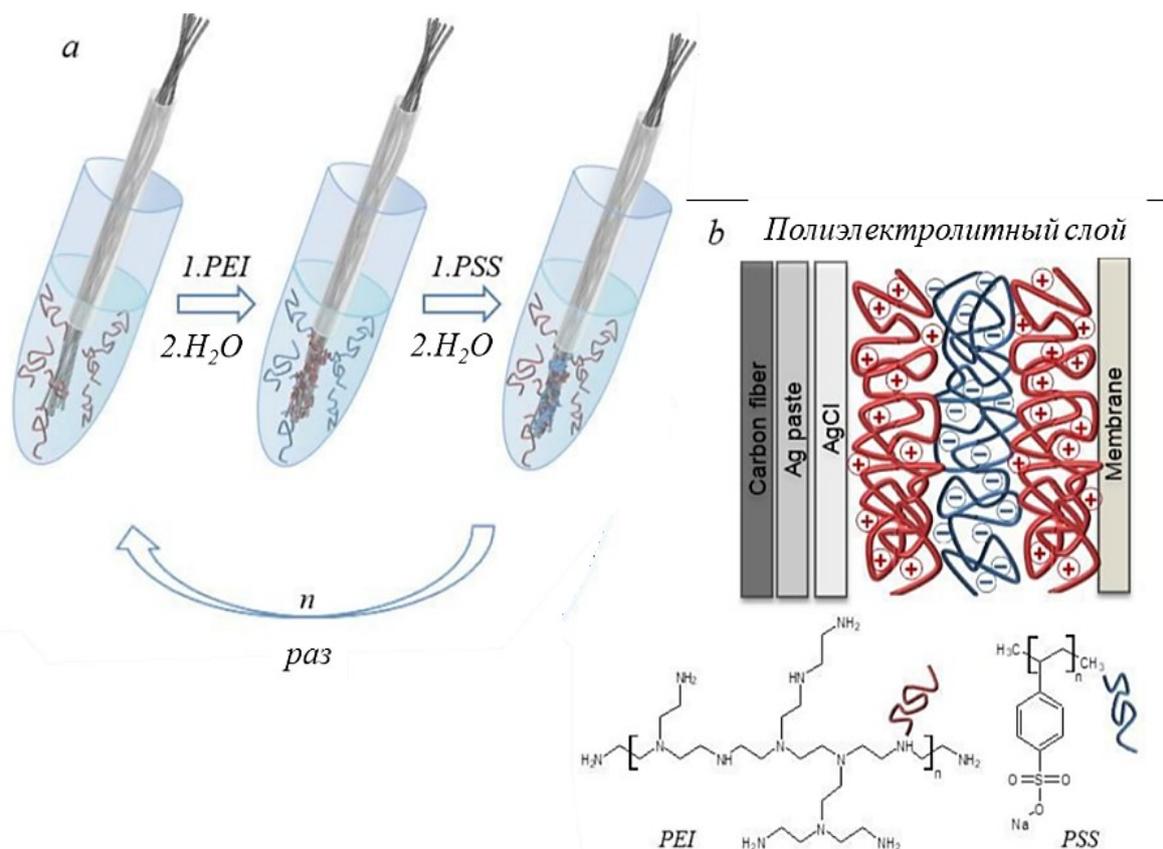


Рисунок 1 – Модификация углеродного волокна послойной сборкой полиэлектролита (а), общая схема ионоселективного электрода (б).

Результаты. В результате проведенных экспериментов по определению концентрации ионов в стандартных растворах установлено, что измерения ИСЭ точны и близки к значениям Нернста. Полученные значения представлены на рисунке 2 и в таблице.

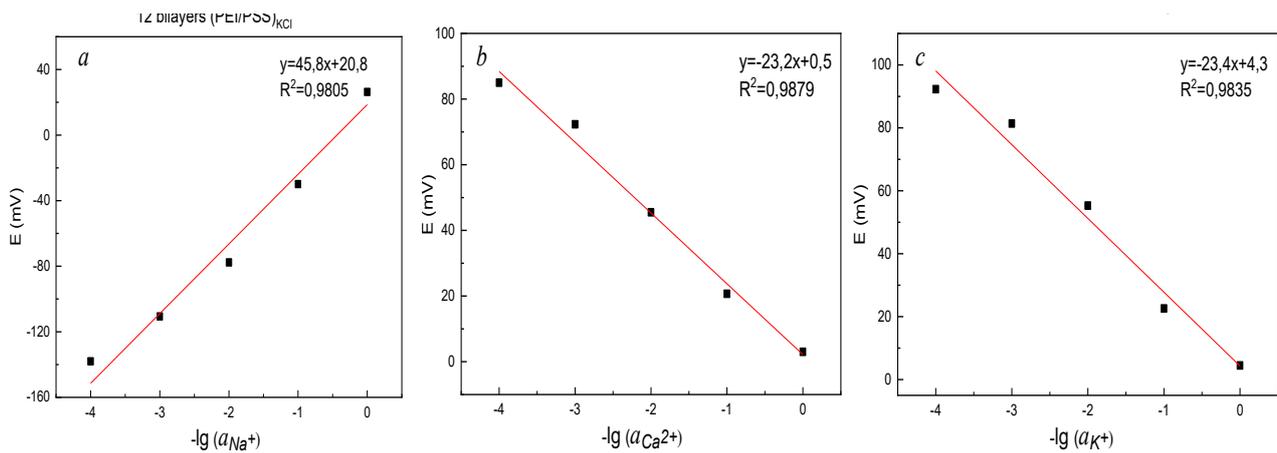


Рисунок 2 – Аналитические измерения ИСЭ: калибровочный график для ИСЭ натрия (а), кальция (б) и калия (в).

Таблица – Калибровочные данные значений ИСЭ

Ион, к которому селективен электрод	Наклон ИСЭ, мВ	Наклон по Нернсту, мВ
K^+	45.0	58.0-59.0
Na^+	49.0	58.0-59.0
Ca^{2+}	30.0	29.0-29.6

Для изучения клеточной коммуникации было предложено использовать паттерны, на которых плотность клеток примерно в 20 раз выше, чем на контрольных покрытиях. Измерения на паттернах проводили в нескольких местах: в центре (где наблюдается повышенная плотность клеток, растущих неупорядоченно), на кольцах, где наблюдается повышенная плотность, но клетки ориентированы вдоль колец из фосфатов кальция и на поверхности вне колец, где наблюдаются преимущественно отдельные клетки, отделенные между собой значительным расстоянием. При изменении потенциалов на контроле с паттернами, но без клеток, изменение потенциала не происходило. Добавление в систему норадреналина, также не приводило к скачкам ионного тока. Добавление в систему небольших количеств хлорида кальция (по 50 мкл) приводило к ожидаемым скачкам ионного тока, который впоследствии при работе с клетками вычитали из значений регистрируемого тока.

Интересно, что при изменении ионных токов на паттернах с клетками в спокойном состоянии (без активации норадреналином) значения потенциалов не сильно отличаются в трех тестовых точках (центр, кольца и вне колец), а также незначительно отличаются (примерно на 0,05 В) от контрольной системы с паттернами, но без клеток. Однако при добавлении хлорида кальция и вычитания фонового сигнала, обусловленного введением в систему ионов кальция), наблюдались резкие скачки тока, обусловленные снижением концентрации ионов кальция, затем повышением, и ещё через некоторое время – стабилизацией.

Для исключения влияния диффузии ионов кальция проводили второй эксперимент с добавлением другого активатора кальциевого канала – норадреналина. Выявлено, что добавление норадреналина также способствует резким скачкам ионного тока, обусловленного высвобождением ионов кальция и перераспределением концентрации ионов кальция в

системе, сопровождаемым скачкообразным изменением концентрации. Однако в случае с норадреналином возвращение системы в спокойное состояние протекает быстрее. Эти факты служат свидетельством того, что кальциевый канал был активирован, следовательно, обеспечивалась клеточная коммуникация в системе.

В результате проведенных исследований выявлено, что ИСЭ на углеродном волокне стабильны в измерениях. Показано, что кальций-селективные электроды подходят для изучения кальциевых каналов. Установлено, что активация клеток, в частности кальциевого канала, происходит как при добавлении CaCl_2 , так и при добавлении норадреналина, причем при добавлении последнего происходит резкое изменение потенциалов в системе. Таким образом, разработанная система может быть перспективна для мониторинга клеточного взаимодействия.

Работа поддержана грантом РФФИ № 19-79-10244.

Библиографический список

1. Shad K.F., Salman S., Afridi S., Tariq M., Asghar S. Introductory Chapter: Ion Channels [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://www.intechopen.com/chapters/63380> (дата обращения: 27.02.2022)
2. Subramanyam P., Colecraft H.M. Ion channel engineering: perspectives and strategies // *Journal of molecular biology*. – 2015 – Т. 427, № 1 – С. 190–204.
3. Nikitina A. A. et al. Nanostructured layer-by-layer polyelectrolyte containers to switch biofilm fluorescence // *Bioconjugate Chemistry*. – 2018. – Т. 29, №. 11. – С. 3793-3799.
4. Stekolshchikova A. A. et al. Thin and flexible ion sensors based on polyelectrolyte multilayers assembled onto the carbon adhesive tape // *ACS omega*. – 2019. – Т. 4., №. 13. – С. 15421-15427.
5. Skorb E.V., Volkova A.V., Andreeva D.V. Layer-by-layer approach for design of chemical sensors and biosensors // *Current Organic Chemistry*. – 2015. – Т. 19, №. 12. – С. 1097-1116

КОМБИНИРОВАНИЕ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНОЛА С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ И 7-ГИДРОКСИКУМАРИНОМ ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ QS-ИНГИБИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА У *CHROMOBACTERIUM SUBSTSUGAE*

Инчагова К.С.^{1,2}

¹ *Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза Уральского отделения Российской академии наук, Оренбург, Россия*

² *Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук, Оренбург, Россия*

Аннотация. Использование малых молекул растительного происхождения в качестве ингибиторов системы «quorum sensing» является перспективным направлением для создания антибактериальных средств нового принципа действия. Выявлена QS-ингибирующая активность 4-гексилрезорцинола, салициловой кислоты и 7-гидроксикумарина. Установлено, что совместное применение 4-гексилрезорцинола и салициловой кислоты, а также 4-гексилрезорцинола и 7-гидроксикумарина приводит к усилению QS-ингибирующего эффекта.

Ключевые слова: quorum sensing, QS-ингибирующий эффект, малые молекулы растительного происхождения, антибиотикорезистентность.

COMBINATION OF 4-HEXYLRESORCINOL WITH SALICYLIC ACID AND 7-HYDROXY-COUMARIN LEADS TO INCREASED QUORUM SENSING INHIBITORY EFFECT IN *CHROMOBACTERIUM SUBSTSUGAE*

Inchagova K.S.^{1,2}

¹ *Institute for Cellular and Intracellular Symbiosis of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Orenburg, Russian Federation*

² *Federal Research Centre of Biological Systems and Agrotechnologies RAS, Orenburg, Russian Federation*

Abstract. The use of plant-derived molecules as inhibitors of the «quorum sensing» system is a promising direction for the creation of antibacterial agents of a new principle of action. The QS inhibitory activity of 4-hexylresorcinol, salicylic acid, and 7-hydroxy-coumarin was revealed. It was found that the combined use of 4-hexylresorcinol and salicylic acid, as well as 4-hexylresorcinol and 7-hydroxy-coumarin leads to an increased QS inhibitory effect.

Keywords: quorum sensing, QS inhibitory effect, plant-derived molecules, antibiotic resistance.

Неконтролируемое применение антибиотиков в медицинской и ветеринарной практике на сегодняшний день привело к повсеместному распространению бактериальной резистентности к широкому кругу антимикробных средств. Данная проблема обозначила

интерес к поиску новых подходов по борьбе с болезнетворными микроорганизмами. Вариантом выхода из данной ситуации может стать воздействие на систему плотностно-зависимой химической коммуникации, также известную как «quorum sensing» (QS), поскольку данный феномен играет ключевую роль в реализации патогенного потенциала бактерий, контролируя синтез факторов вирулентности и биопленкообразование [1].

Публикаций о способности растительных экстрактов и идентифицированных в них малых молекул растительного происхождения ингибировать QS у бактерий представлено значительное количество [2, 3]. Однако существует ряд ограничений использования данных соединений в качестве ингибиторов QS, в первую очередь, связанных с токсичностью применяемых растительных компонентов [4, 5]. В последнее время широкое распространение получило исследование воздействия комбинаций малых молекул растительного происхождения с веществами той же или иной природы с целью усиления QS-ингибирующего действия [6, 7].

В этой связи, целью данного исследования стало изучение QS-ингибирующего эффекта 4-гексилрезорцинола, салициловой кислоты и 7-гидроксикумарина в отношении виолацеинпродуцирующего штамма *Chromobacterium substsugae* ATCC 31532 (ранее *C. violaceum* ATCC 31532) и их последующее комбинирование для усиления выявленной активности каждого растительного компонента.

На первом этапе исследования была проведена оценка рост- и QS-ингибирующего действия в отношении штамма *C. substsugae* ATCC 31532. Для этого в ячейках 96-луночного планшета (Jet Biofil, Канада-Китай) формировались ряды двукратных разведений исследуемых веществ в LB-бульоне (Sigma-Aldrich, США). Соответствующие объемы LB-бульона, не содержащие названных компонентов, использовали в качестве положительного (рост тест-штамма) и отрицательного (стерильного) контролей. Далее ячейки инокулировали *C. substsugae* ATCC 31532 и инкубировали при 27°C в течение 24 часов. Оценку рост-ингибирующего эффекта фиксировали, регистрируя значения оптической плотности выросшей биомассы при длине волны 450 нм, выражая их значениями МИК₁₀₀ и МИК₅₀, соответствующими 100% и 50% подавлению роста тест-штамма. Подавление системы QS регистрировали по измерению оптической плотности сине-фиолетового пигмента виолацеина после его этанольной экстракции при длине волны 600 нм, выражая ее величинами ЕС₁₀₀ и ЕС₅₀, соответствующими 100% и 50% интенсивности воздействия на биосинтез пигмента в растущей культуре. Оба измерения проводили с использованием многофункционального микропланшетного ридера Infinite 200 PRO («Tecan», Австрия).

В ходе эксперимента было выявлено, что каждое из исследуемых веществ обладает как рост-, так и QS-ингибирующей активностями в отношении виолацеинпродуцирующего штамма *C. substsugae* ATCC 31532, возрастающими в ряду салициловая кислота → 7-гидроксикумарин → 4-гексилрезорцинол.

Дальнейшие работы были направлены на формирование парных композиций малых молекул растительного происхождения: 4-гексилрезорцинол + салициловая кислота; 4-гексилрезорцинол + 7-гидроксикумарин и салициловая кислота + 7-гидроксикумарин. Для этого в ячейки 96-луночного планшета (Jet Biofil, Канада-Китай) в перпендикулярных друг другу направлениях вносили двукратные разведения исследуемых веществ, таким образом, что в каждой из ячеек формировалось индивидуальное соотношение «вещество А : вещество Б».

Пробами сравнения являлись ряды разведений, содержащие только одно из тестируемых соединений, а также положительный и отрицательный контроли. Дальнейшие инокуляцию *C. substsugae* ATCC 31532, культивирование и учет результатов исследования проводили, как

описано выше. Характер взаимодействия двух веществ определяли с помощью изоболографического анализа [8].

Результатом эксперимента стало выявление двух аддитивных композиций: 4-гексилрезорцинол + салициловая кислота и 4-гексилрезорцинол + 7-гидроксикумарин, о чем свидетельствовало расположение большинства экспериментальных точек ниже линии изоболы (рис. а-б).

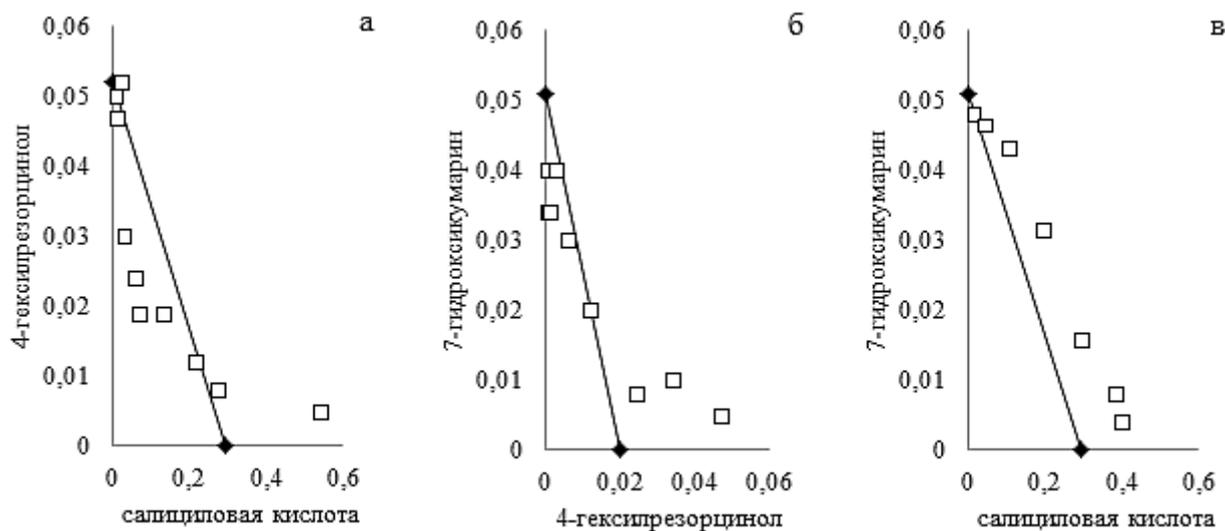


Рисунок – Изоболографический анализ совместного воздействия комбинаций 4-гексилрезорцинола и салициловой кислоты (а), 4-гексилрезорцинола и 7-гидроксикумарина (б), салициловой кислоты и 7-гидроксикумарина (в) на QS-зависимый биосинтез пигмента виолацеина в культуре *C. substisugae* ATCC 31532. Изоболы представлены в виде прямых линий, соединяющих концентрации каждого из соединений, вызывающих одинаковый биологический эффект (50% подавление биосинтеза виолацеина; EC₅₀). Результат совместного действия двух соединений показан путем нанесения на график точек с координатами, соответствующими концентрациям в композиции, обеспечивающим достижение EC₅₀

Так QS-ингибирующей эффект композиции 4-гексилрезорцинол + салициловая кислота превосходил контрольные значения EC₅₀ в 1,2-5 раз. В свою очередь, комбинация 4-гексилрезорцинол + 7-гидроксикумарин характеризовалась увеличением QS-ингибирующей активности в 1,2-3 раза по сравнению с контролем. На этом фоне, композиция салициловая кислота + 7-гидроксикумарин не обладала способностью к усилению QS-ингибирующего действия, демонстрируя выраженный антагонистический эффект (рис. 1в), о чем свидетельствовало расположение всех экспериментальных точек выше линии изоболы.

Таким образом, выявленные аддитивные композиции формируют основу для их дальнейшего тестирования в качестве потенциального антибактериального средства, основным критерием которого должно стать отсутствие токсического эффекта в отношении животных и человека. Более того, полученные композиции могут стать основой для их комбинирования с традиционно применяемыми лекарственными средствами, которые назначают для лечения бактериальных инфекций, использующих систему QS для реализации своего патогенного потенциала. Создание тройной композиции позволит снизить дозировки используемых компонентов, не снижая при этом общей эффективности препарата, а также

может помочь решить проблему антибиотикорезистентности за счет различных механизмов действия каждого из них на бактериальную клетку.

Работа поддержана грантом Президента Российской Федерации (проект № МК-3114.2022.1.4).

Библиографический список

1. Defoirdt T. Quorum-sensing systems as targets for antivirulence therapy // *Trends Microbiol.* – 2018. – V. 26. – № 4. – P. 313-328.
2. Berde C.V., Salvi S.P., Rawool P.P., Prathyusha A.M.V.N., Berde V.B. Role of Medicinal Plants and Endophytic Bacteria of Medicinal Plants in Inhibition of Biofilm Formation: Interference in Quorum Sensing // *Implication of Quorum Sensing and Biofilm Formation in Medicine, Agriculture and Food Industry.* – 2019. – P. 177-188.
3. Deryabin D., Galadzhieva A., Kosyan D., Duskaev G. Plant-derived inhibitors of AHL-mediated quorum sensing in bacteria: Modes of action // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – № 22. – P. 5588.
4. Thooptianrat T., Chaveerach A., Sudmoon R., Tanee T., Liehr T., Babayan N. Screening of phytochemicals and toxicity of medicinal plants, *Dillenia* species, reveals potential natural product resources // *J. Food. Biochem.* – 2017. – V. 41. – № 3. – P. e12363.
5. Devillers J., Devillers H. Toxicity profiling and prioritization of plant-derived antimalarial agents // *SAR QSAR Environ Res.* – 2019. – V. 30. – № 11. – P. 801-824.
6. Deryabin D., Inchagova K., Rusakova E., Duskaev G. Coumarin's anti-quorum sensing activity can be enhanced when combined with other plant-derived small molecules // *Molecules.* – 2021. – V. 26. – P. 208.
7. Jakobsen T.H., Van Gennip M., Phipps R.K., Shanmugham M.S., Christensen L.D., Alhede M., Skindersoe M.E., Friedrich K., Uthe F., Jensen P.O., Moser C., Nielsen K.F., Eberl L., Larsen T.O., Tanner D., Hoiby N., Bjarnsholt T., Rasmussen T.B., Givskov M. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2012. – V. 56. – № 5. – P. 2314-2325.
8. Tallarida, R.J. An overview of drug combination analysis with isobolograms: perspectives in pharmacology // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – V. 3. – N. 19. – P. 1-7.

ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

Искужина Л.И., Рожина Э.В., Баташева С.Н.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. В данной статье кратко описано исследование бактерицидной активности серебряных наночастиц биогенного происхождения на бактериях *Escherichia coli*. Было установлено, что биогенные наночастицы серебра обладают выраженной антибактериальной активностью в концентрациях от 100 мкг/мл и выше. Результаты этого исследования показали, что они могут быть применены в качестве эффективного бактерицидного средства.

Ключевые слова: биогенные наночастицы серебра, антибактериальная активность.

INVESTIGATION OF BACTERICIDAL ACTIVITY OF BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES

Iskuzhina L.I., Rozhina E.V., Batasheva S.N.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. This article briefly describes the study of the bactericidal activity of biogenic silver nanoparticles on *Escherichia coli* bacteria. It was found that biogenic silver nanoparticles have pronounced antibacterial activity in concentrations ranging from 100 micrograms/ml and higher. The results of this study showed that they can be used as an effective bactericidal agent.

Keywords: biogenic silver nanoparticles, antibacterial activity.

В настоящее время одним из самых быстроразвивающихся и перспективных направлений в науке является нанотехнология. Наноразмерным материалам присущи иные электрические, оптические и температурные свойства, которые определяются их величиной и поверхностными эффектами, значительно отличающимися от их более крупных аналогов [1]. Из огромного выбора материалов для создания наночастиц особое внимание можно уделить серебру, благодаря его антимикробным свойствам. Наночастицы серебра (AgNPs) являются мощными бактерицидными агентами, а наночастицы серебра биологической природы являются выгодной и безопасной альтернативой, благодаря низкой стоимости реагентов и экологически более предпочтительным условиям их получения. Отметим, что необходимость создания биогенных наночастиц возникла в результате поиска аналогов антибиотикам, широкое использование которых привело к мультирезистентности микроорганизмов [2]. Наночастицы серебра могут действовать как улучшенные противомикробные агенты для устранения проблемы такой устойчивости [3], что подчеркивает актуальность проводимых исследований.

Биоцидные свойства наночастиц могут представлять научный интерес в процессе разработки нового класса противомикробных препаратов. На бактерицидную эффективность наночастиц влияют их концентрация, размер и форма, а также покрывающие их стабилизирующие вещества [4,5].

Ранее сообщалось что наночастицы серебра, синтезированные из гриба *Pleurotus cornucopiae* var. *citrinopileatus* показали свою эффективность против патогенных видов рода *Candida*. Дрожжи также использовались в качестве нового биологического восстановителя ионов металлов в процессе синтеза. Сформированные наночастицы серебра проявляли высокую противомикробную и противогрибковую эффективность в отношении *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Trichoderma* sp. [6,7].

В данном исследовании для оценки влияния на микроорганизмы использовали бактерии *Escherichia coli* и биогенные наночастицы серебра шарообразной формы, размером $120 \pm 8,5$ нм, полученные с помощью самосборки в присутствии экстракта мха *Sphagnum fallax*. Мхи рода сфагнум богаты функциональными метаболитами, в результате чего полученным наночастицам можно придать дополнительные свойства. Было показано, что полисахариды, выделенные из сфагнового мха, могут ингибировать рост некоторых видов бактерий [8].

Для исследования антибактериальной активности наночастиц серебра с биогенным покрытием была использована следующая методика: 20 мкл ночной культуры бактерии *E. coli* с концентрацией $2,5 \times 10^9$ КОЕ в 1 мл, оптической плотностью 1 ед., добавляли в лунки 96-луночного планшета. В лунки также добавлялось по 20 мкл суспензии наночастиц заданной концентрации (200, 100, 75, 50, 25, 12,5 и 6,25 мкг/мл), а также по 160 мкл среды LB (Lysogeny broth). Контрольные лунки не содержали наночастиц, лунки с бланками не содержали ночной культуры. Опыт проводился 3 раза, с 6-кратной и 8-кратной повторностью в каждом из вариантов. Инкубация проходила при 37°C , в течение 48 часов при постоянном помешивании. Каждый час проводилось измерение оптической плотности суспензии (595 нм), при помощи анализатора Multiskan FC. Полученные результаты представили в виде линейной диаграммы кривых роста численности (рисунок).

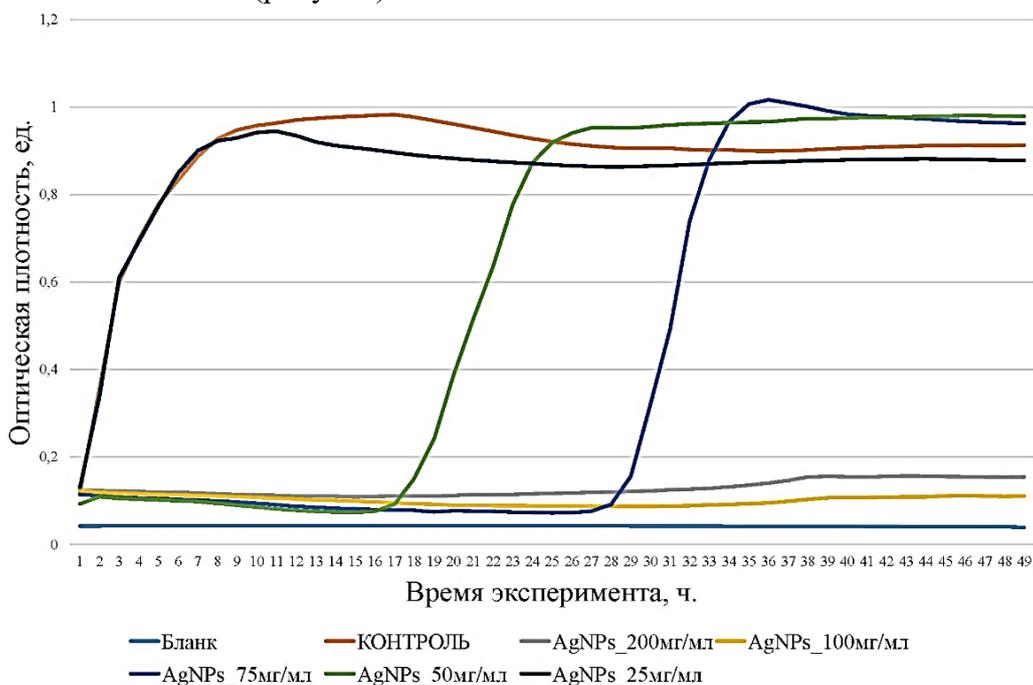


Рисунок – Кривые роста бактериального штамма *E.coli* после воздействия наночастиц серебра в концентрациях 25 – 200 мкг/мл.

Кривые роста, каждая из которых соответствует определенной концентрации наночастиц, можно разделить на три группы. В первой группе ингибирующий эффект отсутствовал. Это лунки с концентрациями наночастиц 6,25, 12,5 и 25 мкг/мл (первые две кривые не обозначены для облегчения рисунка). Кривые практически совпали с контролем *E. coli*, то есть, при этих концентрациях динамика роста бактериальной колонии была аналогичной. Группа полного подавления содержала варианты с концентрациями 100 и 200 мкг/мл. Кривые практически совпадали с кривой бланка, нулевой кривой, в которой не содержалось бактерий. Никакого увеличения численности не было в течение 48 часов. Это означает полное ингибирование *E. coli* наночастицами серебра в концентрациях 100 и 200 мкг/мл. Эти концентрации можно использовать в дальнейшем для эффективного подавления развития бактериальных колоний. Третья группа вариантов – группа умеренного ингибирования, это варианты с концентрациями наночастиц 50 и 75 мкг/мл. В этих группах проявляется интересный эффект частичного подавления. В начале роста практически нет, зато после прохождения определенного количества времени рост начинается и идет так же стремительно, как и в вариантах отсутствия ингибирующего эффекта. Причем концентрация AgNPs 50 мкг/мл замедляет начало роста на 16 часов, а концентрация 75 мкг/мл – на 28 часов. Этот интересный эффект может частично открыть механизм ингибирующего действия биогенных AgNPs на микроорганизмы. Можно предположить, что наночастицы серебра, присутствующие в среде в действующей концентрации, способствуют полному прекращению роста численности микроорганизмов, после чего случается освобождение колонии от ингибирующего эффекта. Это может происходить по причине поглощения наночастиц отмирающими массами бактериальных клеток, в толще которых AgNPs могут оставаться погребенными, не мешая расти и размножаться отдельному количеству случайным образом выживших бактерий. Вторая причина может состоять в том, что 16 и 28 часов длится период тяжелого привыкания единичных бактерий к сублетальным концентрациям 50 и 75 мкг/мл, соответственно. И такое привыкание приводит к полной невосприимчивости в будущем. Возможно, происходит перестройка и переключение на экспрессию определенных специфических генов, помогающих приспособиться к умеренным концентрациям бактерицида. В случае увеличения концентрации до 100 и более мкг/мл не выживают даже отдельные бактерии, что говорит об отсутствии каких-либо механизмов устойчивости к большим концентрациям AgNPs. Данные концентрации могут использоваться в дальнейшем для эффективного подавления развития бактериальных колоний *E. coli*.

Диско-диффузионный метод подтвердил полученные результаты. Диаметры зон ингибирования приведены в таблице. Минимальной действующей концентрацией AgNPs была концентрация 50 мкг/мл. Концентрация 100 мкг/мл была существенно эффективнее.

Таблица – Диапазон ингибирования наночастиц серебра с различной концентрацией

Номер диска	1	2	3	4	5	6	К
Концентрация AgNPs, в мкг/мл	200	100	50	25	12,5	6,25	0
Зона ингибирования, вычет, в мм	3	2	0,5	0	0	0	0
Результат (+, +/-, -)	+	+	+/-	-	-	-	-

Бактерицидная эффективность наночастиц серебра в настоящем исследовании является умеренной по сравнению с эффективностью антибиотиков, таких как стрептомицин, ампициллин, гентамицин. Однако эти коммерческие антибиотики могут вызывать токсические побочные эффекты, такие как нефротоксичность, невропатия, гепатит и т.д. [9]. AgNPs могли бы в будущем стать безопасной и эффективной альтернативой в лечении болезней, вызываемых бактериальными патогенами.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда №21-74-10034.

Библиографический список

1. Лошкарева М. В. Детекция наночастиц ферригидрата в биологических образцах методом ямр-спектроскопии // Сибирский федеральный университет, 2020. – 34 с.
2. Gray, D. A. Multitarget approaches against multiresistant superbugs // *ACS Infectious Diseases*. – 2020. – Т. 6. – №. 6. – С. 1346-1365.
3. Давтян, Э. С. Исследование биологической активности биогенных наночастиц сульфида кадмия // Российско-армянский университет; Ереван, 2020. – 58 с.
4. Holt, K. B., Bard A. J. Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺ // *Biochemistry*. – 2005. – Т. 44. – №. 39. – С. 13214-13223.
5. Qidwai A., Kumar R., Dikshit A. Green synthesis of silver nanoparticles by seed of *Phoenix sylvestris* L. and their role in the management of cosmetics embarrassment // *Green chemistry letters and reviews*. – 2018. – Т. 11. – №. 2. – С. 176-188.
6. Fatima K., Afzal M., Imran A., & Khan Q. M. Bacterial rhizosphere and endosphere populations associated with grasses and trees to be used for phytoremediation of crude oil contaminated soil // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2015. – Т. 94. – №. 3. – С. 314-320.
7. Al-Bahrani, R. Green synthesis of silver nanoparticles using tree oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* and its inhibitory activity against pathogenic bacteria // *Materials Letters*. – 2017. – Т. 186. – С. 21-25.
8. Mellegård, H., Stalheim, T., Hormazabal, V., Granum, P. E., & Hardy, S. P. Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria // *Contamination and Toxicology*. – 2015. – Т. 94. – №. 3. – С. 314-320.
9. Barnhill, A. E. Adverse effects of antimicrobials via predictable or idiosyncratic inhibition of host mitochondrial components // *Antimicrobial agents and chemotherapy*– 2012. –URL: <https://doi.org/10.1128/AAC.00678-12> – Accessed: 23.07.2012.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО ГЛУТАТИОНА У *ESCHERICHIA COLI* ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА ЗАВИСЯТ ОТ СОСТАВА СРЕДЫ

Калашникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия*

Аннотация. Показано, что природа источника серы (SO_4^{2-} или цистин) в среде культивирования влияет на уровень внутри- и внеклеточного глутатиона (GSH) и изменяет характер его перераспределения между средой и клетками при действии антибиотика ципрофлоксацина. Кроме источника серы эффект ципрофлоксацина на уровень GSH зависит от его способности ингибировать рост бактерий при культивировании на разных средах.

Ключевые слова: цистеин, глутатион, скорость роста, ципрофлоксацин, *Escherichia coli*.

CHANGES IN LEVELS OF INTRA- AND EXTRACELLULAR GLUTATHIONE IN *ESCHERICHIA COLI* UNDER THE ACTION OF CIPROFLOXACIN DEPEND ON THE COMPOSITION OF THE MEDIUM

Kalashnikova T.V., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

*Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Russian
Academy of Sciences, Perm, Russia*

Abstract. It was shown that the nature of the sulfur source (SO_4^{2-} or cystine) in the culture medium affects the level of intra- and extracellular glutathione (GSH) and changes the mode of its redistribution between the medium and cells under the action of the antibiotic ciprofloxacin. In addition to the source of sulfur, the effect of ciprofloxacin on the GSH level depends on its ability to inhibit the growth of bacteria when cultivated on different media.

Keywords: cysteine, glutathione, growth rate, ciprofloxacin, *Escherichia coli*.

Трипептид глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин) присутствует у всех эукариот, а также в клетках грамотрицательных бактерий и выполняет множество функций, среди которых регуляция сигнальных путей, активности ферментов, транспорта ионов и защита от окислительного стресса и действия ксенобиотиков [1]. GSH является важнейшим тиоловым редокс-буфером и участвует в поддержании тиол-дисульфидного статуса белков в цитоплазме. Концентрация глутатиона в цитоплазме *E. coli* составляет примерно 5 мМ, в среде культивирования накапливаются микромолярные концентрации GSH. При экспоненциальном росте *E. coli* в аэробных условиях GSH подвергается непрерывной трансмембранной циркуляции между клетками и средой, которая резко нарушается при различных стрессах [2].

Недавно мы показали, что GSH играет важную роль в гомеостазе внутриклеточного цистеина, действуя как цистеиновый буфер при ингибировании синтеза белка [3].

Клетки должны осуществлять строгий регуляторный контроль и поддерживать низкий уровень свободного внутриклеточного цистеина, поскольку цистеин обладает способностью быстро восстанавливать свободное железо в цитоплазме, тем самым стимулируя реакцию Фентона между H_2O_2 и Fe^{2+} , с образованием чрезвычайно токсичного гидроксильного радикала [4,5]. Глутатион является слабым восстановителем железа [4], поэтому встраивание цистеина в молекулу глутатиона представляет собой один из наиболее эффективных механизмов поддержания гомеостаза цистеина при повышении его внутриклеточной концентрации [3].

Концепция, разрабатываемая в последнее десятилетие группой Коллинза и их последователями и вызвавшая активные дебаты в научном сообществе [6], предполагает, что, в отличие от бактериостатических препаратов, действие бактерицидных антибиотиков на их мишени приводит к токсическим изменениям метаболизма, которые сопровождаются увеличением продукции активных форм кислорода (АФК), способствующих летальности антибиотиков [7]. Одним из приводимых аргументов является то, что бактерицидные антибиотики стимулируют синтез глутатиона, вызывая умеренное повышение уровня GSH в сочетании со значительным увеличением GSSG, что может свидетельствовать об антиоксидантном ответе на антибиотикозависимую индукцию АФК и повреждение белков [8]. Фторхинолон ципрофлоксацин относится к бактерицидным антибиотикам, он убивает бактерии путем повреждения их ДНК в результате взаимодействия с ДНК-гиразой и топоизомеразой IV [9]. Ранее сообщалось, что механизм бактерицидного действия хинолонов сопряжен с окислительным стрессом [10-12]. В предшествующих работах мы показали, что действие ципрофлоксацина вызывает повышение уровня внутриклеточного GSH и пропорциональное увеличение GSSG [13]. Однако в то же время ускорение синтеза глутатиона и увеличение его внутриклеточного пула было характерной особенностью стрессового ответа при действии бактериостатического хлорамфеникола и при голодании, вызванном истощением глюкозы [14], фосфата [2] или изолейцина [3]. Мы предполагаем, что такое ускорение синтеза GSH является ответом на временное увеличение пула свободного цистеина при резком торможении синтеза белка. Сложность сопоставления результатов, полученных в разных группах исследователей, во многом связана с различием в условиях культивирования, в частности в составе используемых сред. В случае исследования изменений уровня глутатиона это особенно актуально, поскольку цистеин является лимитирующим компонентом при синтезе GSH и его уровень может сильно изменяться в зависимости от источника серы. Поэтому целью данной работы являлось изучение изменений GSH при культивировании *E. coli* на средах, где единственным источником серы был сульфат или цистин (окисленная форма цистеина).

Объектом исследований служил родительский штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio. Использовали 4 варианта среды: 1) среда M9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – 15.13 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, NaCl – 0.5 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – 0.246 г/л, CaCl_2 – 0.011 г/л) с глюкозой (0.2%); 2) среда M9 без сульфата (MgSO_4 заменяли на MgCl_2) с глюкозой (0.2%) и казаминовыми кислотами (CA) (0.2%); 3) среда M9 без сульфата с глюкозой (0.2%) и казаминовыми кислотами (CA) (0.2%) с дробным добавлением 15 μM цистина каждые 30 минут; 4) среда LB. Ночную культуру разбавляли в 80 мл среды до начальной OD_{600} около 0.05 и культивировали в 250-мл колбах на термостатируемом шейкере (37°C, 150 об/мин) до OD_{600} 0.4, после чего в среду вносили ципрофлоксацин (ЦФ) в концентрации 0.03, 0.3 и 3 мкг/мл и

продолжали инкубацию в течение двух часов. Периодически, с интервалом 15-30 минут, отбирали пробы для определения OD_{600} и глутатиона внутри и снаружи клеток. Внеклеточный GSH определяли после быстрой фильтрации проб через мембранные фильтры. Для определения внутриклеточного GSH клетки разрушали ультразвуком в присутствии ЭДТА и осаждали белок с $HClO_4$. Глутатион измеряли спектрофотометрическим циклическим методом Tietze [15], используя реагент дитионитробензоат (DTNB) и глутатионредуктазу. Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя стандартную ошибку и доверительный интервал. Каждый результат показан как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали согласно t -критерию Стьюдента, различия считались значимыми при $p < 0.05$.

Удельная скорость роста (μ_{max}) *E. coli* составляла 0.65 ± 0.01 , 1.12 ± 0.01 и 1.26 ± 0.015 час⁻¹ на среде M9, M9+CA и LB соответственно. Воздействие ципрофлоксацина сопровождалось ингибированием роста бактерий, степень которого зависела от используемой дозы антибиотика и от среды культивирования (рисунок 1).

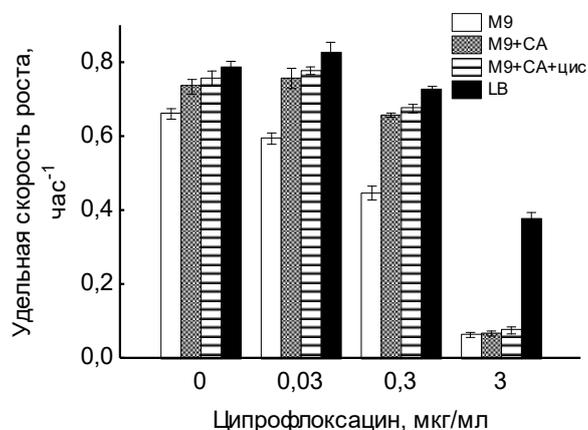


Рисунок 1 – Ингибирование роста *E. coli* при действии ципрофлоксацина на разных средах. Представлены данные через 1 час после добавления антибиотика.

Через 1 час после добавления 0.03 мкг/мл ЦФ статистически значимое снижение μ относительно контроля наблюдалось только у бактерий, растущих на среде M9 без добавок. С повышением дозы антибиотика ингибирующий эффект ЦФ на скорость роста проявлялся на всех средах и был максимальным на среде M9 и минимальным на среде LB.

Среда M9 с CA без бактерий содержала 25 μM цистина, среда LB – 60 μM цистина и 11 μM GSH. Уровень внутриклеточного GSH (GSH_{in}) при росте *E. coli* на среде M9 без добавок линейно изменялся в течение 2 часов с 6.2 ± 0.25 до 8.6 ± 0.35 $\mu M/OD_{600}$. На среде M9 без сульфата, но с CA, GSH_{in} в контроле поддерживался на уровне 5 $\mu M/OD_{600}$. В условиях дробного добавления цистина уровень внутриклеточного GSH повышался до 6.2 ± 0.1 . При росте *E. coli* на среде LB GSH_{in} в контроле составлял 9.5 $\mu M/OD_{600}$ и не изменялся в процессе культивирования. Добавление ципрофлоксацина на всех средах вызывало повышение концентрации глутатиона внутри клеток, максимум которого достигался через 1 час после внесения ЦФ (рисунок 2). Степень эффекта при действии разных доз антибиотика зависела от состава среды. На среде M9+CA, не содержащей сульфат, добавление 3 мкг/мл ЦФ приводило к возрастанию GSH_{in} в 1.5 раза (до 7.5 $\mu M/OD_{600}$). Дополнительное снабжение среды цистином вызывало увеличение GSH_{in} уже при дозах 0.03 и 0.3 мкг/мл ЦФ, а при дозе 3 мкг/мл ЦФ концентрация GSH в цитоплазме достигала 15.3 $\mu M/OD_{600}$, в 3 раза превышая его уровень в контроле.

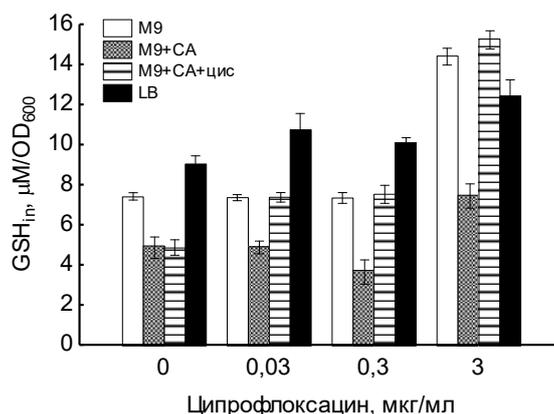


Рисунок 2 – Изменение уровня внутриклеточного глутатиона при действии ципрофлоксацина на разных средах. Представлены данные через 1 час после добавления антибиотика.

На среде M9 с сульфатом внесение 3 мкг/мл ЦФ повышало GSH_{in} в 2.3 раза, остальные концентрации не оказывали эффекта. При росте *E. coli* на среде LB ципрофлоксацин увеличивал внутриклеточный GSH в 1.3 раза при дозе 3 мкг/мл.

Таким образом, максимальное повышение GSH_{in} в ответ на ципрофлоксацин достигалось, когда антибиотик резко ингибировал рост бактерий (3 мкг/мл ЦФ на средах M9 1-3) в условиях интенсивного синтеза цистеина (на среде M9 с сульфатом) или отсутствия его дефицита при дробном снабжении среды экзогенным цистинном. В этих условиях при торможении синтеза белка и других потребляющих цистеин процессов в цитоплазме, по-видимому, возникал избыток цистеина, часть которого встраивалась в глутатион. На среде LB ингибирование роста при действии 3 мкг/мл ЦФ было выражено слабее, чем на других средах (рисунок 1), что могло быть причиной слабого повышения GSH_{in} .

Ранее мы показали, что на второй фазе SOS-ответа при повреждении ДНК, вызванном действием ципрофлоксацина, параллельно с резким ингибированием дыхания и падением мембранного потенциала наблюдается выход GSH из клеток в среду [13]. В настоящей работе максимальное накопление глутатиона в среде (GSH_{out}) наблюдалось через 2 часа после внесения ципрофлоксацина (рисунок 3).

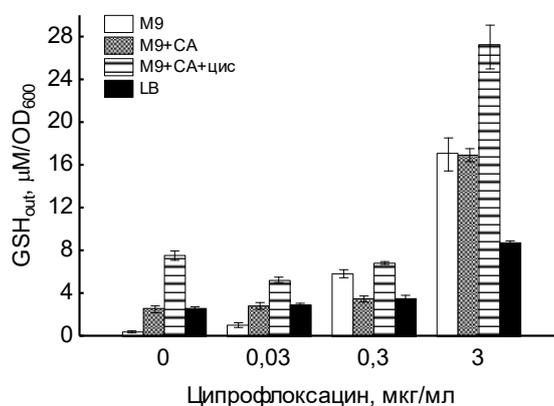


Рисунок 3 – Накопление внеклеточного глутатиона через 2 часа после внесения ципрофлоксацина в культуру *E. coli*, растущую на разных средах.

В среде M9 с сульфатом повышение концентрации GSH_{out} начиналось при 0.03 мкг/мл ЦФ и достигало максимума при 3 мкг/мл ЦФ. На остальных средах только доза 3 мкг/мл значительно увеличивала уровень GSH_{out} . Самый высокий уровень глутатиона в среде (27

μM/OD₆₀₀) был выявлен в условиях дробного добавления цистина, самый низкий – при культивировании *E. coli* на среде LB. В целом это соответствовало характеру накопления внутриклеточного GSH на разных средах (рисунок 2).

Обобщая полученные данные, можно сделать вывод, что интенсификация синтеза GSH в ответ на действие ципрофлоксацина происходит при выращивании *E. coli* на всех изученных средах. Причиной такой интенсификации с наибольшей вероятностью является возникновение избытка внутриклеточного цистеина при ингибировании процессов, потребляющих цистеин. Степень повышения уровня внутриклеточного GSH на первой фазе ответа и последующего накопления глутатиона в среде на второй фазе зависит от степени ингибирования роста, с одной стороны, и доступности цистеина при его биосинтезе из сульфата или в результате экспорта цистина из среды, с другой стороны.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Библиографический список

1. Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Glutathione in bacteria // *Biochemistry (Moscow)*. – 2005. – V. 70. – P. 1199-1211.
2. Smirnova G., Muzyka N., Oktyabrsky O. Transmembrane glutathione cycling in growing *Escherichia coli* cells // *Microbiol. Res.* – 2012. V. 167. –P. 166-172.
3. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // *Amino Acids*. – 2019. – V. 51. – P. 1577-1592.
4. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // *J. Bacteriol.* – 2003. – V. 185. – P. 1942-1950.
5. Imlay K.R.C., Korshunov S., Imlay, J.A. (2015) The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2015. – V. 197. – P. 3629-3644.
6. Imlay J.A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2015. – V. 24. – P. 124–131.
7. Kohanski M.A., Dwyer D.J., Hayete B., Lawrence C.A., Collins J.J. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell*. – 2007. – V. 130. P. 797–810.
8. Belenky P., Ye J.D., Porter C.B.M., Cohen N.R., Lobritz M.A., Ferrante T., Jain S., Korry B.J., Schwarz E.G., Walker G.C., Collins J.J. Bactericidal antibiotics induce toxic metabolic perturbations that lead to cellular damage. *Cell Rep.* – 2015. – V. 13. – P. 968–980.
9. Bush N.G., Diez-Santos I., Abbott L.R., Maxwell A. Quinolones: mechanism, lethality and their contributions to antibiotic resistance // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – P. 5662.
10. Goswami M., Mangoli S.H., Jawali N. Involvement of reactive oxygen species in the action of ciprofloxacin against *Escherichia coli* // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 2006. – V. 50. – P. 949–954.
11. Dwyer D.J., Kohanski M.A., Hayete B., Collins J.J. Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli* // *Mol. Sys. Biol.* – 2007. – V. 3. P. 91.
12. Hong Y., Li Q., Gao Q., Xie J., Huang H., Drlica K., Zhao X. Reactive oxygen species play a dominant role in all pathways of rapid quinolone-mediated killing // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2020. – V. 75. – P. 576–585.

13. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Muzyka N.G., Peters M.A., Oktyabrsky O.N. Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli* // Res. Microbiol. – 2017. – V. 168. – P. 64–73.
14. Tyulenev A., Smirnova G., Muzyka N., Ushakov V., Oktyabrsky O. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures // Bioelectrochemistry. – 2018. – V. 121. – P. 11-17.
15. Tietze F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues // Anal. Biochem. – 1969. V. 27. P. 502–522.

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA ETHANOLICA*

Кирюхина А.С.¹, Лозовая Т.С.¹, Привалова Е.А.¹, Адамович С.Н.²

¹ *Иркутский национальный исследовательский технический университет, Иркутск, Россия*

² *Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского Сибирского отделения РАН, Иркутск, Россия*

Аннотация: Проведено сравнение синтетических стимуляторов (протатранов) и натурального стимулятора (дрожжевого экстракта) по их воздействию на активность внеклеточных протеолитических и липолитических ферментов дрожжей *Candida ethanolica* ВКМ У-2300 Т. Выявлено, что данные стимуляторы эффективны по отдельности в той или иной степени, но при совместном применении их положительный эффект исчезает.

Ключевые слова: *Candida ethanolica*, протатраны, дрожжевой экстракт, протеазы, липазы.

STIMULANTS INFLUENCE ON THE YEAST *CANDIDA ETHANOLICA* ENZYMATIC ACTIVITY

Kiryukhina A.S.¹, Lozovaya T.S.¹, Privalova E.A.¹, Adamovich S.N.²

¹ *Irkutsk National Research Technical University, Irkutsk, Russian Federation*

² *A.E. Favorsky Irkutsk Institute of Chemistry SB RAS, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. Synthetic stimulants (protatranes) and natural stimulant (yeast extract) were compared of their effect on the extracellular proteolytic and lipolytic enzymes activity of the yeast *Candida ethanolica* ВКМ У-2300 Т. It was found that these stimulants are effective individually to one degree or another, but when used together, their positive effect practically disappears.

Keywords: *Candida ethanolica*, protatranes, yeast extract, proteases, lipases.

Основной задачей любого микробиологического процесса является создание оптимальных условий культивирования микроорганизмов для увеличения выхода ценных метаболитов. Одним из подходов к решению данной задачи является внесение в питательную среду различных химических соединений и/или их смесей [1]. Так, дрожжевой экстракт является популярным компонентом, применяемым в целях повышения продуктивности микроорганизмов. Эффективность его применения обусловлена наличием в его составе различных аминокислот и витаминов, что положительно влияет на продуктивность биотехнологических процессов [2]. Однако из-за высокого расхода и большой стоимости применять дрожжевой экстракт не всегда целесообразно.

Существует малоизученная альтернатива дрожжевому экстракту: искусственно синтезированные химические соединения – протатраны (Пр): трис (2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенилсульфанилацетат и трис (2-гидроксиэтил) аммоний-4-хлорфенилсульфонил-

ацетат. В нескольких научных работах было доказано положительное воздействие данных веществ на различные биологические объекты при условии их применения в сверхнизких концентрациях [3-6].

В связи этим целью данной работы было сравнение воздействия вышеуказанных протатранов и дрожжевого экстракта на ферментативную активность дрожжей *Candida ethanolica* ВКМ У-2300 Т.

Штамм дрожжей культивировали в оптимальных для него условиях на синтетической питательной среде следующего состава, г/л [7]: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 10,0; K_2HPO_4 – 10,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,7; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,0125; NaCl – 0,0063, pH среды 7,0. В качестве источника углерода для дрожжей использовали этанол в количестве 1,5 % об. Стимуляторы роста вносили следующим образом: дрожжевой экстракт – в количестве 2 г/л, протатраны добавляли оба одновременно в концентрации $1 \cdot 10^{-6}$ % масс. Протеолитическую активность дрожжей определяли по методу [8], липолитическую по методу [9]. Результаты представлены на рисунках 1 и 2.

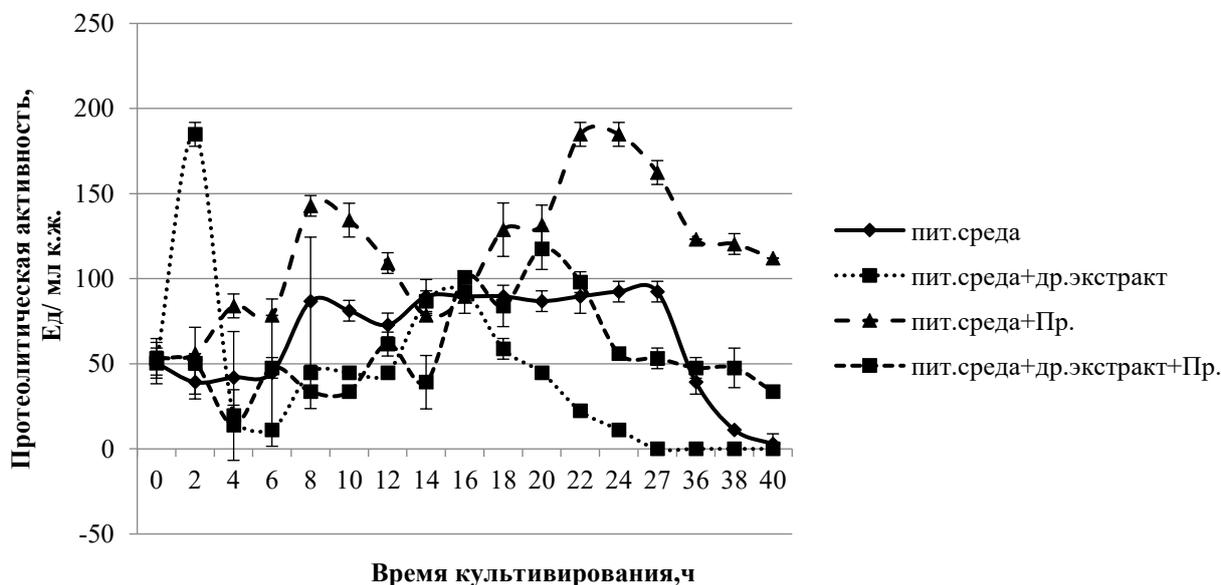


Рисунок 1 – Влияние различных стимуляторов на активность протеолитических ферментов дрожжей.

В питательной среде (контроль) первый значительный подъем активности протеаз наблюдали через 8 ч культивирования (86,8 Ед/мл), далее активность протеаз держалась на уровне 72,4-92,4 Ед/мл еще в течение 19 ч.

При добавлении к составу питательной среды дрожжевого экстракта самое интенсивное накопление протеаз (до 184,8 Ед/мл, т.е. в 3,7 раза) наблюдалось уже через 2 ч культивирования. Далее количество протеаз в среде стало быстро снижаться, опустившись через 2 ч до уровня, ниже изначального. Далее, на 16 ч роста дрожжей, вновь наблюдалось увеличение активности протеаз до 100,8 Ед/мл, после чего активность ферментов постоянно снижалась.

Внесение протатранов в питательную среду привело к появлению двух пиков активности протеаз: на 8 ч (142,8 Ед/мл) и на 24 ч (184,4 Ед/мл). Хотя динамика образования протез была неравномерной, однако уровень протеазной активности не опускался ниже 78,4 Ед/мл всего периода культивирования.

Одновременное внесение в среду для культивирования протатранов и дрожжевого экстракта привело к появлению двух пиков активности в 100,8 и 117,6 Ед/мл (через 16 и 20 ч соответственно). Однако большую часть культивирования уровень протеаз в данной среде был ниже, чем в контроле, в 1,2-2,6 раза.

Таким образом, внесение в питательную среду дрожжевого экстракта или протатранов приводит к увеличению активности протеолитических ферментов дрожжей *Candida ethanolica*: в первые несколько часов (для дрожжевого экстракта) или на 10 и 24 ч культивирования (для протатранов). Т.е. данные стимуляторы положительно влияют на выделение протеаз дрожжами, но в различное время. Однако одновременное внесение дрожжевого экстракта и протатранов (в определенной концентрации) не позволяет увеличить протеолитическую активность.

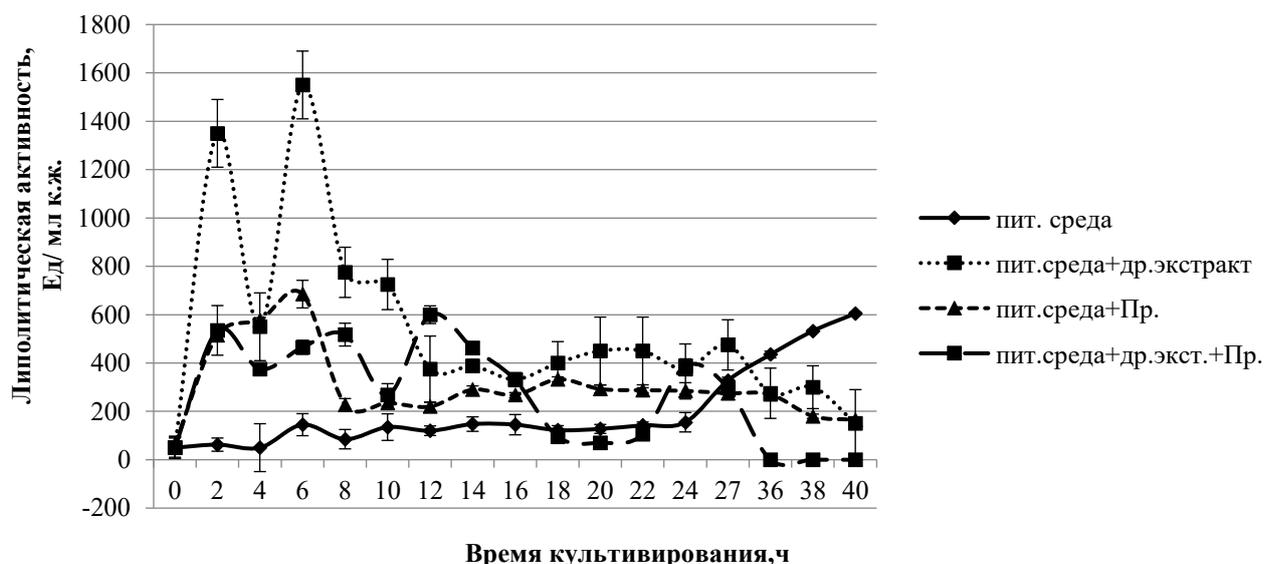


Рисунок 2 – Влияние различных стимуляторов на активность липолитических ферментов дрожжей.

В питательной среде (в контроле) уровень липазной активности был относительно невысоким в течение суток (120-155 Ед/мл), затем он стал подниматься и к концу культивирования достиг максимума (600 Ед/мл).

Внесение в питательную среду дрожжевого экстракта привело к появлению двух пиков активности протеаз: через 2 ч (1350 Ед/мл) и через 6 ч (1550 Ед/мл). Далее активность липаз снижалась и до конца культивирования оставалась на уровне 330-475 Ед/мл (т.е. в 6,6-9,5 раз выше исходной величины) большую часть культивирования.

Внесение протатранов в питательную среду привело к появлению максимума липазной активности через 6 ч (685 Ед/мл). Далее активность липаз снизилась в 3 раза и оставалась на уровне 165-332 Ед/мл до конца культивирования, иногда опускаясь ниже уровня контроля.

При одновременном внесении в среду протатранов и дрожжевого экстракта в течение первых 12 ч наблюдалось колебание липазной активности в пределах 375-660 Ед/мл, затем количество фермента в среде значительно снизилось почти до исходного уровня, немного увеличиваясь и вновь снижаясь до конца культивирования.

Таким образом, внесение в питательную среду дрожжевого экстракта приводит к значительному (в 27-31 раз) увеличению активности липолитических ферментов дрожжей *Candida ethanolica* в первые несколько часов ферментации. Протатраны повышают липазную активность дрожжей менее интенсивно (в 13,7 раза). Одновременное внесение дрожжевого экстракта и протатранов (в вышеуказанной концентрации) продлевает период выделения

липаз дрожжами; величина активности ферментов при этом значительно выше, чем в контроле, но заметно ниже, чем в среде с дрожжевым экстрактом.

Можно сделать заключение, что воздействие дрожжевого экстракта на ферменты дрожжей *Candida ethanolica* более эффективно, однако такое воздействие краткосрочно. В сравнении с дрожжевым экстрактом протатраны менее эффективны, но в случае с протеазами их влияние имеет более долгосрочный эффект. Также влияние протатранов представляется достаточно значительным в сравнении с контролем, особенно учитывая использованные концентрации данных соединений. При совместном внесении стимуляторов природного и искусственного происхождения их положительное влияние на ферменты практически исчезает. Возможно, они каким-то образом мешают друг другу на стадии поступления в клетку, например, образуют друг с другом комплексы, которые не усваиваются дрожжами.

Библиографический список

1. Пермякова Л.В. Классификация стимуляторов жизненной активности дрожжей // Техника и технология пищевых производств. – 2016. – № 3(42). – С. 46-55.
2. Тулякова Т.В. Дрожжевые экстракты – безопасные источники витаминов, минеральных веществ и аминокислот // Пищевая промышленность. – 2004. – № 6. – С. 60-62.
3. Мирскова А.Н. Синтез и фармакологическая активность 2-гидроксиэтиламмониевых солей органилсульфанил(сульфонил)уксусных кислот – новых фармакологически активных соединений // Химия в интересах устойчивого развития. – 2011. – Т. 19. – №5. – С. 467-478.
4. Мирскова А.Н. Алканоламмониевые соли органилсульфанил(сульфонил) уксусных кислот – новые стимуляторы биологических процессов // Журнал органической химии. – 2008. – Т. 44. – Вып. 10. – С. 1501-1508.
5. Мирскова А.Н. Направленный синтез и иммуноактивные свойства 2(гидроксиэтил) аммониевых солей 1-*R*-индол-3-илсульфанил(сульфонил)алканкарбоновых кислот // Известия АН. Серия «Химия». – 2010. – №12. – С. 2181-2190.
6. Молокова К. В., Привалова Е.А., Адамович С.Н., Мирскова А.Н., Мирсков Р.Г. Влияние протонных ионных жидкостей на бродильную активность спиртовых дрожжей // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2014. – N 1. – С. 70-73.
7. Бурьян Н.И. Практическая микробиология виноделия. Симферополь: Таврида. – 2003. – 560 с.
8. Карпенко Д.В. Влияние нанопрепаратов на активность протеаз // Пиво и напитки. – 2016. – № 4. – С.46-49.
9. Стурова Ю. Г. Исследование активности прегастральных липаз // Ползуновский вестник. – 2019. – № 4. – С. 29–33.

ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ ФАЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ ГИДРОТЕРМАЛЬНОЙ КОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОСАДКОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ

Клементьев С.В.¹, Куликова Ю.В.², Сироткин А.С.¹

¹Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань,
Россия.

²Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта, Калининград, Россия.

Аннотация. Исследованы физико-химические и органолептические свойства образцов водной фазы, являющейся побочным продуктом гидротермальной конверсии биомассы с использованием различных катализаторов процесса. Большая часть образцов имела нейтральную реакцию среды, за исключением нескольких проб. Оценена интегральная токсичность водной фазы с использованием тест-объектов *Paramecium caudatum* и *Artemia salina*. Показано, что образец, полученный с использованием NiSO₄ в качестве катализатора, являлся самым токсичным как для инфузорий, так и для рачков (полулетальная кратность разбавления 81,7 и 142,2 соответственно).

Ключевые слова: гидротермальное ожижение, токсичность, сточная вода.

EVALUATION OF THE INTEGRAL TOXICITY OF THE AQUEOUS PHASE, OBTAINED BY HYDROTHERMAL CONVERSION OF ORGANIC SLUDGE FROM WASTEWATER TREATMENT PLANTS

Klementev S. V.¹, Kulikova Y. V.², Sirotkin A. S.¹

¹Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

²Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russia

Abstract: The physicochemical and organoleptic properties of samples of the aqueous phase, which is a by-product of hydrothermal conversion of biomass using various technological catalysts, have been studied. Most of the samples had a neutral reaction medium, with the exception of a few samples. The integral toxicity of the aqueous phase was evaluated using test objects *Paramecium caudatum* and *Artemia salina*. It was shown that the sample obtained using NiSO₄ as a catalyst turned out to be the most toxic for both ciliates and crustaceans (semi-lethal dilution coefficient 81.7 and 142.2, respectively).

Keywords: hydrothermal liquefaction, toxicity, waste water.

Введение. Гидротермальное ожижение – перспективный путь преобразования влажного органического сырья в биотопливо, поскольку он позволяет избежать затрат на процесс сушки и обезвоживания биомассы [1]. Однако основной проблемой реализации процесса

гидротермального ожигения становится образование высококонцентрированных сточных вод, так как более 50 % органических соединений переходит не в нефтяную, а в водную фазу [2,3]. Разработка технологии биоутилизации образующихся сточных вод зависит от ряда параметров: концентрации органических соединений и биогенных элементов, наличия металлов и т.д. Первичными исходными данными для разработки процесса биоутилизации таких сточных вод являются результаты оценки токсичности с применением методов биотестирования.

В связи с вышесказанным цель работы заключалась в экспериментальной оценке интегральной токсичности водной фазы, образованной при гидротермальной конверсии органического сырья с использованием стандартных тест-объектов.

В качестве объектов исследования в работе использовались:

1. Образцы водной фазы, полученные в результате гидротермального ожигения органического сырья. Характеристики образцов представлены в таблице 1.
2. Тест-объекты: трехсуточная культура инфузорий *Paramecium caudatum* и наупии рачков *Artemia salina*, находящихся на эндогенном дыхании.

Таблица 1 – Характеристика проб, полученных при гидротермальном ожигении органического сырья

Номер пробы	Сырье	Условия процесса
1	Ил избыточный 10 грамм АСВ + 200 мл H ₂ O	260 °С, 20 минут, 4.5 МПа
2	Ил избыточный 10 грамм АСВ+ 100 мл H ₂ O	260 °С, 30 минут, 4.5 МПа
3	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	260 °С, 20 минут, 4.2 МПа, цеолит 2 грамма в качестве катализатора
4	Ил избыточный 10 грамм АСВ+150 мл H ₂ O	260 °С, 20 минут, 4.4 МПа
5	Ил избыточный 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	260 °С, 30 минут, 4.5 МПа
6	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+ 100 мл H ₂ O	261 °С, 20 минут, 4.6 МПа, CuSO ₄ – 2 грамма в качестве катализатора
7	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+ 100 мл H ₂ O	260 °С, 20 минут, 4.6 МПа, аммонийные квасцы 2 грамма в качестве катализатора
8	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	265 °С, 20 минут, 4.6 МПа, CoCl ₆ – 2 грамма в качестве катализатора
9	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	264 °С, 20 минут, 4.6 МПа, Al ₂ O ₃ – 2 грамма в качестве катализатора
10	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	263 °С, 20 минут, 4.6 МПа, NiSO ₄ – 2 грамма в качестве катализатора
11	Осадок первичных отстойников 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	262 °С, 20 минут, 4.6 МПа, MoO ₃ – 2 грамма в качестве катализатора
12	Ил избыточный 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	260 °С, 10 минут, 4.5 МПа
13	Ил избыточный 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	260 °С, 15 минут, 4.5 МПа
14	Ил избыточный 10 грамм АСВ+100 мл H ₂ O	260 °С, 20 минут, 4.2 МПа, цеолит активированный – 2 грамма в качестве катализатора

Методы исследования

1. Водородный показатель воды определяли потенциометрическим методом на приборе рН-150 МИ.

2. Токсичность водной фазы с использованием гидробионтов *Paramecium caudatum* и *Artemia salina* оценивали по ФР.1.39.2015.19242 [4], ФР 1.39.2006.02505 соответственно [5]. Среднее летальное разбавление КР (50) определяли графическим способом [6].

Результаты и обсуждения

Оценка физико-химических и органолептических свойств полученных образцов.

В таблице 2 представлены результаты измерения водородного показателя среды и органолептические свойства проб сточной воды.

Таблица 2 – Физико-химические и органолептические свойства проб сточной воды

Номер пробы	рН	Органолептические свойства
1	7,51±0,37	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
2	7,56±0,37	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
3	9,01±0,45	Черная жидкость с резким неприятным запахом
4	7,14±0,35	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
5	7,03±0,35	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
6	6,78±0,33	Светло-коричневая жидкость с резким, неприятным запахом
7	9,28±0,46	Черная жидкость с резким неприятным запахом
8	5,92±0,29	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
9	9,03±0,45	Черная жидкость с резким неприятным запахом
10	7,23±0,36	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
11	8,09±0,40	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
12	6,71±0,33	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
13	6,52±0,32	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом
14	7,37±0,36	Светло-коричневая жидкость с резким неприятным запахом

Согласно экспериментальным результатам, большая часть образцов сточной воды обладает нейтральной реакцией среды, за исключением проб под номерами 3, 7, 8, 9, 11. Отклонение значений водородного показателя в кислую либо щелочную область, очевидно, связано с использованием при гидротермальном ожижении органического сырья катализаторов, обладающих щелочными либо кислотными свойствами.

Все пробы имели резкий неприятный запах и окраску от светло-коричневой до черной.

Далее для выявления наиболее токсичной пробы сточной воды, полученной после гидротермального ожижения, было найдено среднее летальное разбавление КР (50), приводящее к гибели 50 % исследуемых тест объектов графическим методом. Результаты КР (50) для *Paramecium caudatum* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Полулетальная кратность разбавления, вызывающая гибель 50 % *Paramecium caudatum* после 1-часовой экспозиции в водных пробах

Номер пробы	КР (50)
1	61,5
2	62,4
3	49,4
4	44,9
5	52,3
6	51,7
7	62,3
8	45,8
9	57,6
10	81,7
11	69,5
12	58,6
13	70,8
14	51,2

Исходя из полученных экспериментальных результатов по определению полулетальной кратности разбавления для инфузорий, наибольшее токсическое воздействие оказывал образец под номером 10 (средняя кратность разбавления КР 81,7); самыми безопасными являлись образцы 4 и 8 (КР 44,9 и 45,8, соответственно).

Результаты КР (50) для *Artemia salina* показаны в таблице 4.

Таблица 4 – Полулетальная кратность разбавления, вызывающая гибель 50 % *Artemia salina* после их 48-часового нахождения в среде проб

Номер пробы	КР (50)
1	80,3
2	69,6
3	64,7
4	74,3
5	80,1
6	72
7	83,4
8	61,2
9	86,3
10	142,2
11	73,4
12	83,4
13	80,7
14	84,1

Согласно полученным экспериментальным результатам токсичности исследованных проб с использованием, тест-объекта *Artemia salina*, наиболее токсичным образцом является проба сточной воды под номером 10 (КР 142,2); наименее токсичными для рачков оказались пробы 3 и 8 (КР 64,7 и 61,2, соответственно).

Можно предположить, что образец сточной воды под номером 10 обладал наиболее сильным токсичным воздействием на исследуемые тест-объекты из-за ионов никеля, которые

применяют в качестве катализатора для ускорения процесса гидротермального ожижения органического сырья [7].

Заключение

1. Показано, что большая часть образцов сточной воды, полученных в результате гидротермального ожижения, имела нейтральную реакцию среды. Исключение составили пробы под номерами 3, 7, 8, 9, 11. Отклонение значений водородного показателя в кислую либо щелочную область, вероятно, связано с использованием для гидротермальной конверсии биомассы катализаторов, обладающих щелочными (цеолит, аммонийные квасцы, оксид алюминия, оксид молибдена для проб 3, 7, 9, 11, соответственно) либо кислотными (хлорид кобальта для пробы 8) свойствами.

2. Отмечено, что образец сточной воды под номером 10 являлся самым токсичным как для инфузорий, так и для рачков, а проба 8 оказывала на использованные тест-объекты наименее токсическое воздействие по сравнению с другими видами анализируемых сточных вод.

Библиографический список

1. A review of thermochemical conversion of microalgal biomass for biofuels: chemistry and processes / G. Kumar [et al.] // Green Chemistry. 2017. № 19. P. 44–67;
2. Ecological stoichiometry meets ecological engineering: using polycultures to enhance the multifunctionality of algal biocrude system / C. M. Godwin [et al.] // Environmental Science and Technology. 2017. № 51. P. 11450–11458;
3. Anaerobic conversion of the hydrothermal liquefaction aqueous phase: fate of organics and intensification with granule activated carbon/ozone pretreatment / B. Si [et al.] // Green Chemistry. 2019. № 21. P. 1305-1318;
4. ФР.1.39.2003.00923. Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных вод, сточных и очищенных сточных, поверхностных, грунтовых и питьевых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum*. – Казань, 2003. – 20 с;
5. ФР 1.39.2006.02505 Методика определения токсичности высокоминерализованных поверхностных и сточных вод, почв и отходов по выживаемости солоноватоводных рачков *Artemia salina*. Введ. 2009.01.01 М.: МГУ, 2009. – 28 с;
6. Галицкая П.Ю., Селивановская С.Ю., Гумерова Р.Х. Тестирование отходов, почв, материалов с использованием живых систем: учеб.-метод. пособие. Казань: Изд-во Казан. ун-та, 2014. 57 с;
7. Халилова А.А., Яковлев А.В., Сироткин А.С. Сравнительная оценка токсичности сточных вод, содержащих ионы хрома и никеля с применением различных тест-объектов // Вестник Казанского Технологического Университета. 2010. № 10. С.392-400.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЛКАН-1-МОНООКСИГЕНАЗ В КЛЕТКАХ *RHODOCOCCLUS RUBER* ИЭГМ 231

Комарова Л.П.¹, Ширяева Е.Н.², Криворучко А.В.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

²Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения РАН, Пермь, Россия.

Аннотация. В геноме штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 обнаружено два гена *alkB*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ. Установлено, что оба гена экспрессируются в присутствии линейных и разветвленных алканов с длиной цепи от 11 до 16 атомов углерода. Выявлена высокая (74,97%) степень гомологии между генами. Показано, что ген *alkB1* экспрессируется сильнее, чем *alkB2*, что может быть связано с его экспрессией в составе оперона с генами *rubA* (кодируют рубредоксины) и *rubR* (кодирует рубредоксинредуктазу). Предположительно, алкан-1-монооксигеназа AlkB1 определяет эффективность окисления алканов со средней и большой длиной цепи бактериями *R. ruber*.

Ключевые слова: биодegradация углеводородов, актинобактерии рода *Rhodococcus*, алкан-1-монооксигеназы, экспрессия генов, гены *alkB*.

EXPRESSION OF ALKANE-1-MONOOXYGENASE GENES IN *RHODOCOCCLUS RUBER* IEGM 231 CELLS

Komarova L.P.¹, Shiryaeva E.N.², Krivoruchko A.V.^{1,2}

¹Perm State University, Perm, Russia.

²Perm Federal Research Centre, Perm, Russia.

Abstract. Two *alkB* genes coded for alkane-1-monooxygenases were revealed in the genome of the bacterium *Rhodococcus ruber* IEGM 231. It was experimentally proved that both genes were expressed in the presence of linear and branched alkanes with the chain length between 11 and 16 carbon atoms. Both *alkB* genes had a high (74.97%) level of homology. The gene *alkB1* was stronger expressed in comparison with the *alkB2* gene that could be related with its location close to *rubA* genes coded for rubredoxins and a *rubR* gene coded for a rubredoxin reductase. Apparently, the enzyme AlkB1 was responsible for a high oxidizing activity of *R. ruber* towards medium and long-chain alkanes.

Keywords: biodegradation of hydrocarbons, *Rhodococcus*, alkane-1-monooxygenases, expression of genes, *alkB* genes.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают широким набором ферментов для биодegradации нефтяных углеводородов. В геномах родококков обнаружены гены,

кодирующие синтез алкан-1-монооксигеназ, цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ, метан/пропан-монооксигеназных комплексов, диоксигеназ, лакказ, пероксидаз и дегидрогеназ. Геном родококков избыточен, функциональные гены в нем могут быть представлены несколькими копиями, отмечается широкая субстратная специфичность и дублирование функций у ряда ферментов. Это позволяет родококкам использовать широкий спектр соединений в качестве ростовых и кометаболических субстратов, сохранять жизнеспособность и метаболическую активность в присутствии различных поллютантов [1–3]. При этом ферментативные механизмы биodeградации углеводов родококками детально не изучены. Не определена субстратная специфичность многих ферментов, механизмы их регуляции, условия экспрессии. Например, в первичном окислении алканов С5–С16 могут участвовать цитоплазматические гемовые цитохром-Р450-зависимые монооксигеназы класса CYP153 и негемовые мембраносвязанные алкан-1-монооксигеназы AlkB [4]. В геноме биотехнологически перспективного штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231, обладающего высокой углеводородокисляющей активностью и способного к активной продукции биосурфактантов, обнаружено 2 гена *alkB* и 22 гена, кодирующих синтез цитохром-Р450-зависимых монооксигеназ [2]. Цель настоящей работы – исследование экспрессии генов *alkB*, кодирующих синтез алкан-1-монооксигеназ у *R. ruber* ИЭГМ 231.

В работе использовали штамм *R. ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM #768, ЦКП 480868, УНУ 73559, <http://www.iegmc01.ru>). Бактерии выращивали в среде LB (Sigma-Aldrich, США) или минеральной среде RS [5] с 0,1 об. % *n*-ундекана, *n*-гексадекана или пристана (все х.ч., Sigma-Aldrich, США) при 160 об/мин, температуре 28°C в течение 2 сут. Клетки разрушали с использованием металлических шариков в гомогенизаторе FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, США). РНК выделяли с использованием набора для выделения RNeasy Mini Kit (Qiagen, США). Концентрацию РНК определяли с помощью нанофотометра NanoPhotometer® N50 (Implen, Германия). Для получения кДНК на матрице РНК проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с использованием набора реактивов с ревертазой MMLV (Евроген, Москва) согласно инструкции производителя. ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили с использованием амплификатора Real-Time CFX Connect (Bio-Rad, США), набора реактивов с *Taq* ДНК-полимеразой производства “Евроген” (Москва) и праймерами к гену 16S рРНК (положительный контроль) [6] или генам *alkB1* и *alkB2*, подобранным с помощью программы Primer BLAST (NCBI, США). В реакционную смесь добавляли энхансер для синтеза ДНК на ГЦ-богатой матрице, состоящий из 0,54 М бетаина, 1,34 мМ дитиотреитола, 1,34 вес. % диметилсульфоксида и 11 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (все реактивы производства Sigma-Aldrich) в деионизированной воде. Наличие ПЦР-продуктов и их размер определяли методом горизонтального электрофореза в агарозном геле, для детекции использовали систему гель-документирования Bio-Rad Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США). Сравнение нуклеотидных и аминокислотных последовательностей осуществляли с использованием программ blastn и blastp (NCBI, США), алгоритм megablast. Все эксперименты проводили в 3-х–8-микратной повторяемости.

По нашим данным, оба гена *alkB* экспрессируются в клетках *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии алканов С11–С19. При этом индукторами являются как линейные алканы со средней (*n*-ундекан, 11 атомов углерода) и длинной (*n*-гексадекан, 16 атомов углерода) углеводородной цепью, так и разветвленные алканы (пристан, 2,6,10,14-тетраметилпентадекан). В среде без углеводов синтеза ферментов AlkB не происходит (рисунок).

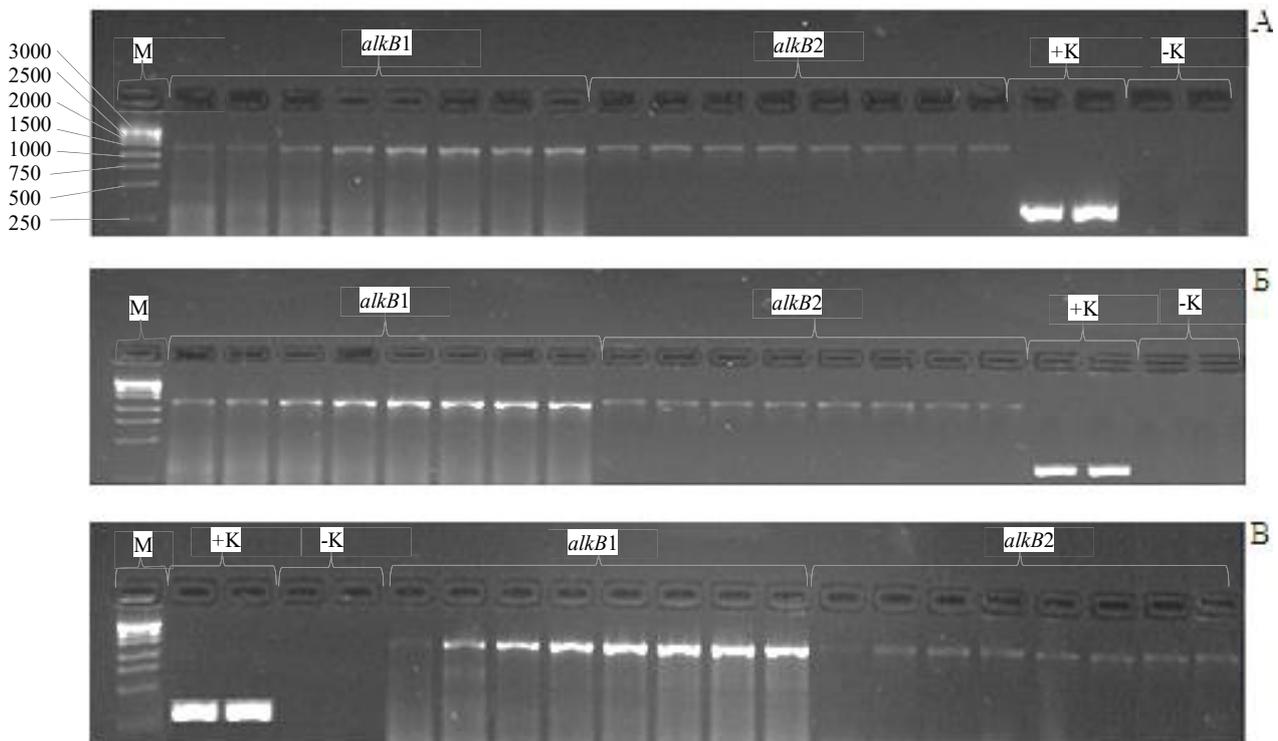


Рисунок – Электрофореграммы ПЦР-продуктов с праймерами к генам *alkB1* и *alkB2* *R. ruber* ИЭГМ 231 после культивирования в присутствии углеводов. Углеводы: А – *n*-ундекан; Б – *n*-гексадекан; В – пристан. М – маркер молекулярного веса ДНК, п.н. +К – положительный контроль (ПЦР с праймерами к гену 16S рРНК). -К – отрицательный контроль (бактерии выращивали в среде LB без углеводов). Ген *alkB1* располагается в геноме *R. ruber* ИЭГМ 231 с 5097029 по 5098252 п.н. и имеет размер 1224 п.н., ген *alkB2* располагается с 994494 по 995645 п.н. и имеет размер 1152 п.н.

Данная работа представляет собой начальный этап исследования экспрессии генов, участвующих в окислении углеводов у родококков. В дальнейшем планируется проведение количественного анализа для оценки уровня экспрессии генов *alkB* с расширением спектра углеводородных субстратов, уточнение функции генов *alkB* с помощью направленного мутагенеза, исследование экспрессии других оксидоредуктаз, предположительно вовлеченных в процессы биодеградации нефтяных углеводородов родококками.

Это подтверждает выявленную ранее широкую субстратную специфичность алкан-1-монооксигеназ и их способность окислять алканы с разной длиной цепи [4]. При сравнении нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов *alkB1* и *alkB2* выявлена высокая степень гомологии между ними 74,93 и 56,27% соответственно, что позволяет считать эти гены и их продукты дубликатами. Как видно из рисунка 1, экспрессия гена *alkB2* выражена слабее таковой *alkB1* и гена, кодирующего синтез 16S рРНК. Известно, что алкан-1-монооксигеназы AlkV катализируют параллельные реакции окисления одной молекулы алкана до первичного спирта и двух молекул железосерного белка рубредоксина с помощью молекулярного кислорода. Рубредоксины затем восстанавливаются с помощью, НАДН-зависимой рубредоксинредуктазы [4]. При анализе участков геномов с генами *alkB* обнаружено, что *alkB1* располагается рядом с двумя генами *rubA*, кодирующими синтез рубредоксинов, и геном *rubR*, кодирующим пиридиннуклеотид-дисульфидоксидоредуктазу.

По-видимому, эти гены образуют оперон и экспрессируются одновременно. Рядом с *alkB2* гены *rubA* и *rubR* не обнаружены, хотя аннотировано присутствие неизвестного железосерного белка. Выявленные различия в окружении генов *alkB1* и *alkB2* являются возможным объяснением повышенной экспрессии *alkB1*, продукт которого, по-видимому, вносит наибольший вклад в окисление алканов. Другими возможными объяснениями могут быть наличие промоторов, связывающих РНК-полимеразу с разной степенью эффективности, и разное родство каталитического центра к субстратам.

Работа выполнена в рамках госзаданий АААА-А19-119112290008-4 и 122031400671-1, а также по гранту МИГ в рамках региональной конкурсной программы Министерства образования Пермского края (Соглашение № С-26/827).

Библиографический список

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углеводородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Монография-атлас / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН, 2021. – 140 с.
2. Ivshina I.B., Kuyukina M.S., Krivoruchko A.V., Barbe V., Fischer C. Draft genome sequence of propane- and butane-oxidizing actinobacterium *Rhodococcus ruber* IEGM 231 // GenomeA. – 2014. – V. 2, No. 6. – e01297-14.
3. Cappelletti M., Zampolii J., Zannoni D. Genomics of *Rhodococcus* / In: H.M. Alvarez (ed.). Biology of *Rhodococcus*, Microbiology Monographs 16. – Springer Nature, Switzerland AG, 2019. – P. 23–60.
4. Koch D.J., Chen M.M., van Beilen J.B., Arnold F.H. *In vivo* evolution of butane oxidation by terminal alkane hydroxylases AlkB and CYP153A6 // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. – V. 75, No. 2. – P. 337–344.
5. Regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms [Электронный ресурс] URL: <http://www.iegmcoll.ru/medium/med11.html> (дата обращения: 26.09.22).
6. Bell K.S., Kuyukina M.S., Heidbrink S., Philp J.C., Aw D.W.J., Ivshina I.B., Christofi N. Identification and environmental detection of *Rhodococcus* species by 16S rDNA-targeted PCR // J. Appl. Microbiol. – 1999. – V. 87. – P. 472–480.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИЛАН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОТРУБОК ГАЛЛУАЗИТА В СТАБИЛИЗАЦИИ КАПЕЛЬ ВОДНЫХ СУПЕНЗИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР

Коннова С.А., Фахруллин Р.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. В работе была проведена инкапсуляция микроорганизмов в сферические структуры, оболочка которых сформирована из гидрофобно-модифицированных неорганических наночастиц глины. Показано, что инкапсуляция в такие структуры не препятствует приросту биомассы бактериальных клеток. Полимерная биопленка на внутренней поверхности повышает стабильность всей структуры, снижает испарение и сохраняет жизнеспособность бактерий до 4 дней.

Ключевые слова: силан-модифицированные нанотрубки галлуазита, бактериальные культуры, инкапсуляция, полимеры, биопленки.

USE OF SILANE-MODIFIED HALLOYSITE NANOTUBES IN STABILIZING DROPLS OF AQUEOUS SUSPENSIONS OF BACTERIAL CULTURES

Konnova S.A., Fakhrullin R.F.

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia.

Abstract. In this work, microorganisms were encapsulated into spherical structures, the shell of which was formed from hydrophobically modified inorganic clay nanoparticles. It has been shown that encapsulation in such structures does not prevent the growth of bacterial cell biomass. The polymeric biofilm on the inner surface increases the stability of the entire structure, reduces evaporation and keeps the bacteria viable for up to 4 days.

Keywords: silane-modified halloysite nanotubes, bacterial cultures, encapsulation, polymers.

Инкапсуляция живых клеток микроорганизмов в неорганические материалы обеспечивает внешнюю защиту клеток от окружающей среды. Природный и биосовместимый материал, нанотрубки галлуазита (длина 500-1000 нм, диаметр 50-70 нм и полость до 20 нм), используется для формирования эмульсий Пикеринга [1, 2]. Благодаря своей анизотропной структуре, галлуазит способен формировать слои на планарных [3] и объемных поверхностях [4]. Нанотрубки галлуазита с модифицированной (гидрофобной) внешней поверхностью могут формировать как эмульсии Пикеринга (капли масла в воде), так и «обратные» эмульсии Пикеринга (капли воды в воздухе).

Мы использовали гидрофобный галлузит, октадецилтриметоксилан (ОДТМС)-модифицированные нанотрубки галлузита, в качестве материала для создания твердой оболочки на поверхности капли водной суспензии бактериальных клеток. Структуры, стабилизированные галлузитом, были получены путем раскатывания капли суспензии по поверхности порошка гидрофобно-модифицированного галлузита (рисунок 1).

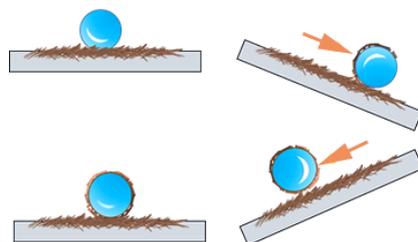


Рисунок 1 – Схематическое изображение процесса получения структур, стабилизированных гидрофобным галлузитом [5].

Размер получаемых структур зависел от объема используемой водной суспензии. Данная инкапсуляция была успешно применена для различных микроорганизмов: *S. cerevisiae*, *E. coli*, *A. borkumensis* и *B. subtilis*.

Для повышения стабильности на внутренней поверхности структуры, образованной гидрофобным галлузитом, была сформирована полимерная пленка из одного из полимеров, карбоксиметилцеллюлозы (СМС), полиэтиленгликоля (РЕG), поливинилпирролидона (PVP) и полидиаллилдиметиламмоний хлорида (PDADMAC). Такие структуры продемонстрировали высокую стабильность, чем структуры без использования полимеров. После инкубирования с СМС и РЕG инкапсулированные бактериальные клетки сохранили жизнеспособность. PDADMAC (отрицательный контроль) продемонстрировал цитотоксическую активность к бактериальным клеткам, в присутствии данного полимера не был отмечен рост клеток (рисунок 2).

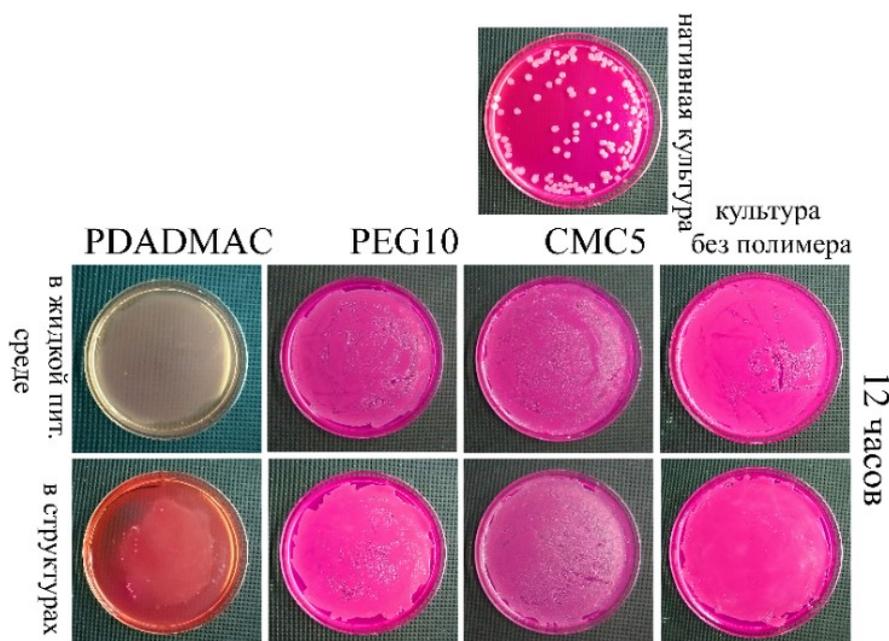


Рисунок 2 – Формирование колоний *Bacillus subtilis* на твердой среде после 12 часового инкубирования в структурах, стабилизированных гидрофобным галлузитом, с внутренней оболочкой из полимеров (СМС, РЕG и PDADMAC). Диаметр чашки Петри – 9 см.

Рост бактерий *A. borkumensis*, инкапсулированных в структуры с полимерной оболочкой, после инкубирования на воздухе аналогичен росту культуры, инкубированной в жидкой среде, что подтверждает, что оболочка из галлуазита нетоксична и биосовместима и не ингибирует рост клеток внутри структур. Структуры, полученных с использованием гидрофобно-модифицированного галлуазита, перспективны для решения биотехнологических и экологических задач, таких как хранение бактериальных культур и биоремедиация нефтяных загрязнений.

Работа поддержана грантом РФФИ № 21-74-10034.

Библиографический список

1. Owoseni O., Nykanson E., Zhang Y., Adams S., He J., McPherson G., Bose A., Gupta R., John V., Release of Surfactant Cargo from Interfacially-Active Halloysite Clay Nanotubes for Oil Spill Remediation // *Langmuir*. – 2014. – V. 30. – P. 13533-13541.
2. Panchal A., Swientoniewski L.T., Omarova M., Yu T., Zhang D., Blake D.A., John V., Lvov Y.M., Bacterial proliferation on clay nanotube Pickering emulsions for oil spill bioremediation // *Colloids Surf. B*. – 2018. – V. 164. – P. 27–33.
3. Velev O.D., Prevo B.G., Bhatt K.H., On-chip manipulation of free droplets // *Nature*. – 2003. – V. 426. – P. 515–516.
4. Fakhrullin R.F., Lvov Y.M., “Face-lifting” and “make-up» for microorganisms: layer-by-layer polyelectrolyte nanocoating // *ACS Nano*. – 2012. – V. 6. – P. 4557-4564.
5. Panchal A., Rahman N., Konnova S., Fakhrullin R., Zhang D., Blake D., John V., Ivanov E., Lvov Y., Clay Nanotube Liquid Marbles Enhanced with Inner Biofilm Formation for the Encapsulation and Storage of Bacteria at Room Temperature // *ACS Appl. Nano Mater.* – 2020. – V. 3. – P. 1263-1271.

МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА САМПУЛОБАКТЕР

Кравченко А.С., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Кампилобактериоз – инфекционное заболевание человека и животных, возбудителем которого являются бактерии рода *Campylobacter*. Долгое время они рассматривались как патогены зоонозного происхождения, но растущий патогенный потенциал оральных кампилобактерий побудил внимательнее присмотреться к возбудителю и охарактеризовать кампилобактериозы неззоонозной этиологии. Продолжительность кампилобактерной инфекции и тяжесть осложнений определяет социально-экономическую значимость кампилобактериозов.

Ключевые слова: кампилобактериоз, *Campylobacter*, условно патогенные бактерии.

MEDICAL SIGNIFICANCE OF BACTERIA OF THE CAMPYLOBACTER SPP.

Kravchenko A. S., Soboleva O. M.

KemSMU, Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. Campylobacteriosis is an infectious disease of humans and animals, the causative agent of which is bacteria of the genus *Campylobacter*. For a long time they were considered as pathogens of zoonotic origin, but the growing pathogenic potential of oral campylobacteria prompted to take a closer look at the pathogen and characterize campylobacterioses of non-zoonotic etiology. The duration of campylobacter infection and the severity of complications determines the socio-economic significance of campylobacteriosis.

Keywords: campylobacteriosis, *Campylobacter*, conditionally pathogenic bacteria.

Характеристика *Campylobacter* spp.

Род *Campylobacter* (от греч. «campylos» – кривой, изогнутый; «bakterion» – палочка) включает в себя 39 видов и 16 подвидов, выделенных от животных и человека, и количество идентифицированных видов продолжает увеличиваться, претерпевая таксономические изменения [1]. Необходимость совершенствования таксономии основана на высоком внутривидовом нуклеотидном расхождении кампилобактерий [2].

На фоне неустойчивого генетического родства получила распространение классификация кампилобактерий по температурному диапазону роста на термофильные и мезофильные кампилобактерии. Среди патогенных кампилобактерий встречаются как термофилы (*C. jejuni*, *C. coli*), так и мезофилы (*C. fetus*). При этом широкий температурный диапазон роста способствует их повсеместному распространению. Как комменсалы желудочно-кишечного тракта кампилобактерии присутствуют в кишечнике практически всех известных теплокровных животных и птиц, являющихся их природным резервуаром. На

сегодняшний день получили распространение комменсалы ротовой полости человека – *C. concisus* и *C. showae* [3].

Исторический аспект.

Впервые *Campylobacter* был идентифицирован в 1909 г. и определен как один из этиологических агентов, вызывающих аборт у крупного и мелкого рогатого скота. Выделенный возбудитель длительное время ассоциировался исключительно с ветеринарной патологией. У человека *Campylobacter* был впервые выделен в 1947 г. однако, наблюдалось не соответствие клинической картины человека и животных, что позволило предположить не только абортное воздействие кампилобактерий. Накопление знаний о кампилобактериях в структуре острых кишечных инфекций человека началось в 1969 г., когда впервые удалось выделить возбудителя из кала больного с клиникой гастроэнтерита.

В настоящее время в медицинском научном сообществе *Campylobacter* spp. известен как один из четырех основных возбудителей диарейных заболеваний по всему миру [4]. При этом в последнее десятилетие *Campylobacter* spp. заслужил интерес как бактериальный агент с потенциальной канцерогенностью.

Механизмы и пути передачи кампилобактериозов.

На данный момент считается, что входные ворота для кампилобактерий – это желудочно-кишечный тракт. Основной механизм передачи – фекально-оральный. Описаны многочисленные случаи трансплацентарного заражения плода и инфицирования в процессе родов. Актуальным становится заражение человека собственными оральными кампилобактериями при попадании их в нижележащие отделы пищеварительного тракта.

Фекально-оральный механизм осуществляется через водный и алиментарный пути передачи, реже – контактно-бытовой. Реализуется при приеме в пищу продуктов животного происхождения или воды, контаминированных кампилобактериями. Вместе с водой и пищей возбудители проходят через ротовую полость и благодаря своей кислотоустойчивости минуя желудок, достигая тонкого кишечника. В тонком кишечнике кампилобактерии реализуют свои факторы патогенности, вызывая воспаление слизистой оболочки различной степени выраженности, бактериемию и вторичные поражения органов с развитием воспаления и образованием гнойных очагов.

Контактно-бытовой путь проявляется редко, он описан в ряде научных публикаций, отмечены случаи заражения при контакте с зараженной водой во время рекреационных мероприятий, при тесном общении с инфицированным животным [4]. Предположительно заражение также может происходить при контакте с акушерскими инструментами и предметами ухода за крупным и мелким рогатым скотом; заражение вероятно при купании в водоеме, контаминированном кампилобактериями.

Заражение кампилобактериозом человека напрямую определяется инфицированностью животных, которые выступают непосредственным фактором передачи инфекции. Серьезную настороженность вызывает восприимчивость к заражению популяций большинства домашних и сельскохозяйственных животных, а также высокие показатели заражения туш во время забоя [4]. Остается открытым вопрос о предрасполагающих факторах бактериальной инвазии оральными кампилобактериями.

Особенности факторов патогенности.

Кампилобактерии выработали механизмы адаптации в организме-хозяина. Они основаны на взаимодействии с иммунной системой и направлены на модуляцию иммунного ответа путем уклонения или активного подавления иммунной реакции организма.

Механизмы уклонения от иммунитета реализуются через уникальную систему O-, N-гликозилирования посредством утраты иммуногенных свойств гликозилированными структурами бактерий, а также наличием секреторной системы, которая обеспечивает резистентность к действию желчных кислот – факторов местного иммунитета. Благодаря явлению фазовой вариации кампилобактерии способны изменять структуру своих факторов патогенности и ускользать от иммунного ответа [5]. Прямое разрушающее действие на клетки иммунного реагирования оказывает цитолетальный «взрывной» токсин (CDT). Предполагается, что CDT приводит к пролонгации симптомов и персистенции возбудителя. При этом вызванная действием CDT иммуносупрессия является основой канцерогенности кампилобактерий [6]. Секреция CDT определяется чувством кворума, т.е. сопутствующим бактериальным окружением, что позволяет предположить разную степень воздействия CDT при различных коморбидных состояниях.

Кампилобактерии также обладают внутренней антибиотикорезистентностью, которая реализуется через продукцию ферментов, модификацию мишени для антибиотика, эффлюкс-механизм. Помимо этого, у кампилобактерий обнаружена плазида, определяющая резистентность к тетрациклину [7,8].

Таким образом, кампилобактерии через факторы патогенности подавляют внутренние защитные механизмы, а антибиотикорезистентность обеспечивает устойчивость к внешнему воздействию.

Campylobacter spp. и коморбидность.

Бактериальная инвазия *Campylobacter* spp. зачастую осложняется при наличии коморбидной патологии. Так, бактериемия при кампилобактерном гастроэнтерите является одним из осложнений и может развиваться как у иммунокомпетентных пациентов, так и у пациентов с иммунодепрессивными состояниями. Однако установлено, что у лиц с иммуносупрессией кампилобактеры способны длительно персистировать с развитием хронической инфекции, что не характерно для пациентов с нормальным иммунитетом.

Классическим примером выраженной иммуносупрессии выступает ВИЧ-инфекция. Недавнее исследование в Гане выявило хронический кампилобактериоз у 50,7 % ВИЧ-положительных изолятов [9]. При этом ВИЧ-инфекция выступает как фактор риска летального исхода не только напрямую, но и опосредованно. Доказано, что оппортунистический кандидоз при ВИЧ-инфекции является одним из факторов риска летального исхода от кампилобактериоза [4].

Кампилобактерная инфекция отягощает течение беременности. При кампилобактериозе, вызванном *C. fetus* или *C. jejuni*, отмечается высокая вероятность развития генерализованного кампилобактериоза, который характеризуется множественными органами поражениями в виде эндокардита, септического артрита, гнойного менингита и др. Показано, что при генерализованном кампилобактериозе у беременных возникают самопроизвольные аборты вследствие гибели плода, возможно трансплацентарное инфицирование ребенка [10].

На развитие осложнений после кампилобактериоза может влиять наследственная предрасположенность. Установлено, что существуют гены HLA, ассоциированные с предрасположенностью к развитию аутоиммунных заболеваний после перенесенного кампилобактериоза. Это возможно в силу того, что поверхностные структуры кампилобактеров (в особенности *C. jejuni*) – липополисахариды (LPS/LOS), аналогичны структурам ганглиозидов плазматической мембраны синапсов, поэтому выработка антител против LOS при кампилобактериозе может вызывать аутоиммунное поражение периферической нервной системы (синдром Гийена-Барре) [11].

В научной литературе последних десятилетий активно освещаются ассоциированные с кампилобактерной инфекцией онкологические состояния желудочно-кишечного тракта. Установлено канцерогенное действие в отношении пищевода, желудка, поджелудочной железы. Доказана ведущая роль кампилобактерий при колоректальном раке [12, 13, 14]

Особенности микробиологической диагностики.

Актуальна проблема исследования кампилобактериозов – микробиологическая диагностика. Дело в том, что кампилобактерии не удается выделить одновременно с другими возбудителями острых кишечных инфекций. Они проявляют высокую чувствительность к продуктам метаболизма сопутствующей кишечной флоры и обычным атмосферным условиям. Жесткие правила транспортировки, повышенные требования к условиям культивирования в значительной мере затрудняют диагностику кампилобактериозов бактериологическим методом, т.е. классическим методов для кишечных патогенов [15].

На современном этапе диагностику кампилобактериоза предпочтительнее проводить с использованием молекулярно-генетических методов. Для метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) показана эффективность в 96-99%, она обусловлена высокой специфичностью праймера в отношении термофильных/мезофильных кампилобактерий [16]. Последним прорывом в области молекулярной биологии считается полногеномное секвенирование, но, несомненно, метод нельзя отнести к широко доступным для клинических лабораторий [17]. Признана эффективность вспомогательных методов диагностики кампилобактериозов с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) и фазово-контрастной микроскопии.

Нельзя не отметить попытки охарактеризовать картину кампилобактериозов в нашей стране – например, проведение исследования распространенности кампилобактерной инфекции среди жителей преарктической зоны Европейского севера. В результате проведенной работы показана четкая динамика уменьшения заболеваемости [18]. Активный эпидемиологический мониторинг кампилобактериозов проводится в Приволжском федеральном округе. Это один из немногих регионов, который проводит верификацию диагноза «кампилобактериоз» [19].

Таким образом, использование современных методов диагностики выступает необходимым условием для проведения эпидемиологического надзора за кампилобактериозами.

Выводы.

Рассмотрены основные микробиологические и эпидемиологические характеристики *Campylobacter* spp.

Эпидемиология кампилобактериозов на современном этапе становится доступной для изучения благодаря:

- поддержке со стороны Всемирной организации здравоохранения национальных и региональных лабораторий в области эпиднадзора за пищевыми патогенами, такими как *Campylobacter* и *Salmonella*;

- совершенствованию используемых в практической медицине методов диагностики;

- формированию нормативно-правовых актов и клинических рекомендаций по лечению кампилобактериозов.

Привлечение медицинской общественности к проблеме кампилобактериозов позволило начать разработку и реализацию эффективного комплекса противоэпидемических мероприятий. Новый вектор исследования кампилобактериозов направлен на изучение их потенциальной канцерогенности. Врачам необходимо уметь дифференцировать инфекцию

Campylobacter spp. от других кишечных инфекций во избежание ошибок лечения и риска развития серьезных осложнений.

Библиографический список

1. Ammar A.M., El-Naenaeey S.Y., El-Gedawy A.A. Campylobacter as a major foodborne pathogen: a review of its characteristics, pathogenesis, antimicrobial resistance and control // Journal of Microbiology, Biotechnology and food sciences. 2021. V. 10. № 4. P. 609-619.
2. Sheppard, Samuel K., Martin C.J. Maiden. The Evolution of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2012. V. 7. № 8. P. 181-190
3. Zhang L. Oral Campylobacter species: Initiators of a subgroup of inflammatory bowel disease? World J Gastroenterol. 2015 Aug 21. V. 21 № 31. P. 9239-9244.
4. World Health Organization. The global view of campylobacteriosis: report an expert consultation // Report WHO. 2012; P. 57.
5. Kreling V., Falcone F.H., Kehrenberg C., Hensel A. Campylobacter sp.: Pathogenicity factors and prevention methods-new molecular targets for innovative antivirulence drugs? // Appl Microbiol Biotechnol. 2020. V. 104 № 2. P. 10409-10436.
6. Faïs T, Delmas J, Serres A, Bonnet R, Dalmasso G. Impact of CDT Toxin on Human Diseases // Toxins (Basel). 2016 Jul 15. V. 8. № 7. P. 220
7. Тазалова, Е.В. Чувствительность кампилобактерий к антибиотикам и некоторые механизмы формирования антибиотикорезистентности // Дальневосточный медицинский журнал. 2012; № 3. С. 120-123.
8. Dahl L.G., Joensen K.G., Østerlund M.T., Kiil K., Nielsen E.M. Prediction of antimicrobial resistance in clinical Campylobacter jejuni isolates from whole-genome sequencing data // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2021. V. 40. № 4. P. 673-682.
9. Forson A.O., Adjei D.N., Olu-Taiwo M., Quarchie M.N., Asmah H.R. Characterization of Campylobacter associated gastric enteritis among patients with Human Immunodeficiency Virus (HIV) in a hospital in Accra, Ghana // PLoS One. 2020. V. 15. № 10. P. 240-242.
10. Smith J.L. Campylobacter jejuni infection during pregnancy: long-term consequences of associated bacteremia, Guillain-Barré syndrome, and reactive arthritis // J Food Prot. 2002. V. 65. № 4. P. 696-708.
11. Tam C.C., Rodrigues L.C., O'Brien S.J. Guillain-Barre syndrome associated with Campylobacter jejuni infection in England, 2000–2001 // Clin Infect Dis. 2003. V. 37. № 2. P. 307–310.
12. Warren, R.L., Freeman, D.J., Pleasance, S. et al. Co-occurrence of anaerobic bacteria in colorectal carcinomas // Microbiome. 2015. V. 1. № 1. P. 16.
13. Li R, Hu Y, Hou S. An Exploration of Oral-Gut Pathogens Mediating Immune Escape of Pancreatic Cancer via miR-21/PTEN Axis // Front Microbiol. 2022 Jun 22. №.13. P. 846928
14. Blackett KL, Siddhi SS, Cleary S, Steed H, Miller MH, Macfarlane S, Macfarlane GT, Dillon JF. Oesophageal bacterial biofilm changes in gastro-oesophageal reflux disease, Barrett's and oesophageal carcinoma: association or causality? // Aliment Pharmacol Ther. 2013 Jun. V. 37. № 11. P. 1084-1092.
15. Айвазян С.Р., Грановский И.Э., Филиппова В.В. Современная лабораторная диагностика острых инфекционных диарейных заболеваний // Российский педиатрический журнал. 2012. №5. С.51-56.

16. Шуляк Б.Ф. Диагностика кампилобактериозов // Российский ветеринарный журнал. 2008; №4. С.19-22.
17. Sheppard, S.K.; Jolley, K.A.; Maiden, M.C.J. A Gene-By-Gene Approach to Bacterial Population Genomics: Whole Genome MLST of Campylobacter // Genes 2012. №3. P. 261-277.
18. Поздеева М.А., Османова Г.Ш., Ирхина И.Е. Кампилобактериоз среди жителей преарктической зоны Европейского Севера // Вестник науки и образования. 2019. Т. 1. № 2. С.75-78.
19. Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях населения Приволжского федерального округа за 2020 год: информационный бюллетень №11 [Электронный ресурс] / Е.И. Ефимов, Г. Г. Побединский, В. И. Ершов, М. В. Вьюшков, С. А. Сарсков. – Н.Новгород, 2021. URL: http://epid-atlas.nniiem.ru/txt_data/pdf/informatsionnyy-byulleten2020.pdf (Дата обращения: 08.10.2022).

ВКЛАД МЕЛАТОНИНА В ФОРМИРОВАНИЕ Т-ХЕЛПЕРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МАРКЕРЫ TH17/TREG

Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Исследованы эффекты гормона мелатонина в отношении субпопуляций Th17, Treg и клеток с промежуточным фенотипом. Мелатонин в концентрации, соответствующей его уровню в периферической крови при фармакологическом использовании, стимулировал дифференцировку Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих ROR γ t/FoxP3, уровень же классических CD4⁺FoxP3⁺Т-клеток снижался. Связанный с этим сдвиг баланса Th17/Treg в направлении Th17 может вносить вклад в развитие воспаления при различных патологических ситуациях.

Ключевые слова: мелатонин, мелатониновые рецепторы, Th17, Treg, ROR γ t⁺/FoxP3⁺ Т-клетки.

THE CONTRIBUTION OF MELATONIN TO THE FORMATION OF T-HELPER SUBPOPULATIONS CO-EXPRESSING TH17/TREG MARKERS

Kuklina E.M., Glebezdina N.S., Nekrasova I.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – Branch of the PFRC Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. The effects of the hormone melatonin on subpopulations of Th17, Treg and cells with an intermediate phenotype were studied. Melatonin at a concentration corresponding to its level in the peripheral blood during pharmacological use stimulated the differentiation of T-lymphocytes co-expressing ROR γ t/FoxP3, while the level of classical CD4⁺FoxP3⁺T cells decreased. The associated shift in the Th17/Treg balance towards Th17 may contribute to the development of inflammation in various pathological situations.

Keywords: melatonin, melatonin receptors, Th17, Treg, ROR γ t⁺/FoxP3⁺ T cells.

Один из основных гормонов эпифиза мелатонин является важнейшим компонентом нейроэндокринной системы [1, 2]. Кроме этого, гормон проявляет и иммунорегуляторную активность [2, 3]. Так, мелатонин способен эффективно регулировать клетки иммунной системы, в частности, Т-хелперы, продуцирующие интерлейкин-17 (Th17), и регуляторные Т-клетки (Treg). Данные субпопуляции экспрессируют рецепторы для мелатонина – как мембранные (MT1/MT2), так и внутриклеточный (ROR α), и находятся под непосредственным контролем гормона [4-8]. Th17 инициируют воспалительные, аутоиммунные реакции, реакции

отторжения трансплантата, играют особое значение в борьбе с экстраклеточными патогенами [9-11]. Treg же, выполняя реципрокные функции, активно поддерживают иммунологическую аутоотолерантность, секретируя иммуносупрессивные цитокины, ответственны за гипореактивность к опухолевым антигенам и за индукцию толерантности к трансплантату [12-15]. Однако данные субпопуляции крайне неоднородны и обладают высокой пластичностью. Так, дифференцированные Th17 способны трансформироваться в $IFN\gamma^+Th17^+$ -клетки, так называемые Th17/Th1-клетки [16], или в Treg [17], тогда как регуляторные T-лимфоциты при поляризующих условиях трансдифференцируются в IL-17-продуцирующие клетки [18, 19]. Этот потенциал наделяет их многочисленными и противоположными функциями, что позволяет им вызывать качественно различные реакции в зависимости от условий микроокружения [20]. Механизмы пластичности наивных и зрелых клеточных популяций в полной мере не изучены, но этот процесс очень важен, поскольку именно неклассическим популяциям Th17/Treg отводят в настоящее время ведущую роль в патогенезе различных заболеваний. Целью данной работы была оценка вклада мелатонина в формирование промежуточных форм T-хелперных субпопуляций Th17 и Treg.

Объектами исследования служили лейкоциты здоровых небеременных женщин (n=10). От всех доноров получено информированное согласие на участие в исследовании. Лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина (1,077 г/см³, “Pharmacia”, Швеция). Из суспензии мононуклеарных клеток получали Treg методом иммуномагнитной сепарации (“R&D Systems”, США), которые (1·10⁶ клеток/мл) культивировали 48 часов в среде RPMI 1640 (“Gibco. Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Serva”, Германия), 1 mM HEPES (“Sigma-Aldrich”, США), 2 mM L-глутамин (“Serva”, Германия) и 40 ед/мл гентамицина (“Pharmacia”, Швеция), при 37° С и 5% CO₂ – без активатора (спонтанный вариант) и в условиях поликлональной активации (система для активации на основе моноклональных антител к CD3/CD28, “Invitrogen”, США). Экспрессия клетками транскрипционных факторов ROR γ t (маркера дифференцировки Th17) и FOXP3 (маркера Treg), а также внутриклеточного IL-17 определялась по окончании 48-часового культивирования проточной цитометрией с использованием моноклональных антител (“Biolegend”, “Novus Biologicals”, “R&D Systems”, США) по стандартной методике. Мелатонин (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрациях 0,5 и 5 нг/мл, соответствующих фармакологическим уровням гормона в крови [21], вносили в культуру за 30 минут до активации. Вклад мембранных мелатониновых рецепторов в реализацию эффектов гормона определяли с использованием соответствующих антагонистов – неселективного (лузиндол – для MT1/MT2) и селективного (4-P-PDOT – для MT2), оба “Tocris Bioscience”, США [22]. Их вносили в интактную и стимулированную (CD3/CD28) культуру Treg за час до активации. Статистический анализ проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

В результате проведенных исследований *in vitro* мы обнаружили, что в присутствии мелатонина в культуре интактных лимфоцитов содержание классических Treg (CD4⁺FoxP3⁺T-клеток) снижалось (процент CD4⁺FoxP3⁺T-клеток: 6,26 ± 0,871 – контроль, 3,38 ± 0,725 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, *p* < 0,05; 4,47 ± 0,926 – на фоне 5 нг/мл мелатонина, *p* > 0,05). В условиях поликлональной активации изменений не выявлено. При этом супрессивный эффект гормона в отношении классических Treg отменялся при блокаде мембранных рецепторов для мелатонина (процент CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, спонтанный вариант: 4,51 ± 0,847 – на фоне лузиндола, 3,81 ± 0,648 – на фоне лузиндола и 0,5 нг/мл мелатонина, *p* > 0,05; 4,85 ± 1,05 – на

фоне 4-P-PDOT, $4,35 \pm 0,753$ – на фоне 4-P-PDOT и 0,5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). В отношении классической субпопуляции Th17 ($CD4^+ROR\gamma^+T$ -клеток) статистически значимого действия мелатонина не выявлено, хотя также имеется тенденция к снижению. Тем не менее, баланс $CD4^+ROR\gamma^+/CD4^+FoxP3^+$ -клеток на фоне гормона сдвигается в направлении Th17 (соотношение $CD4^+ROR\gamma^+/CD4^+FoxP3^+$ Т-клеток: $0,334 \pm 0,054$ – контроль, $0,589 \pm 0,15$ – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p = 0,05$, $0,516 \pm 0,142$ – на фоне 5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Этот эффект подтверждается и ростом соотношения уровня экспрессии соответствующих транскрипционных факторов в клетке (MFI $ROR\gamma^+$ /MFI $FoxP3$, спонтанный вариант: $0,615 \pm 0,103$ – контроль, $1,01 \pm 0,260$ – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$; $1,07 \pm 0,202$ – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$).

Важно отметить, что в культуре интактных Т-лимфоцитов мелатонин в фармакологической концентрации 0,5 нг/мл вызывает появление заметной фракции $CD4^+T$ -клеток с промежуточным фенотипом – коэкспрессирующих $ROR\gamma^+/FoxP3$ (процент $CD4^+ROR\gamma^+FoxP3^+$ Т-клеток, спонтанный вариант: $0,538 \pm 0,084$ – контроль, $2,24 \pm 0,647$ – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$; $1,35 \pm 0,482$ – на фоне 5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Более того, соотношение уровней экспрессии транскрипционных факторов $ROR\gamma^+/FoxP3$ в таких клетках повышено на фоне гормона (MFI $ROR\gamma^+$ /MFI $FoxP3$ в $CD4^+ROR\gamma^+FoxP3^+$ Т-клетках, спонтанный вариант: $0,514 \pm 0,078$ – контроль, $1,26 \pm 0,339$ – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$; $0,463 \pm 0,062$ – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Данный эффект подтверждается также присутствием в соответствующих пробах IL-17-продуцирующих лимфоцитов, несущих маркер регуляторных клеток $FoxP3$, и тенденцией к повышению уровня этих клеток на фоне мелатонина (процент $CD4^+IL-17^+FoxP3^+$ -клеток, спонтанный вариант, $n = 4$: $0,723 \pm 0,161$ – контроль, $3,24 \pm 0,941$ – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$; $1,67 \pm 0,441$ – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Строго говоря, такая неклассическая субпопуляция может быть результатом как редифференцировки Treg или Th17 [23], так и первичной дифференцировки наивных $CD4^+T$ -клеток, также присутствующих в культуре, однако, учитывая показанное выше мелатонин-зависимое снижение уровня $CD4^+FoxP3^+$ -клеток, речь идет, по-видимому, о первом варианте, то есть о приобретении регуляторными Т-клетками маркеров и свойств провоспалительной субпопуляции Th17.

В целом, данные, полученные *in vitro*, указывают на способность экзогенного мелатонина в концентрации, соответствующей его уровню в периферической крови при фармакологическом использовании, стимулировать дифференцировку Т-лимфоцитов с промежуточным фенотипом, коэкспрессирующих маркеры Т-хелперных субпопуляций Th17/Treg. Различие по величине эффектов гормона в отношении классических субпопуляций Th17/Treg в итоге приводит к сдвигу баланса в направлении провоспалительной субпопуляции Th17, что может вносить вклад в развитие воспаления при различных патологических ситуациях.

Работа поддержана грантом РНФ и Пермским краем № 22-25-20121.

Библиографический список

1. Macchi M.M., Bruce J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin // Front Neuroendocrinol. – 2004. – V. 25 (3-4). – P. 177-195.

2. Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. Melatonin – A pleiotropic, orchestrating regulator molecule // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – V. 93 (3). – P. 350-384.
3. Mahmood D. Pleiotropic Effects of Melatonin // *Drug. Res (Stuttg).* – 2019. – V. 69 (02). – P. 65-74.
4. Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Srinivasan V., Spence D.W., Maestroni G.J., Zisapel N., Cardinali D.P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – V. 85 (3). – P. 335-353.
5. Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – V. 351. – № 2. – P. 152–166.
6. Kuklina E.M. Melatonin as potential inducer of Th17 cell differentiation // *Med. Hypotheses.* 2014. – V. 83 (3). – P. 404-406.
7. Куклина Е.М., Глебздина Н.С., Некрасова И.В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17) // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2015. – Т. 160 (11). – С. 604-607.
8. Глебздина Н.С., Олина А.А., Некрасова И.В., Куклина Е.М. Молекулярные механизмы контроля дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов экзогенным мелатонином // *Доклады Академии наук.* – 2019. – Т. 484 (2). – С. 224-227.
9. Maddur M.S., Miossec P., Kaveri S.V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies // *Am. J. Pathol.* – 2012. – V.181. – P. 8-18.
10. Lee S.K., Kim J.Y., Lee M., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – V. 67. – P. 311–318.
11. Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S. Circulating and Decidual Th17 Cell Levels in Healthy Pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – V. 63. – P. 104–109.
12. Prado D.S., Cattley R.T., Shipman C.W., Happe C., Lee M., Boggess W.C., MacDonald M.L., Hawse W.F. Synergistic and additive interactions between receptor signaling networks drive the regulatory T cell versus T helper 17 cell fate choice // *J. Biol. Chem.* – 2021. – V. 297 (6). – P. 101330.
13. Kanamori M., Nakatsukasa H., Okada M., Lu Q., Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications // *Trends Immunol.* – 2016. – V. 37 (11). – P. 803–811.
14. Jeffery H.C., Braitch M.K., Brown S., Oo Y.H. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives // *Front. Immunol.* – 2016. – V. 7. – P. 334.
15. Shevryev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 10. – P. 3100.
16. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis // *Allergy.* – 2011. – V. 66 (8). – P. 989-998.
17. Gagliani N., Amezcua Vesely M.C., Iseppon A. et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation // *Nature.* – 2015. – V. 523 (7559). – P. 221-225.
18. Koenen H.J., Smeets R.L., Vink P.M., van Rijssen E., Boots A.M., Joosten I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells // *Blood.* – 2008. – V. 112 (6). – P. 2340-2352.
19. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20 (1). – P. 62-68.

20. Guery L., Hugues S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V. 2015. – P. 314620.
21. Gooneratne N.S., Edwards A.Y., Zhou C., Cuellar N., Grandner M.A., Barrett J.S. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults // *J. Pineal. Res.* – 2012. – V. 52 (4). – P. 437-445.
22. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signaling in the context of system bias // *Br. J. Pharmacol.* – 2018. – V. 175 (16). – P. 3263-3280.
23. Yazdani M.R., Khosropanah S., Doroudchi M. Interleukin-17 production by CD4⁺CD45RO⁺Foxp3⁺ T cells in peripheral blood of patients with atherosclerosis // *Arch. Med. Sci. Atheroscler. Dis.* – 2019. – V. 4. – e215-e224.

ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ *PSEUDOMONAS SP. IO14*

Кулеш П.А.¹, Корсакова Е.С.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

Аннотация. Исследован грамтрицательный штамм-деструктор терефталевой кислоты, выделенный из промышленных стоков химического предприятия (Пермский край). Наибольшее филогенетическое сходство штамм IO14 проявил с типовым штаммом *Pseudomonas qingdaonensis* JJ3^T. Отмечен эффективный рост исследуемого штамма при высоких концентрациях терефталевой кислоты (до 50 г/л). В клетках штамма *Pseudomonas sp.* IO14 обнаружена плазмида большого размера (~100 т.п.н.), а также две плазмиды размером около 10 т.п.н. и 20 т.п.н.

Ключевые слова: грамтрицательные бактерии, *Pseudomonas*, терефталевая кислота, деструкция.

STRAIN-DESTRUCTOR OF TEREPHTHALIC ACID *PSEUDOMONAS SP. IO14*

Kulesh P. A.¹, Korsakova E. S.^{1,2}

¹ Perm State University, Perm, Russia.

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia.

Abstract. A gram-negative strain-destroyer of terephthalic acid isolated from industrial effluents of a chemical enterprise (Perm krai) has been studied. Strain IO14 showed the greatest phylogenetic similarity with the type strain *Pseudomonas qingdaonensis* JJ3^T. Effective growth of the studied strain was noted at high concentrations of terephthalic acid (up to 50 g/l). In the cells of the *Pseudomonas sp.* IO14 strain, a large plasmid (~100 kb) was found, as well as two plasmids of about 10 kb and 20 kb.

Keywords: gram-negative bacteria, *Pseudomonas*, terephthalic acid, destruction.

В последние десятилетия активно проводятся исследования по изучению токсического воздействия фталатов (в том числе производных терефталевой кислоты (ТФК)), на окружающую среду и живые организмы из-за их способности аккумулироваться в различных компонентах экосистем [1, 2]. Загрязнение данными соединениями носит комплексный характер: потери при промышленных производствах, диффундирование из пластмассовых материалов в течении времени, улетучивание при сжигании пластмасс, главным компонентом

производства которых является ТФК [3]. Наиболее удобным и рациональным методом разложения таких соединений считается биodeградация при использовании метаболического потенциала микроорганизмов. Данный метод требует гораздо меньше финансовых затрат и осуществляется в более короткие сроки [4]. Ряд исследований свидетельствует, что значительный вклад в деградацию терефталатов вносят грамотрицательные бактерии. Среди них наиболее часто встречаются представители родов *Pseudomonas*, *Comamonas*, *Sphingomonas* и *Acinetobacter* [5-8]. Также известны метаболические пути бактериальной деградации терефталевой кислоты через образование 1,2-дигидрокси-3,5-циклогексадиен-1,4-дикарбоновой кислоты с помощью ключевого фермента терефталат 1,2-диоксигеназы и последующим разложением до протокатеховой кислоты [8].

Цель работы – характеристика штамма-деструктора ТФК рода *Pseudomonas* и исследование его способности расти на разных концентрациях ТФК.

Для проведения исследования из рабочей коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» отобраны грамотрицательные штаммы бактерий, ранее выделенные из промышленных стоков химического предприятия (г. Пермь). Штаммы были проверены на рост в минеральной среде К1 [8] с терефталевой кислотой в качестве единственного источника углерода и энергии. Для дальнейшей работы был выбран наиболее активный штамм-деструктор IO14, при последующем секвенировании и биоинформационном анализе гена 16S рРНК идентифицированный как представитель рода *Pseudomonas* (семейство *Pseudomonadaceae*). Наибольшее филогенетическое сходство (100%) штамм проявлял с типовым штаммом вида *Pseudomonas qingdaonensis* (рис. 1).

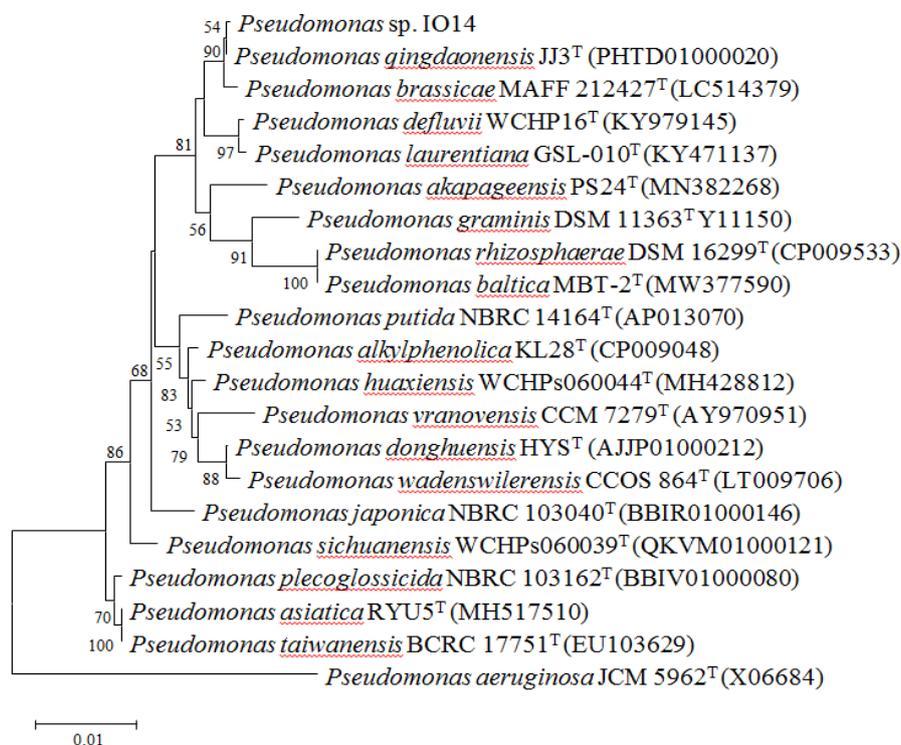


Рисунок 1 – Филогенетическое древо, построенное с использованием метода «neighbor-joining», показывающее положение исследуемых штаммов бактерий рода *Pseudomonas*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длиной 1340 п.н.). Эволюционные расстояния рассчитаны по методу «Jukes-Cantor». Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов. Цифрами показана статистическая достоверность порядка ветвления, определенная с помощью «bootstrap»-анализа 1000 альтернативных деревьев (приведены значения выше 50%). Номера в базе данных GenBank указаны в скобках.

В ходе выполнения работы был исследован характер роста штамма *Pseudomonas* sp. Ю14 на разных концентрациях ТФК при культивировании в минеральной среде К1. В качестве инокулята использовали культуры в экспоненциальной фазе роста, выращенные на К1 с ТФК (1 г/л) в качестве субстрата. Оптическую плотность ($ОП_{600}$) культуральной жидкости определяли на спектрофотометре UV Visible BioSpec-mini («Shimadzu», Япония) при длине волны 600 нм в кювете с длиной оптического пути 1 см. Расчет удельной скорости роста (μ) и длительности *lag*-фазы проводили по стандартным формулам [9]. Было установлено, что эффективный рост исследуемого штамма отмечен при содержании ТФК в концентрации от 1 до 50 г/л, в то время как по литературным данным бактерии-деструкторы рода *Pseudomonas* характеризуются способностью к росту на минеральных средах с концентрацией ТФК не превышающей значение 1 г/л [7] (рис. 2).

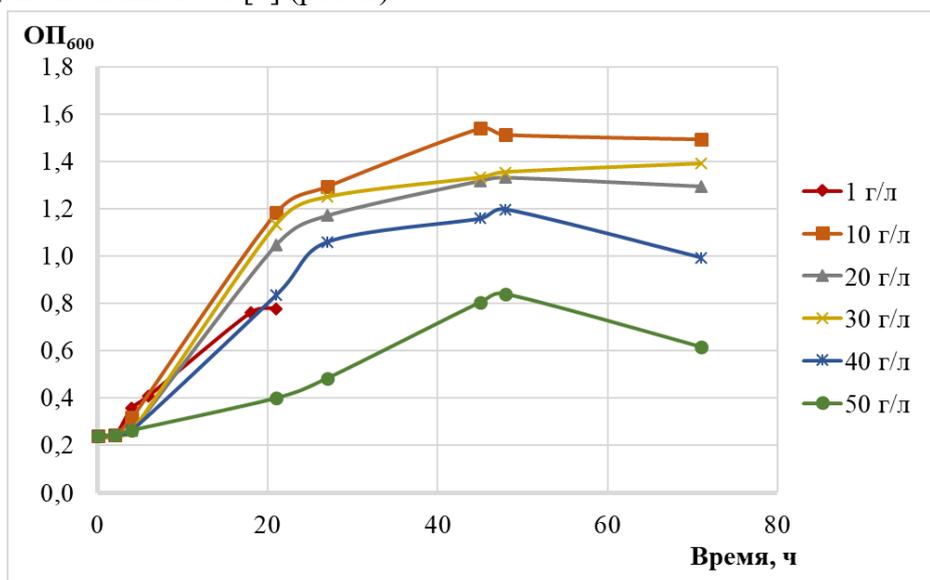


Рисунок 2 – Рост штамма *Pseudomonas* sp. Ю14 в МСР на при разных концентрациях ТФК (г/л).

Установлена прямая зависимость между повышением концентрации в среде культивирования и увеличением длительности лаг-фазы роста. Наиболее высокие значения ростовых параметров, максимум оптической плотности ($ОП_{600}=1,5388$) и максимальная удельная скорость роста ($\mu=0,041\pm 0,001\text{ ч}^{-1}$), были зафиксирована при концентрации ТФК 10 г/л спустя 45 часов после посева (табл. 1).

Таблица 1 – Ростовые характеристики штамма *Pseudomonas* sp. Ю14 в минеральной среде К1 при разных концентрациях ТФК

Параметр	Концентрация ТФК (г/л)					
	1	10	20	30	40	50
Удельная скорость роста, ч^{-1}	$0,032\pm 0,001$	$0,041\pm 0,001$	$0,024\pm 0,001$	$0,025\pm 0,001$	$0,034\pm 0,001$	$0,026\pm 0,002$
Максимальное значение $ОП_{600}$	0,897	1,539	1,332	1,365	1,197	0,839
Лаг-фаза роста, ч	2	2	4	4	6	6

В клетках исследуемого штамма была обнаружена плазмида большого размера (с молекулярной массой около 100 т.п.н.), а также 2 плазмиды размером около 10 т.п.н. и

20 т.п.н. При использовании праймеров для детекции *trh*-гена, кодирующего α -субъединицу терефталат 1,2-диоксигеназы, грамотрицательных бактерий-деструкторов ТФК [8], данный ген не был детектирован в клетках штамма Ю14. Полученный результат позволяет предположить отличие ключевого гена деструкции ТФК исследуемого штамма от известных *trh*-генов.

В результате выполненного исследования можно заключить, что штамм-деструктор ТФК *Pseudomonas* sp. Ю14 перспективен для дальнейшего изучения и использования в биотехнологических целях.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

Библиографический список

1. Mondal T., Mondal S., Ghosh S.K., Pal P., Soren T., Pandey S., Maiti T.K. Phthalates – a family of plasticizers, their health risks, phytotoxic effects, and microbial bioaugmentation approaches // *Environ. Res.* – 2022. – V. 214. – Pt. 3:114059.
2. Wang Y., Zhu H., Kannan K. A review of biomonitoring of phthalate exposures // *Toxics.* – 2019. – V.5. – №7(2):21.
3. Karthik M., Dafale N., Pathe P., Nandy T. Biodegradability enhancement of purified terephthalic acid wastewater by coagulation–flocculation process as pretreatment // *Journal of Hazardous Materials.* – 2008. – V. 154. – P. 721–730.
4. Hu R., Zhao H., Xu X., Wang Z., Yu K., Shu L., Yan Q., Wu B., Mo C., He Z., Wang C. Bacteria-driven phthalic acid ester biodegradation: current status and emerging opportunities // *Environ Int.* – 2021. – V. 154:106560.
5. Liang D. W., Zhang T., Fang H., He J. Phthalates biodegradation in the environment // *Applied microbiology and biotechnology.* – 2008. – V. 80. – P. 183–198.
6. Kapanen A., Stephen J., Brüggemann J., Kiviranta A., White D., Itävaara M. Diethyl phthalate in compost: ecotoxicological effects and response of the microbial community. *Chemosphere.* – 2007. – V. 67. – P. 2201–2209.
7. Sasoh M., Masai E., Ishibashi S., Hara H., Kamimura N., Miyauchi K., Fukuda M. Characterization of the terephthalate degradation genes of *Comamonas* sp. strain E6 // *Appl Environ Microbiol.* – 2006. – V. 72(3). – P. 1825–32
8. Wang Z.J., Teng L.H., Zhang J.F. Study on optimal biodegradation of terephthalic acid by an isolated *Pseudomonas* sp. // – *Afr. J. Biotechnol.* – 2011. – V. 10. – №. 16. – P. 3143–3148.
9. Maltseva O.V., Tsoi T.V., Quensen III J.F., Fukuda M., Tiedje J.M. Degradation of anaerobic reductive dechlorination products of Aroclor 1242 by aerobic bacteria // *Biodegradation.* – 1999. – V. 10. – P. 363–371.
10. Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии. М.: Академия, – 2005. – 608 с.

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ОКСИДА МЕДИ НА ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCUS*

Макарова М.В.¹, Суслопарова А.Ф.¹, Куюкина М.С.^{1,2}

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ФГБУН ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Методом динамического и электрофоретического светорассеяния изучено влияние наночастиц (НЧ) Cu и CuO на поверхностный заряд родококков в зависимости от размеров, дисперсности и дзета-потенциала НЧ. Заряд клеточной стенки родококков под действием возрастающих (0,001-0,1 г/л) концентраций НЧ Cu и CuO преимущественно сдвигался в отрицательную область. При концентрации НЧ 1,0 г/л дзета-потенциал бактериальных клеток приближался к значениям наночастиц, свидетельствуя об аккумуляции НЧ родококками.

Ключевые слова: актинобактерии, родококки, наночастицы металлов, дзета-потенциал.

COMPARATIVE EFFECTS OF COPPER AND COPPER OXIDE NANOPARTICLES ON THE ZETA POTENTIAL OF ACTINOBACTERIA OF THE GENUS *RHODOCOCCUS*

Makarova M. V.¹, Susloparova A.F.¹, Kuyukina M. S.^{1,2}

¹Perm State University, Perm, Russia

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Perm Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. The effects of Cu and CuO nanoparticles (NPs) on the surface charge of actinobacteria of the genus *Rhodococcus* depending on the size, dispersion, and zeta potential of NPs was studied by dynamic and electrophoretic light scattering. An increase in the concentration (0.001-0.1 g/l) of Cu and CuO nanoparticles the charge of the *Rhodococcus* cell wall moved to a more negative area. At a concentration of NPs of 1.0 g/l, the zeta potential of bacterial cells approached the values of nanoparticles, thus suggesting the accumulation of nanoparticles on the cell surface.

Keywords: actinobacteria, *Rhodococcus*, metal nanoparticles, zeta potential.

Наночастицы (НЧ) характеризуются размером от 1 до 100 нм, обладают уникальными физико-химическими, оптическими и биологическими свойствами, которыми можно оперировать для достижения требуемых функциональных характеристик [1,2]. НЧ классифицируются в зависимости от размера, морфологии, химического состава, однородности и агломерации.

Механизмы действия НЧ металлов, отличных от благородных (золото, серебро, платина), на микроорганизмы мало изучены. Известно, что они могут оказывать как бактериостатический, так и бактерицидный эффект, который, главным образом, заключается в непосредственном контакте с клеточной стенкой бактерий, что сопровождается нарушением целостности бактериальной мембраны и/или образованием активных форм кислорода (АФК) [3]. Нанометаллы способны взаимодействовать с пептидогликанами клеточной стенки, блокируя способность потреблять питательные вещества, или выступают в роли катализатора, способствуя окислению содержимого клетки растворенным в воде кислородом. Механизм действия НЧ зависит как от вида микроорганизмов, на который оказывается воздействие, так и от типа наночастиц, их концентрации, размера, а также от способа их получения [3-5].

НЧ меди демонстрируют выраженные антибактериальные свойства, являясь потенциальными наноантибиотиками. Однако, несмотря на высокую эффективность НЧ меди в отношении микроорганизмов *in vitro*, следует учитывать их возможное токсическое действие, оказываемое на живые ткани, что требует дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo* [6]. Согласно некоторым данным [7], НЧ металлов в малых дозах стимулируют размножение отдельных групп бактерий, тогда как в высоких – оказывают бактерицидный и бактериостатический эффект, вызывая нарушения целостности клеточной мембраны и изменения в работе внутриклеточных систем. Поэтому применение нанометаллов в низких концентрациях для стимулирования роста и направленной модификации функциональной активности полезных микроорганизмов представляется перспективным.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают высокой устойчивостью неблагоприятным факторам внешней среды, а также действию различных ксенобиотиков, таких как нефтяные углеводороды, фенолы, растворители, пестициды и фармацевтические загрязнители. Эти свойства, наряду со способностью к биоаккумуляции солей металлов, определяют их использование в природоохранной биотехнологии [8,9]. Изучение механизмов устойчивости родококков к воздействию НЧ металлов перспективно для возможной функционализации клеток и получения биокатализаторов с улучшенными свойствами.

Цель работы: изучить сравнительные эффекты наночастиц меди и оксида меди на дзета-потенциал актинобактерий рода *Rhodococcus*.

В работе использовали культуры *R.rhodochrous* ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362, ИЭГМ 1161, ИЭГМ 1162, ИЭГМ 757, *R.ruber* ИЭГМ 1217, ИЭГМ 1135, ИЭГМ 1352, ИЭГМ 1121, ИЭГМ 628, *R.jostii* ИЭГМ 68, ИЭГМ 60, ИЭГМ 458, ИЭГМ 550, ИЭГМ 508, *R.erythropolis*, ИЭГМ 344, ИЭГМ 661, ИЭГМ 766, ИЭГМ 693, ИЭГМ 706, *R.fascians* ИЭГМ 1218, ИЭГМ 534, ИЭГМ 531, ИЭГМ 525, ИЭГМ 173 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WDCM #768; <http://iegmcol.ru/>) и НЧ Cu, CuO в водном растворе, стабилизированном β -циклодекстрином (ООО «М9», Тольятти). НЧ использовали в десятикратных концентрациях (0,001 – 1,0 г/л), перед измерениями дважды промывали 10 мМ KNO₃ и диспергировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Великобритания).

Бактерии, выращенные на МПА, суспендировали в 10 мМ KNO₃ до значения оптической плотности (OD₆₀₀), равной 0,5. Размер НЧ и их электрокинетический потенциал, а также заряд бактериальных клеток измеряли методами динамического и электрофоретического рассеяния света с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

В результате исследования определены следующие размерные показатели НЧ: Cu – 148±39, CuO – 175±54 нм. Для НЧ CuO выявлена обратная корреляция между показателями

полидисперности (PDI – Polydispersity Index) и размерами наночастиц. При увеличении концентрации НЧ наблюдалось снижение показателя полидисперности (PDI – Polydispersity Index) и увеличение размеров НЧ, что может быть следствием образования агрегатов, характеризующихся более высокой гомогенностью суспензии по сравнению с индивидуальными НЧ (рис. 1). Электрокинетический потенциал НЧ также варьировал в зависимости от концентрации нанометаллов и составлял от -14 до -27 мВ для НЧ Cu и от -21 до -35 мВ для НЧ CuO. Обнаружена корреляция значений заряда НЧ и показателей полидисперности (PDI). Так монодисперные суспензии НЧ с низким PDI (<0,5) характеризовались наиболее высоким по модулю отрицательным электрокинетическим потенциалом (рис. 2) и, следовательно, большей коллоидной стабильностью.

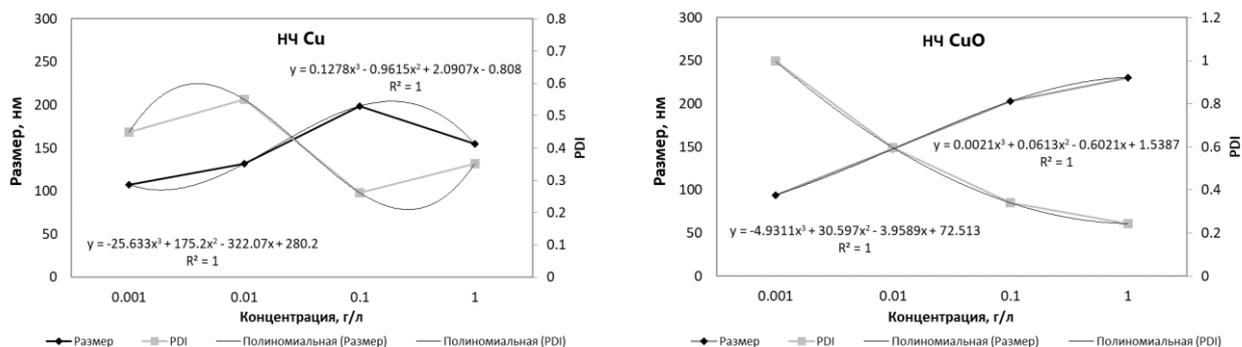


Рисунок 1 – Зависимость размеров НЧ металлов от PDI.

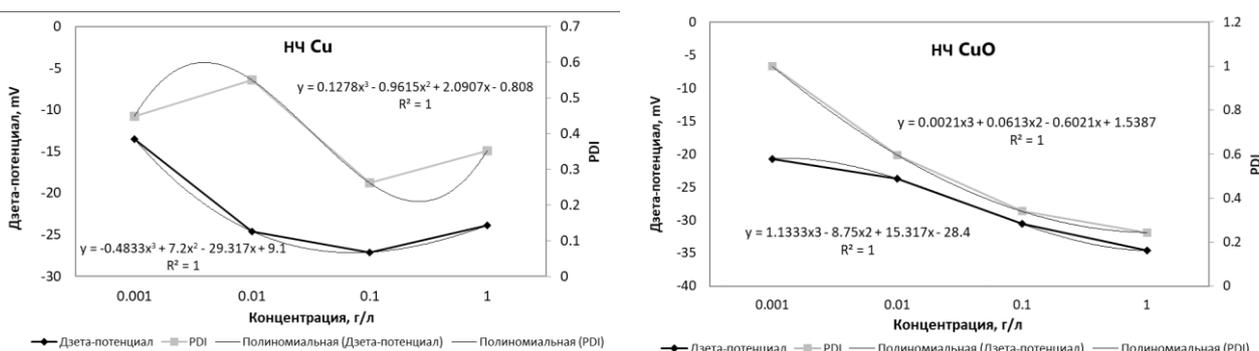


Рисунок 2 – Зависимость заряда НЧ металлов от PDI.

По нашим данным (рис. 3), дзета-потенциал клеток родококков при взаимодействии с НЧ CuO в минимальной концентрации (0,001 г/л) практически не отличался от значений биотического контроля, увеличение концентрации НЧ CuO до 1 г/л вызывало плавный сдвиг заряда клеток по направлению заряда НЧ. Аналогичные изменения электрокинетического потенциала бактериальных клеток выявлены под воздействием наночастиц меди. Повышение концентрации НЧ до 0,01–0,1 г/л оказывало разнонаправленное действие на электрокинетический потенциал клеток родококков разных видов. Так у представителей *R. rhodochrous* при воздействии НЧ меди и оксида меди в концентрации 0,1 г/л наблюдался сдвиг заряда в отрицательную область (от -38,3 до -41,1 мВ при добавлении НЧ Cu и от -36,2 до -39,9 мВ в присутствии НЧ CuO), тогда как максимальная концентрация (1 г/л) повышала дзета-потенциал клеток, приближая его к значениям НЧ меди и оксида меди (-36,5 и -34,2 мВ соответственно).

Воздействие НЧ CuO на клетки *R. fascians* также вызывало понижение дзета-потенциала (от -27,5 до -31,4 мВ), в то время как при добавлении НЧ меди дзета-потенциал незначительно

повышался при максимальной (1 г/л) концентрации НЧ (от -31,1 до -30,7). В целом, НЧ меди и оксида меди преимущественно сдвигали в отрицательную область (на 44% и 56% соответственно) клеточный заряд родококков данных видов.

При взаимодействии клеток *R. jostii* ИЭГМ 550 с НЧ меди в концентрации 1 г/л клеточный заряд увеличивался на 35%, однако данная максимальная концентрация НЧ Cu, напротив, вызывала сдвиг (на 52%) дзета-потенциала клеток *R. erythropolis* ИЭГМ 766 в отрицательную область. Заряд клеток *R. jostii* ИЭГМ 458 и *R. erythropolis* ИЭГМ 766 при добавлении наночастиц оксида меди также сдвигался в отрицательную область на 63% и 45% соответственно.

Таким образом, согласно полученным результатам, НЧ меди и оксида меди преимущественно сдвигают электрокинетический потенциал родококков в отрицательную область. При максимальной (1,0 г/л) концентрации НЧ Cu и CuO заряд клеточной стенки принимает значения, близкие к зарядам НЧ, что свидетельствует об активной аккумуляции НЧ металлов на поверхности клеток. Для дальнейшей работы по функционализации клеток отобраны штаммы *R. erythropolis* ИЭГМ 766, *R. jostii* ИЭГМ 458 и *R. jostii* ИЭГМ 550, для которых характерны наиболее выраженные изменения заряда под действием НЧ металлов.

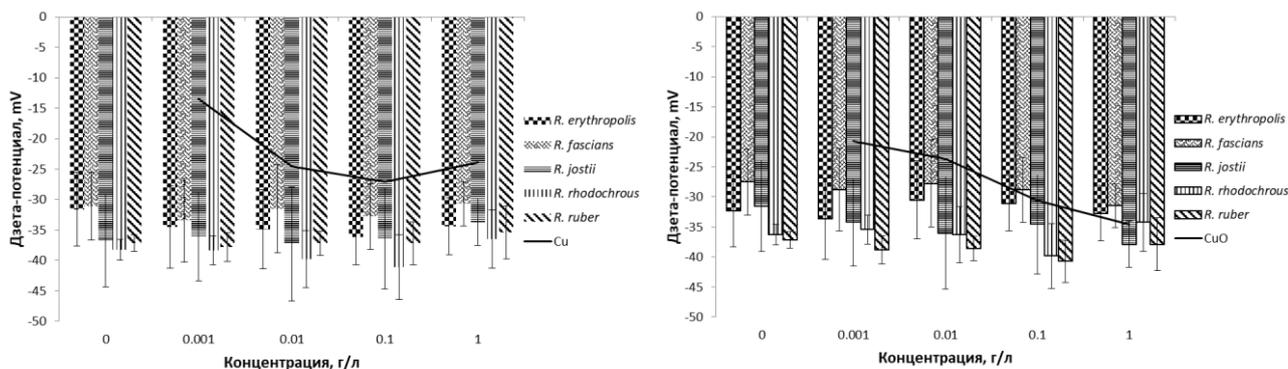


Рисунок 3 – Изменение клеточного заряда родококков при разных концентрациях НЧ металлов.

Работа поддержана грантом РФФ 18-14-001340.

Библиографический список

1. Ealia A. M., Saravanakumar M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering – 2017. – V. 263. – P. 032019.
2. Saleh T. A. Nanomaterials: Classification, properties, and environmental toxicities // Environmental Technology and Innovation. – 2020. – V. 20(11). – P. 101067.
3. Gold K., Slay B., Knackstedt M., Gaharwar A. K. Antimicrobial Activity of Metal and Metal-Oxide Based Nanoparticles // Advanced Therapeutics. – 2018. – V.1. – №3. – P. 1700033.
4. Мацакова Е.Г., Симакова Д.И. Наночастицы, проявляющие антибактериальные эффекты: свойства, получение, механизм действия, применение // Российские нанотехнологии. – 2020. – Т. 15. – № 2. – С. 238-243.

5. Aruoja V., Pokhrel S., Sihtmäe M., Mortime M., Mädler L., Kahru A. Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa// *Environmental Science Nano*. – 2015. – V. 2. – P. 630–644.
6. Удегова Е.С., Гильдеева К.А., Рукоосуева Т.В., Съед Б. Антибактериальный эффект наночастиц металлов на антибиотикорезистентные штаммы бактерий // *Инфекция и иммунитет*. – 2021. – Т.11. – № 4. – С.771-776.
7. Яушева Е.В., Сизова Е.А., Гавриш И.А, Лебедев С.В., Каюмов Ф.Г. Действие наночастиц Al_2O_3 на почвенный микробиоценоз, состояние антиоксидантной системы и микрофлору кишечника красного калифорнийского червя (*Eisenia foetida*) // *Сельскохозяйственная биология*. – 2017. – Т. 52. – №1. – С. 191–199.
8. Kuyukina M.S., Ivshina I.B. Bioremediation of contaminated environments using *Rhodococcus* // In: *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs / Ed. A. Steinbüchel. Springer, 2019. – V. 16. – P. 231-270.
9. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углекислородфиксирующие родококки: особенности биологической организации под воздействием экотоллютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. УрО РАН, 2021. С. 140.

ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА СОСТАВА ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ СООБЩЕСТВ РОССИЙСКОГО ТРЮФЕЛЕВОГО ГРИБА *TUBER MACROSPORUM*

Малыгина Е.В., Моргунова М.М., Имидоева Н.А., Власова А.А., Дмитриева М.Е.,
Бельшенко А.Ю., Тельнова Т.Ю., Аксёнов-Грибанов Д.В.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

Аннотация. В ходе данного исследования показано, что трюфельные грибы вида *T. macrosporum* формируют уникальные консорциумы с большим разнообразием прокариотических микроорганизмов. Данные микроорганизмы принадлежат редким родам почвенных бактерий и представляют особую ценность для понимания их влияния на рост и развитие плодовых тел трюфельных грибов.

Ключевые слова: трюфельные грибы, метагеномный анализ, секвенирование, симбиоз, прокариоты.

PRIMARY ASSESSMENT OF THE COMPOSITION OF PROKARYOTIC COMMUNITIES OF THE RUSSIAN TRUFFLE MUSHROOM *TUBER MACROSPORUM*

Malygina E.V., Morgunova M.M., Imidoeva N.A., Vlasova A.A., Dmitrieva M.E.,
Belyshenko A.Yu., Telnova T.Yu., Aksenov-Gribanov D.V.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. This study shows that *T. macrosporum* truffle mushrooms form unique consortiums with a wide variety of prokaryotic microorganisms. These microorganisms belong to rare genera of soil bacteria and are of particular value for understanding their influence on the growth and development of the fruiting bodies of truffle fungi.

Keywords: Truffle mushrooms, metagenomic analysis, sequencing, symbiosis, prokaryotes.

Трюфельные грибы являются сумчатыми грибами, их плодовые тела образуются в почве или в листовой подстилке, которые находятся в симбиотических ассоциациях с растениями [1]. Трюфельные грибы выступают одним из источников пищи, богатой белком, липидами и ненасыщенными жирными кислотами, углеводами и клетчаткой, а также минералами. Так, трюфельные грибы входят в число самых ценных продуктов питания и считаются редким деликатесом из-за их вкуса и неповторимого аромата. Исследования неоднократно показывали, что возраст плодового тела, разнообразие микроорганизмов и другие биологические параметры ответственны за вкус данных грибов [2].

Микробиом трюфеля в основном состоит из почвенных микробных сообществ, которые на ранней стадии формирования плодовых тел трюфелей могут играть важную роль в их

Механизмы действия НЧ металлов, отличных от благородных (золото, серебро, платина), на микроорганизмы мало изучены. Известно, что они могут оказывать как бактериостатический, так и бактерицидный эффект, который, главным образом, заключается в непосредственном контакте с клеточной стенкой бактерий, что сопровождается нарушением целостности бактериальной мембраны и/или образованием активных форм кислорода (АФК) [3]. Нанометаллы способны взаимодействовать с пептидогликанами клеточной стенки, блокируя способность потреблять питательные вещества, или выступают в роли катализатора, способствуя окислению содержимого клетки растворенным в воде кислородом. Механизм действия НЧ зависит как от вида микроорганизмов, на который оказывается воздействие, так и от типа наночастиц, их концентрации, размера, а также от способа их получения [3-5].

НЧ меди демонстрируют выраженные антибактериальные свойства, являясь потенциальными наноантибиотиками. Однако, несмотря на высокую эффективность НЧ меди в отношении микроорганизмов *in vitro*, следует учитывать их возможное токсическое действие, оказываемое на живые ткани, что требует дальнейшего изучения в экспериментах *in vivo* [6]. Согласно некоторым данным [7], НЧ металлов в малых дозах стимулируют размножение отдельных групп бактерий, тогда как в высоких – оказывают бактерицидный и бактериостатический эффект, вызывая нарушения целостности клеточной мембраны и изменения в работе внутриклеточных систем. Поэтому применение нанометаллов в низких концентрациях для стимулирования роста и направленной модификации функциональной активности полезных микроорганизмов представляется перспективным.

Актинобактерии рода *Rhodococcus* обладают высокой устойчивостью неблагоприятным факторам внешней среды, а также действию различных ксенобиотиков, таких как нефтяные углеводороды, фенолы, растворители, пестициды и фармацевтические загрязнители. Эти свойства, наряду со способностью к биоаккумуляции солей металлов, определяют их использование в природоохранных биотехнологиях [8,9]. Изучение механизмов устойчивости родококков к воздействию НЧ металлов перспективно для возможной функционализации клеток и получения биокатализаторов с улучшенными свойствами.

Цель работы: изучить сравнительные эффекты наночастиц меди и оксида меди на дзета-потенциал актинобактерий рода *Rhodococcus*.

В работе использовали культуры *R.rhodochrous* ИЭГМ 1360, ИЭГМ 1362, ИЭГМ 1161, ИЭГМ 1162, ИЭГМ 757, *R.ruber* ИЭГМ 1217, ИЭГМ 1135, ИЭГМ 1352, ИЭГМ 1121, ИЭГМ 628, *R.jostii* ИЭГМ 68, ИЭГМ 60, ИЭГМ 458, ИЭГМ 550, ИЭГМ 508, *R.erythropolis*, ИЭГМ 344, ИЭГМ 661, ИЭГМ 766, ИЭГМ 693, ИЭГМ 706, *R.fascians* ИЭГМ 1218, ИЭГМ 534, ИЭГМ 531, ИЭГМ 525, ИЭГМ 173 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WDCM #768; <http://iegmcol.ru/>) и НЧ Cu, CuO в водном растворе, стабилизированном β -циклодекстрином (ООО «М9», Тольятти). НЧ использовали в десятикратных концентрациях (0,001 – 1,0 г/л), перед измерениями дважды промывали 10 мМ KNO₃ и диспергировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Великобритания).

Бактерии, выращенные на МПА, суспендировали в 10 мМ KNO₃ до значения оптической плотности (OD₆₀₀), равной 0,5. Размер НЧ и их электрокинетический потенциал, а также заряд бактериальных клеток измеряли методами динамического и электрофоретического рассеяния света с помощью анализатора ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания).

В результате исследования определены следующие размерные показатели НЧ: Cu – 148±39, CuO – 175±54 нм. Для НЧ CuO выявлена обратная корреляция между показателями

Candidatus sp., *Udaeobacter* sp., *Carnobacterium* sp., *Chryseolinea* sp., *Devosia* sp., *Dongia* sp., *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Hafnia* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Methylobacterium* sp., *Ochroactrum* sp., *Paenibacillus* sp., *Phycococcus* sp., *Reyranella* sp., *Serratia* sp. В составе бактерий было обнаружено несколько микроорганизмов, идентифицированных до вида: *Yersinia ruckeri*, *Phyllobacterium leguminum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Carnobacterium maltaromaticum*.

Также был проведен анализ микробных сообществ, населяющих перидий, периферию глебы и сердцевину глебы плодовых тел *T. macrosporum*. Так, уникальными родами бактерий для перидия являлись *Carnobacterium* sp., *Devosia* sp., *Dongia* sp., *Clostridium* sp. *Devosia* sp. *Enterobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Escherichia* sp., *Hafnia* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Serratia* sp., *Vagococcus* sp. Анализ периферии глебы плодового тела *T. macrosporum* выявил уникальные рода *Chitinophaga* sp., *Ochroactrum* sp., *Pelosinus* sp., *Pseudomonas* sp., *Paenibacillus* sp. характерные только для периферии глебы. Метагеномное секвенирование трюфельевого гриба *T. macrosporum* позволило обнаружить 4 рода бактерий *Candidatus* sp., *Chryseolinea* sp. *Methylobacterium* sp., *Phycococcus* sp. которые встречаются только в его сердцевине (табл.).

Таблица – Послойное распределение прокариотических микроорганизмов (OTU, %) населяющих плодовые тела *T. macrosporum*.

Род бактерий	Перидий	Периферия перидия	Серцевина глебы
<i>Allorhizobium</i> sp.	2,31±0	≤1	-
<i>Bosea</i> sp.	≤1	≤1	-
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	4,96±0	7,02±1,2	15,29±0
<i>Brochothrix</i> sp.	16,7±0	-	-
<i>Candidatus</i> sp.	-	-	≤1
<i>Carnobacterium</i> sp.	≤1	-	-
<i>Clostridium</i> sp.	16,7±0	-	-
<i>Chitinophaga</i> sp.	-	1,11±0	-
<i>Chryseolinea</i> sp.	-	-	≤1
<i>Devosia</i> sp.	≤1	-	-
<i>Dongia</i> sp.	≤1	-	-
<i>Ensifer</i> sp.	49,91±33,24	43,06±42,8	11,9±11,2
<i>Enterobacter</i> sp.	≤1	-	-
<i>Enterococcus</i> sp.	≤1	-	-
<i>Escherichia</i> sp.	≤1	-	-
<i>Hafnia</i> sp.	≤1	-	-
<i>Hyphomicrobium</i> sp.	≤1	-	-
<i>Mesorhizobium</i> sp.	≤1	7,69±0	-
<i>Methylobacterium</i> sp.	-	-	≤1
<i>Ochroactrum</i> sp.	-	≤1	-
<i>Paenibacillus</i> sp.	-	≤1	-
<i>Phycococcus</i> sp.	-	-	≤1
<i>Phyllobacterium</i> sp.	1,15 ± 0	17,99±5,07	80,7±0
<i>Pelosinus</i> sp.	-	69,27±0	-
<i>Pseudomonas</i> sp.	-	7,063±0	-
<i>Reyranella</i> sp.	≤1	≤1	≤1
<i>Serratia</i> sp.	≤1	-	-
<i>Vagococcus</i> sp.	33,33±0	-	-
<i>Yersinia</i> sp.	9,54 ± 7,12	2,35±0	42,30±0

Исходя из данных, полученных в ходе анализа послойного распределения микроорганизмов, населяющих плодовые тела *T. macrosporum*, можно наблюдать превалирование бактерий класса *Alphaproteobacteria* в центре плодового тела (рис.2).

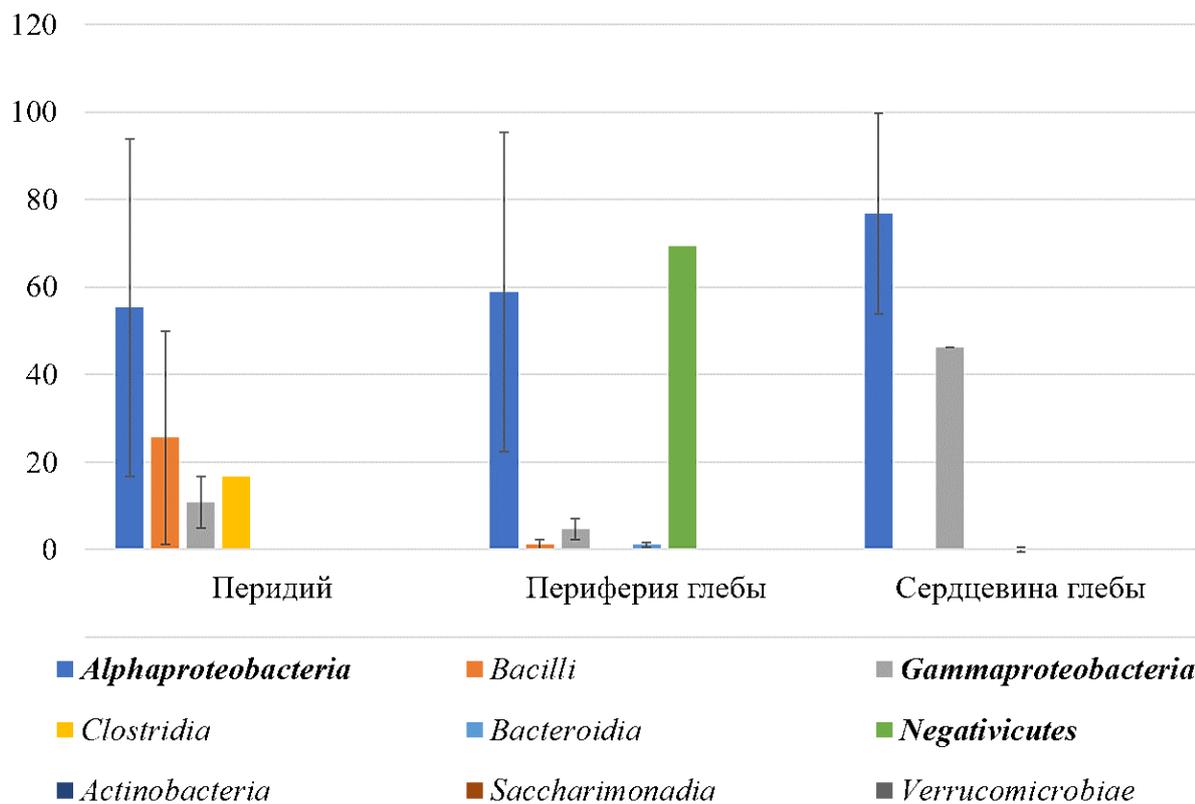


Рисунок 2 – Распределение классов бактерий по слоям внутри плодового тела *T. macrosporum*.

Этот факт подтверждает то, что бактерии проникают послойно в плодовое тело трюфельного гриба, т.е. чем ближе к центру, тем оно относительно стерильнее. Также, различия в микроокружении и симбионтном составе глебы и перидии может приводить к накоплению различных биологически активных метаболитов, как ингибирующих, так и усиливающих рост трюфельных грибов и их симбионтов.

Исследование проводится при основной финансовой поддержке Российского научного фонда, проект 22-76- 10036.

Библиографический список

1. Owaid M.N. Bioecology and uses of desert truffles (Pezizales) in the middle east // *Walailak journal of science and technology*. – 2018. – V. 15. №. 1. – P. 79–88.
2. Truffle volatiles: from chemical ecology to aroma biosynthesis / R. Splivallo [et al.] // *New Phytologist* – 2011. – V.89. – I. 3. -С. 688–699.
3. Truffles: From Islamic culture to chemistry, pharmacology, and food trends in recent times Author links open overlay panel / A.M. Knalifa [et al.] // *Trends in Food Science &Re Technology*. – 2019. – V. 91. – P. 193-218.

1. 4. Are bacteria responsible for aroma deterioration upon storage of the black truffle *Tuber aestivum*: A microbiome and volatilome study / M. Vahdatzadeh, A. Deveauc, R. Splivallo // *Food microbiology journal*. – 2019. – V. 84. – № 103251.
4. Volatile organic compounds in truffle (*Tuber magnatum* Pico): comparison of samples from different regions of Italy and from different seasons / F. Vita [et al.] // *Scientific Reports* – 2015. – V. 5. – № 12629.
5. Truffle ecology: genetic diversity, soil interactions and functioning / A. Mello, E. Zampieri, A. Zambonelli // *Mycorrhiza – Function, Diversity*. – 2017. – P. 231– 252.
6. Current status of truffle cultivation: recent results and future perspect / A. Zambonelli, Iotti M.; Hall I. // *Mycologia italiana* –2015. – P. 31-40.

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ К ВЫСОКОМУ ДАВЛЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ ШТАММА ACHROMOBACTER SPANIUS 10-50-TS2, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРОБ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД

Мальчевский В.А.^{1,2}, Субботин А.М.¹, Петров С. А.¹, Хрупа Д. А.¹

¹Тюменский Научный Центр СО РАН, Тюмень, Россия

²Тюменский государственный медицинский университет, Тюмень, Россия

Аннотация. Изучена устойчивость к высокому давлению *Achromobacter spanius* 10-50-TS2. Получены данные о том, что повышение давления до $7,90 \pm 0,01$ МПа характерного для глубины около 800 м замедляет начало роста колоний после повторного посева. Бактерии устойчивы к воздействию давлением $7,90 \pm 0,01$ МПа, что обуславливает возможность их существования на глубине до 800 м в толще ММП. Воздействие в течение 4 часов давлением $7,90 \pm 0,01$ МПа не влияет на их морфологические параметры и физиолого-биохимические свойства.

Ключевые слова: высокое давление, штамм микроорганизма, многолетние мёрзлые породы.

RESULTS OF ASSESSMENT OF RESISTANCE TO HIGH PRESSURE OF MICROORGANISMS OF ACHROMOBACTER SPANIUS 10-50-TS2 STRAIN, ISOLATED FROM SAMPLES OF PERMAFROST

Malchevsky V.A.^{1,2}, Subbotin A.M.¹, Petrov S. A.¹, Khrupa D. A.¹

¹FGBUN FRC Tyumen Scientific Center SB RAS, Tyumen, Russia

²Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia

Abstract. The resistance to high pressure of *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 was studied. Data have been obtained that an increase in pressure to 7.90 ± 0.01 MPa, characteristic for a depth of about 800 m, slows down the onset of colony growth after re-sowing. Bacteria are resistant to pressure of 7.90 ± 0.01 MPa, which makes it possible for them to exist at a depth of up to 800 m in the permafrost. Exposure for 4 hours to a pressure of 7.90 ± 0.01 MPa does not affect their morphological parameters and physiological and biochemical properties.

Keywords: high pressure, microorganism strain, permafrost.

В связи с изменениями климата и техногенезом в криолитозоне идёт процесс частичной деградации многолетнемёрзлых пород (ММП) [1], в результате которого на поверхности могут оказываются штаммы микроорганизмов, которые ранее длительное время существовали в экстремальных условиях низких температур и повышенного давления [6]. Одними из них являются изучаемый нами штамм *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 бактерий выделенный из проб ММП. В ходе проведённых исследований выявлено положительное воздействие микроорганизмов ММП на адаптационный потенциал у растительных и животных

макроорганизмов [2, 4, 5]. В то же время, оценка возможностей адаптации и её пределы у данных штаммов микроорганизмов к экстремальным условиям своего существования в ММП до настоящего момента не была проведена. Одним из мало изученных аспектов адаптации штаммов микроорганизмов из ММП к агрессивной внешней среде своего существования является возможный потенциал устойчивости к высокому давлению [3]. Зная его значения, можно обосновано утверждать о возможности существования данных штаммов микроорганизмов из ММП на большой глубине в толще пород или донных отложений. В связи с выше изложенным, актуальность оценки устойчивости микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 рода, выделенного из проб ММП, к высокому давлению не подлежит сомнению.

Цель исследования: оценить в эксперименте устойчивость к высокому давлению микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2.. выделенного из проб ММП.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали бактерии штамма 10-50-TS2 выделенного из ММП и идентифицированного методом сиквенса 16S RNA, как *Achromobacter spanius*. Первичный сравнительный анализ последовательностей РНК данных бактерий с последовательностями базы данных GenBank проведён с помощью программы Blast. Редактирование последовательностей проводили с помощью программы BioEdit.

Культивирование штаммов бактерий осуществлялось по описанной ниже методике. Штаммы бактерий высевали штрихом на скошенный питательный агар для культивирования микроорганизмов (ГРМ – агар г. Оболенск. ТУ 9398-020-78095326-2006), культивировали в аэробных условиях, в термостате 24 часа при $t +36^{\circ}\text{C}$, затем производили смыв микроорганизмов из каждой пробирки 5 мл физиологического раствора. Концентрацию микроорганизмов определяли методом предельных разведений по количеству КОЕ на агаризованной питательной среде в чашках Петри. После определения количества клеток бактерий в исходной суспензии плотность культур доводили до концентрации в 1×10^9 м.к./мл (микробных клеток в 1 мл физиологического раствора).

Для моделирования условий пребывания микроорганизмов из ММП на глубинах около 800 метров, использовали экспериментальный реактор высокого давления Non-Stirred Autoclaves 250 ml с рубашкой охлаждения, фирмы AMAR Equipments Pvt. Ltd. (Индия).

Согласно разработанному дизайну эксперимента пробы суспензий микроорганизмов мы разделили на четыре группы. Суспензии микроорганизмов I экспериментальной группы подвергались воздействию высоким давлением ($7,90 \pm 0,01$ МПа) в сочетании с понижением температуры до $+1^{\circ}\text{C}$, II – при средних значениях атмосферного давления ($0,101325 \pm 0,01$ МПа) и понижением температуры до $+1^{\circ}\text{C}$, III – воздействию высоким давлением ($7,90 \pm 0,01$ МПа) при температуре $+26^{\circ}\text{C}$, а IV – культивировались при средних значениях атмосферного давления ($0,101325 \pm 0,01$ МПа) и температуре $+26^{\circ}\text{C}$. Каждая экспериментальная группа суспензий микроорганизмов состояла из 30 проб.

Полученные пробы суспензий микроорганизмов I экспериментальной группы помещали в реактор и при температуре реактора $+26^{\circ}\text{C}$ производили повышение давления от средних значений атмосферного ($0,101325 \pm 0,01$ МПа) до $7,90 \pm 0,01$ МПа в течение 10 секунд. После 5 минут экспозиции, производили управляемое поступательно понижение температуры реактора со скоростью $0,15^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до $+1^{\circ}\text{C}$, с последующей экспозицией 4 часа при данной температуре. Пробы суспензий микроорганизмов II группы находились в реакторе при температуре $+26^{\circ}\text{C}$, давление не повышалось и оставалось весь эксперимент равным средним

значениям атмосферного ($0,101325 \pm 0,01$ МПа). После 5 минут экспозиции, производили управляемое поступательно понижение температуры реактора со скоростью $0,15^\circ\text{C}/\text{мин}$ до $+1^\circ\text{C}$, с последующей экспозицией 4 часа при данной температуре. Пробы суспензий микроорганизмов III группы помещали в реактор и при температуре реактора $+26^\circ\text{C}$ производили повышение давления от средних значений атмосферного ($0,101325 \pm 0,01$ МПа) до $7,90 \pm 0,01$ МПа в течение 10 секунд, с последующей экспозицией в течение 4 часов 5 минут при данных значениях температуры и давления. IV группа являлась контрольной, пробы суспензий микроорганизмов культивировали в реакторе в течение 4 часов 5 минут 10 секунд при давлении равном средним значениям атмосферного ($0,101325 \pm 0,01$ МПа) и постоянной температуре $+26^\circ\text{C}$. На протяжении всего эксперимента во всех группах осуществляли постоянное перемешивание содержимого реактора со скоростью 480 об/мин.

В дальнейшем суспензии извлекали из реактора и проводили повторное культивирование штаммов бактерий. Критериями для оценки в эксперименте устойчивости штаммов микроорганизмов, выделенных из проб ММП к высокому давлению, были сохранение жизнеспособность культуры, период видимого роста колоний микроорганизмов, изменение морфологии бактерий и их физиолого-биохимических свойств.

Сохранение жизнеспособности и период видимого роста колоний микроорганизмов оценивали по наличию роста бактерий на питательной среде, при этом учитывалось время с момента посева до проявления визуального роста колоний. Наблюдения за ростом культивируемых микроорганизмов осуществлялось до 120 часов. Морфологические параметры суточной культуры оценивали методом световой микроскопии при окраске по Грамму.

Статистический обсчет материала проводился согласно международным требованиям, предъявляемым к обработке результатов данных научных исследований, при помощи программы для персональных компьютеров «SPSS 11,5 for Windows» (среднее значение, дисперсия средних, параметрическое сравнение по критерию Стьюдента, частотный анализ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты, полученные в ходе проведения эксперимента по оценке устойчивости микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2, выделенного из проб ММП к высокому давлению приведены в таблице.

Таблица – Результаты повторного культивирования микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 ($M \pm m$)

Показатель	Экспериментальные группы			
	I (n = 30)	II (n = 30)	III (n = 30)	IV (n = 30)
Наличие начала роста колоний после повторного посева, в часах	$94,57 \pm 3,61$	$20,96 \pm 1,09^{12}$	$94,12 \pm 3,45$	$21,24 \pm 1,56^{12}$

Примечание. n – число проб; ¹ – достоверность различий при $p < 0,01$ с I группой; ² – достоверность различий при $p < 0,01$ с III группой.

Данные приведённые в таблице демонстрируют, что в I и в III экспериментальной группе, где повышалось давление, начало роста колоний микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 наблюдалось достоверно ($p < 0,01$) позже, чем во II и IV группах, где давление оставалось стабильным в течение всего эксперимента.

После повторного культивирования, при оценке морфологических параметров 120 часовой культуры штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 методом световой микроскопии

при окраске по Грамму (Г-) разницы в морфологии бактерий между пробами различных экспериментальных групп выявлено не было. Везде визуализировались идентичные полупрозрачные, мелкие, круглые, с ровным краем колонии.

Физиолого-биохимические особенности штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2, после повторного культивирования, во всех экспериментальных группах были аналогичные: каталаза +; оксидаза +; рост на желточно-солевом агаре – ; лецитиназа – ; рост на кровяном агаре + ; гемолиз – ; рост на мясопептонном бульоне + ; рост на мясопептонном агаре + ; анаэробный рост – ; рост на цитратной среде – ; глюкоза кислота-газ +; арабиноза кислота-газ +; ксилоза кислота-газ +; крахмал – ; казеин – ; восстановление нитратов – ; индол + .

После воздействия на бактерии штамма 10-50-TS2 повышенным давлением, изменения его чувствительности к антибиотикам не выявлено. В пробах всех экспериментальных групп отмечалась следующая чувствительность к антибиотикам: пенициллин – чувствительные; стрептомицин – устойчивые; эритромицин – устойчивые; линкомицин – устойчивые; налидиксовая кислота – чувствительные.

Диапазон температур, применяемых в эксперименте от +1°C до +26°C, характерный для сезонной динамики сезонно-талового слоя ММП, не оказывает влияния на начало роста колоний после повторного посева и как следствие, на результаты исследования по оценке воздействия повышенного давления на изучаемый штамм микроорганизмов. Данный факт указывает на то, что длительное существование микроорганизмов штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 в ММП выработало у них эффективные механизмы адаптации к смене температур и давления без изменений их морфологических параметров, и физиолого-биохимических свойств. Повышение давления до уровня $7,90 \pm 0,01$ МПа характерного для глубины около 800 метров замедляет начало роста колоний после повторного посева, но не влияет в дальнейшем на их морфологические параметры и физиолого-биохимические свойства, что указывает на возможность существования бактерий штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 в данных условиях.

Таким образом, основываясь на полученных в ходе эксперимента данных, авторы пришли к следующим выводам:

1. Микроорганизмы штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 устойчивы к воздействию давлением $7,90 \pm 0,01$ МПа, что обуславливает возможность их существования на глубине до 800 метров в толще ММП пород или донных отложений.
2. Воздействие в эксперименте в течение 4 часов давлением $7,90 \pm 0,01$ МПа на микроорганизмы штамма *Achromobacter spanius* 10-50-TS2 не влияет в дальнейшем на их морфологические параметры и физиолого-биохимические свойства.

Работа выполнена по госзаданию на 2021-2030 годы. Пространственно-временные явления и процессы, протекающие в водах суши Сибири в условиях современного техногенеза и изменения климата (Приоритетное направление 1.15.11. Программа 1.15.11.1).

Библиографический список

1. Гаврилов А.В. // Науки о Земле, 2016. – № 1. – С. 36-48.
2. Субботин А.М., Нарушко М.В., Боме Н.А., Петров С.А., Мальчевский В.А., Габдуллин М.А. // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2016. – Т. 20. – № 5. – С. 662 – 668. DOI 10.18699/VJ16.119

3. Карамова Н.С., Зеленихин П.В., Киселев В.Д., Липатникова А.А., Ильинская О.Н. // Экологическая генетика, 2015. – Т. XIII. – № 4. – С. 99 – 107.
4. Kalyonova L.F., Novikova M.A., Kostolomova E.G. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. – Vol. 158, № 3. – P. 364-367. DOI: 10.1007/s10517-015-2763-6
5. Kalenova L.F., Novikova M.A., Subbotin A.M. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2015. – Vol. 158, № 4. – P. 478-482. DOI: 10.1007/s10517-015-2789-9
6. Malchevskiy V.A., Subbotin A.M., Nemkov A.G., Petrov S.A. // Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 2016. – Vol. 161. – № 3. – P. 388 – 390. DOI 10.1007/s10517-016-3421-3

ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP

Мандрик М. И.¹, Дмитренко А. А.¹, Суржик Д. В.¹, Арепьева И. Ю.¹, Охремчук А. Э.²,
Валентович Л. Н.²

¹Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

²Институт микробиологии НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь

Аннотация. В ходе исследования установлено, что бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap являются продуцентами антимикробного соединения с узким спектром действия против фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium*. Биосинтез данного соединения определяется плазмидными генами, которые были приобретены путем горизонтального переноса, о чем свидетельствует их сходство с последовательностями бактерий рода *Streptomyces*, а также отличия по содержанию Г/Ц пар и кодонному составу.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, сидерофоры, антимикробная активность.

PECULIARITIES OF ANTIMICROBIAL METABOLITES SYNTHESIS BY BACTERIA *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* STRAIN 5AP

Mandryk M. I.¹, Dmitrenka A. A.¹, Surzhyk D. V.¹, Arepieva I. Yu.¹, Akhremchuk A. E.²,
Valentovich L. N.²

¹Belarusian State University, Minsk, Belarus

²Institute of Microbiology NAS of Belarus, Minsk, Belarus

Abstract. It was found that the bacteria *R. pyridinivorans* strain 5Ap produces an antimicrobial compound with a narrow spectrum of action against phytopathogenic bacteria of the genus *Pectobacterium*. The biosynthesis of this compound is determined by plasmid genes that were acquired by horizontal transfer, as evidenced by their similarity with the sequences of bacteria of the genus *Streptomyces*, as well as differences in the content of G/C pairs and codon composition.

Keywords: *Rhodococcus*, siderophores, antimicrobial activity.

Бактерии рода *Rhodococcus* широко известны как деструкторы органических соединений различной природы и в основном применяются в составе биопрепаратов для биоремедиации сред, загрязненных углеводородами. Однако, помимо углеводов, родококки способны разлагать токсины, в том числе микотоксины, продуцируемые фитопатогенными грибами [1-3]. Многие бактерии рода *Rhodococcus* являются активными продуцентами биосурфактантов – поверхностно-активных соединений, которые обуславливают в том числе антагонистическую активность, а также других антимикробных метаболитов [4]. В связи с

этим можно рассматривать бактерий данного рода не только как деструкторов опасных поллютантов, но и как перспективных агентов для защиты растений. Способность продуцировать биологически активные соединения так же, как и способность утилизировать различные труднорастворимые соединения, часто определяется мобильными генетическими элементами, в частности, плазмидами.

Цель – изучить продукцию антимикробного соединения бактериями – деструкторами нефтепродуктов *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap.

В исследовании были использованы бактерии – деструкторы углеводов нефти *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа и полученные на их основе мутанты *R. pyridinivorans* 5Ap Rif^R sid:pK18mob (инактивирован первый ген в опероне биосинтеза сидерофоров, расположенном на мега-плазмиде pSID, координаты 115 192-122 400 п.н., номер в ГенБанке CP063453.1).

Инактивацию гена биосинтеза сидерофоров осуществляли путем направленного мутагенеза [5]. Исследование антагонистической активности проводили методом капель [6] на полноценной среде ПДА (пептон – 10 г/л, дрожжевой экстракт – 5 г/л, NaCl – 8 г/л, агар – 7 или 15 г/л), а также минеральной среде М9 [7] с глюкозой (0,1%), сукцинатом (0,1%) или нафталином (пары) в качестве единственного источника углерода. В качестве тест-штамма использовали фитопатогенные бактерии *Pectobacterium*. Статистический анализ проводили с использованием пакета анализа Microsoft Excel 2010. Для биоинформационного анализа использовали интернет-ресурсы NCBI Blast [8], Codon Usage Calculator [9].

В ходе биоинформационного анализа нуклеотидной последовательности плазмиды pSID выявлено 5 генов, которые предположительно отвечают за синтез сидерофоров (*sid*). Данный локус по всей видимости был приобретен в результате горизонтального переноса, т. к. обладает рядом отличительных черт от нуклеотидных последовательностей бактерий *R. pyridinivorans*. Содержание Г/Ц пар в *sid*-локусе составляет в отдельных генах 55-63%, тогда как для бактерий вида *R. pyridinivorans* характерно 68%. Имеется ряд существенных отличий в кодонном составе, в частности по частоте встречаемости кодонов фенилаланила, лейцина, изолейцина, валина, пролина, треонина, аланина, тирозина, гистидина, глутамина, аспарагина, лизина, аспарагиновой кислоты и стоп-кодонов. К примеру, частота встречаемости кодона ТТТ фенилаланина в хромосоме 1%, а кодона ТТС – 99%. Частота встречаемости этих же кодонов в плазмиде разительно отличается: ТТТ – 28%, а ТТС – 72%. Другим примером являются кодоны тирозина, в хромосоме частота встречаемости кодона ТАТ – 12%, а кодона ТАС – 88%, в плазмиде же частота встречаемости кодона ТАТ – 43%, а кодона ТАС – 57%.

Сравнение нуклеотидных последовательностей *sid*-локуса и кодируемых ими аминокислотных последовательностей с известными выявляет их сходство с последовательностями бактерий рода *Streptomyces* (69-75%). В геномах родококков сходных последовательностей не обнаружено.

Функциональный анализ *sid*-локуса позволил установить, что он отвечает за биосинтез соединения с антимикробной активностью. При чем из шести исследуемых штаммов фитопатогенных бактерий рода *Pectobacterium* бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap дикого типа подавляли рост только одного. Инактивация генов биосинтеза сидерофоров приводила к снижению антимикробной активности при культивировании бактерий на среде ПДА и М9 с глюкозой (табл.). При культивировании на среде с сукцинатом и нафталином антимикробное соединение не продуцировали ни бактерии дикого типа, ни мутанты.

Таблица – Антагонистическая активность бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap

Штаммы-антагонисты	Зона задержки роста			
	ПДА	М9 + глюкоза	М9 + сукцинат	М9 + нафталин
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap (дикий тип)	1,2±0,3	3,73±0,8	–	–
<i>R. pyridinivorans</i> 5Ap sid::pK18mob	0,5±0,2*	1,6±0,2*	–	–

Примечания: «-» – зона задержки роста тест-культуры отсутствует; * – отличия от дикого типа достоверные ($p < 0,05$).

Таким образом, бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap являются продуцентами антимикробного соединения с узким спектром действия, за биосинтез которого отвечают гены, локализованные на плазмиде pSID, приобретенные путем горизонтального переноса от бактерий другого вида.

Библиографический список

1. Cheng Ji. Review on biological degradation of mycotoxins / Cheng Ji, Yu Fan, Lihong Zhao // *Animal Nutrition*. – 2016. – V. 2, № 3. – P. 127-133.
2. Mycotoxin-degradation profile of *Rhodococcus* strains / M. Cserhádi [et al.] // *International Journal of Food Microbiology*. – 2013. – V. 166, № 1. – P. 176-185.
3. New Zearalenone Biodegradation Strategy Using Non-Pathogenic *Rhodococcus pyridinivorans* K408 Strain / R. Kriszt [et al.] // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, №9. – e43608.
4. The Genus *Rhodococcus* as a source of novel bioactive substances: A review / Elsayed Y. [et al.] // *J. Pharmacogn. Phytochem*. – 2017. – V. 6, № 3. – С. 83-92.
5. Чернявская М. И. Характеристика штаммов нафталинутилизирующих бактерий рода *Rhodococcus* // *Труды БГУ. Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем*. – 2016. – Т. 11. – С. 190-197.
6. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер; пер. с англ.: Ю.Н. Зографа [и др.]; под ред. и с предисл. С.И. Алиханяна. – М.: Мир, 1976. – 436 с.
7. Иркитова А.Н., Каган Я.Р. Методы определения антагонистической активности молочнокислых бактерий // *Актуальные проблемы техники и технологии переработки молока*. – 2012. – №. 9. – С. 226-236.
8. Basic local alignment search tool / S. F. Altschul [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 1990. – V. 215, iss. 3. – P. 403-404.
9. Codon Usage Calculator [Electronic resource]/ *Biologics International Corp*, 2018. – Mode of access: <https://www.biologicscorp.com/tools/CodonUsageCalculator/> – Date of access: 04.04.2022.

***ESCHERICHIA COLI* В СПЕКТРЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР, ИЗОЛИРУЕМЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ КОРОВ**

Михайловская В.С.¹, Юдина К.А.², Жданова И.Н.¹, Масленникова И.Л.¹, Кузнецова М.В.^{1,2}

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия*

² *Пермский государственный медицинский университет имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия*

Аннотация. *Escherichia coli* – основной возбудитель «экологических» маститов дойных коров, в том числе с тяжелыми системными проявлениями инфекции. В исследованных пробах молока как здоровых, так и больных маститом коров, таксономическое представительство микроорганизмов было разнообразным. Наиболее распространенными в обеих группах были бактерии *Staphylococcus* spp. и *Escherichia coli*, причем эшерихии достоверно чаще встречались в молоке больных животных и характеризовались высокой чувствительностью к антибиотикам, отсутствием бактериоциногении, низкой распространенностью основных детерминант патогенности.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, мастит, молоко, *Escherichia coli*.

***ESCHERICHIA COLI* IN THE SPECTRUM OF MICROBIAL CULTURES ISOLATED FROM HEALTHY COWS AND COWS WITH MASTITIS**

Mihailovskaya V.S.¹, Yudina K.A.², Zhdanova I.N.¹, Maslennikova I.L.¹, Kuznetsova M.V.^{1,2}

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

² *Perm State Medical University named after Academician E.A. Wagner of the Ministry of Health of Russia, Perm, Russia*

Abstract. *Escherichia coli* is the main causative agent of «ecological» mastitis of dairy cows, including mastitis with severe systemic manifestations of infection. In the studied milk samples of both healthy cows and cows with mastitis, the taxonomic representation of microorganisms was diverse. The most common bacteria in both groups were *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli*. *E. coli* strains were significantly more common in the milk of sick animals and were characterized by high sensitivity to antibiotics, absence of bacteriocinogeny, low prevalence of the main virulence-associated genes.

Keywords: cow, mastitis, milk, *Escherichia coli*.

Мастит крупного рогатого скота – это комплексное заболевание, которое развивается вследствие попадания бактерий в сосковый канал и сопровождается сильной воспалительной реакцией [1]. Маститы коров наносят значительный экономический ущерб сельскохозяйственным предприятиям вследствие снижения молочной продуктивности животных. Кроме того, потребление молока, содержащего микроорганизмы или их токсины, может привести к пищевым отравлениям, что имеет серьезный медицинский аспект.

Формы заболевания могут быть различными, поскольку мастит вызывают более чем 140 видов бактерий. Согласно некоторым авторам, в зависимости от пути инфицирования маститы разделяют на «контагиозные» и «экологические» [2]. Возбудители «контагиозных» маститов, например, *Staphylococcus aureus*, передаются животным во время доения через руки работников или доильные аппараты. Возбудители «экологических» маститов, среди которых основными являются условно-патогенные *E. coli*, попадают в сосковый канал из окружающей среды, вызывая гнойно-септические процессы. Встречаемость условно-патогенных возбудителей маститов сильно различается в разных странах, а также конкретных регионах одной страны, и связана, в первую очередь, с условиями содержания и санитарно-гигиеническими мероприятиями на сельскохозяйственных предприятиях. При любом типе инфицирования животного успешное лечение мастита зависит от раннего выявления и корректной идентификации возбудителя [3]. В связи с этим, учет профилей и биологических особенностей циркулирующих микроорганизмов на отдельных фермах является важной частью микробиологического мониторинга и контроля продукции.

Данное исследование проводилось с целью анализа видового спектра возбудителей мастита коров, сравнения бактериальной обсемененности молока больных и здоровых животных, а также характеристики биологических свойств штаммов *E. coli*.

Материалы и методы. *Характеристика материала, методика выделения и идентификация.* Образцы молока были собраны в апреле-июле 2021 г. на сельскохозяйственном предприятии, специализирующемся на разведении молочного крупного рогатого скота и производстве сырого молока (Пермский край). Пробы, полученные от больных маститом (n=25) и здоровых (n=20) коров, исследовали согласно «Методическим указаниям по бактериологическому исследованию молока и секрета вымени сельскохозяйственных животных» (Минск, 2008). Сразу после доставки материала в лабораторию проводили посев на мясопептонный агар с 5% цитратной кровью и дифференциально-диагностические среды (желточно-солевой агар, агар Мак-Конки, Цетримидный агар, агар Сабуро). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в аэробных условиях в течение 24 часов. Идентификацию бактерий осуществляли с помощью культурального метода, а также диагностических систем “ENTEROtest 16“, “STAPHYtest 16“ и “NEFERMtest 24“ (Erba Lachema s.r.o., Чехия). Изоляты *E. coli*, выделенные из молока больных маститом коров, были проверены на генетическое разнообразие с помощью гер-ПЦР с праймерами ERIC1/2 [4].

Микробиологическую оценку проводили согласно индексу встречаемости различных таксонов, который рассчитывали по формуле: $C = p \cdot 100 / P$, где C – индекс встречаемости; p – число проб, в которых обнаружены микроорганизмы исследуемого вида; P – общее число проанализированных проб. В зависимости от полученных значений все таксоны были подразделены на доминантные или постоянные ($C > 50\%$), редкие или добавочные ($25\% < C < 50\%$) и эпизодически встречающиеся или случайные ($C < 25\%$).

Определение чувствительности к антибиотикам. Штаммы *E. coli* были проверены диско-диффузионным методом с использованием агара Мюллера-Хинтон (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Россия) и дисков (НИЦФ, Санкт-Петербург) на чувствительность к 15 антибиотикам: ампициллину (10 мкг), цефоперазону (75 мкг), цефтриаксону (30 мкг), цефепиму (30 мкг), цефепиму с сульбактамом, меропенему (10 мкг), имипенему (10 мкг), азтреонаму (30 мкг), амикацину (30 мкг), гентамицину (10 мкг), ципрофлоксацину (5 мкг), левофлоксацину (5 мкг), норфлоксацину (10 мкг), тетрациклину (30 мкг), хлорамфениколу (30 мкг). Результаты интерпретировали в соответствии с клиническими рекомендациям “Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам“ (МАКМАХ, Версия-2018-03).

Гемолитическую активность штаммов *E. coli* оценивали путем посева штрихом на 5% кровяной агар (“Биомед“, филиал ФГУП “Микроген“, Россия). О наличие гемолитической активности судили по просветлению среды вокруг штриха.

Оценку продукции бактериоцинов штаммами *E. coli* проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу отсроченного антагонизма [5]. В качестве тест-штамма использовали *E. coli* DH5 α . О способности продуцировать бактериоцины судили по появлению зон лизиса тест-штамма.

Детекция генов патогенности. Штаммы *E. coli* были проанализированы методом ПЦР по конечной точке на присутствие 15 генов патогенности, кодирующих адгезины (*afa/draBC*, *fimH*, *papC*), токсины (*hlyA*, *hlyF*, *eltA*, *estI*, *estII*, *stx1*, *stx2*, *subAB*, *cnfI*), факторы устойчивости к системам защиты макроорганизма (*iss*, *ompT*, *kpsMTII*). Использовали праймеры и условия амплификации по рекомендациям авторов [6, 7]. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси (реагенты производства ООО «Синтол», Россия) на термоциклере DNA Engine Dyad Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-DocXR (Bio-Rad, США).

Статистические методы. Сравнение качественных характеристик проводили с использованием точного критерия Фишера (разницу считали достоверной при $p < 0,05$), рассчитывали отношение шансов (OR). Для обработки данных использовали компьютерные программы Microsoft Office XP Excel и STATISTICA 10.0.

Результаты и обсуждение. Микробные профили проб молока. Показатель бактериальной обсемененности исследованных проб составил 100%. Всего было выделено 86 культур: 36 культур из молока здоровых и 50 – из молока больных маститом коров. В результате исследования детектировали микроорганизмы, преимущественно принадлежащие к родам *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Citrobacter*, *Proteus* (таблица).

Таблица – Микробные профили молока здоровых и больных маститом коров

Микроорганизм	Индекс встречаемости, %		Статистика	
	здоровые	больные	F-test	отношение шансов (OR)
<i>Escherichia coli</i>	40	80	0.01	6.00
<i>Citrobacter</i> spp.	10	4	0.58	0.38
<i>Proteus</i> spp.	5	4	1.00	0.79
<i>Serratia</i> spp.	0	4	-	-
<i>Burkholderia</i> spp.	0	8	-	-
<i>Staphylococcus</i> spp.	70	68	1.00	0.91
<i>Enterococcus</i> spp.	50	16	0.02	0.19
<i>Streptococcus</i> spp.	0	8	-	-

В пробах молока как здоровых, так и больных маститом коров, наиболее распространенными были представители *E. coli* и *Staphylococcus* spp., что согласуется с работами других авторов [8]. Бактерии таксономических групп *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Streptococcus* принадлежали к группе эпизодически встречающихся (случайных).

В пробах молока здоровых коров наиболее распространенными оказались микроорганизмы рода *Staphylococcus*, обнаруженные в 70% образцов, при этом все выделенные из молока здоровых коров стафилококки относились к группе коагулазонегативных. Бактерии *E. coli* и *Enterococcus* spp. встречались в 40% и 50% случаев соответственно, в двух образцах был выделен *Citrobacter freundii*, в одном – *Proteus mirabilis*. Наиболее часто детектировали ассоциации микроорганизмов *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp. В пробах, полученных от больных маститом коров, доминировали представители *E. coli* (80%) и *Staphylococcus* spp. (68%), бактерии *Enterococcus* выявлены в 16% проб, в двух пробах обнаружены микроорганизмы *Streptococcus* spp. и *Burkholderia ceracia* complex, в единичных случаях выделены *Serratia marcescens* и *Proteus mirabilis*. Большинство выделенных стафилококков относились к коагулазонегативным, и только в одной пробе был обнаружен *S. aureus*. Важно отметить, что эшерихии чаще встречались в молоке больных коров (*F*-test: $p=0,01$), энтерококки – в пробах от здоровых животных (*F*-test: $p=0,02$), тогда как стафилококки были доминантными в обеих группах. Частота выявления монокультур и микробных ассоциаций в анализируемых группах существенно не различалась. В 80% проб микроорганизмы регистрировали в составе ассоциаций, количественный и качественный состав которых был неодинаков в исследованных выборках. Ассоциации из трех микроорганизмов чаще встречались в группе больных животных (28% vs 5%), тогда как ассоциации из двух культур, напротив, среди здоровых коров (44% vs 60%) соответственно. Следует отметить, что в пробах молока здоровых животных стафилококки встречались в 3,1 раз чаще в виде монокультур, а в образцах от больных животных – в 1,9 раз чаще совместно с эшерихиями.

Характеристика штаммов E. coli, выделенных из молока коров с маститом. Штаммы *E. coli* были чувствительны ко всем антибиотикам за исключением ампициллина – к нему были устойчивы два штамма и два имели промежуточный уровень устойчивости. Один штамм *E. coli* был гемолитически активным. Продукция бактериоцинов штаммами не выявлена, гены *papC*, *hlyF*, *eltA*, *estI*, *estIII*, *stx1*, *subAB*, *cnf1* и *ompT* не детектированы. У двух культур амплифицирован ген фимбриального адгезина *fimH*, в единичных случаях детектированы детерминанты *hlyA*, *stx2*, *kpsMTII* и *iss*.

Согласно результатам метаанализа, проведенного Krishnamoorthy et al. (2021), в молоке коров с маститом часто присутствовали бактерии следующих видов: *S. aureus*, коагулазонегативные виды *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus uberis* [9]. Современные стратегии профилактики и лечения маститов сельскохозяйственных животных ограничили распространение грамположительных бактерий во всем мире, тем не менее, *S. aureus* все еще считается основным возбудителем «контагиозных» маститов (преимущественно субклинических форм) в некоторых странах, например, в Швеции [10]. Представители колиформных бактерий, такие как *E. coli*, являются одними из наиболее распространенных этиопатогенов, вызывающих «экологический» мастит [1, 11]. Кроме них при данной форме мастита могут встречаться некоторые виды родов *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus* и *Serratia* [2]. Следует отметить, что в настоящее время не выявлено маркеров, которые отличали бы вызывающие маститы *E. coli* от других условно-

патогенных штаммов эшерихий, что затрудняет обнаружение потенциальных возбудителей, в связи с чем, ранняя диагностика является проблемой в молочном животноводстве и ветеринарной практике [2]. Многие авторы отмечают, что тяжесть мастита, вызванного *E. coli*, в основном обусловлена состоянием резистентности животного – это в свою очередь определяет исход заболевания [11]. Важно подчеркнуть, что источником возбудителей «экологического» мастита являются, не только сами животные, но и объекты внутрихозяйственной среды – контаминированные бактериями поверхности, подстилка и почва.

Выводы. Таксономическое представительство микроорганизмов в пробах молока здоровых и больных маститом коров было разнообразным. Наиболее распространенными, как в монокультуре, так и в составе ассоциаций, в обеих группах были бактерии *Staphylococcus* spp. и *E. coli*. Эшерихии достоверно чаще встречались в молоке больных животных и характеризовались высокой чувствительностью к антибиотикам, отсутствием бактериоциногении, единичным присутствием детерминант патогенности *hlyA*, *stx2*, *kpsMIII* и *iss*. Полученные данные свидетельствуют о распространенности «экологических» маститов крупного рогатого скота, что с учетом основных путей инфицирования, указывает на необходимость усовершенствования санитарно-профилактических мер на предприятии.

Работа выполнена при поддержке правительства Пермского края по гранту №С-26/541 и государственному заданию НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Nagasawa Y., Kiku Y., Sugawara K., Yabusaki T., Oono K., Fujii K., Suzuki T., Maehana K., Hayashi T. The bacterial load in milk is associated with clinical severity in cases of bovine coliform mastitis // J Vet Med Sci.–2019.–V. 81(1).–P.107-112.
2. Pamela L., Ruegg A. 100-Year Review: Mastitis detection, management, and prevention // Journal of Dairy Science.–2017.–V. 100(12).–P.10381-10397.
3. Erskine R.J., Wagner S., DeGraves F.J. Mastitis therapy and pharmacology // Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.–2003.–V.19.–P.109-138.
4. Versalovic J., Koeth T., Lupski J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes // Nucleic Acids Res.–1991.–V.19.–P.6823-6831.
5. Budič M., Rijavec M., Petkovšek Z., Žgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia // PLoS One.–2011.–V.6.–e28769.
6. Chapman T.A., Wu X.-Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J.-C. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine // Appl. Environ. Microbiol.–2006.–V.72.–P.4782-4795.
7. Moulin-Schouleur M., Répérant M., Laurent S., Brée A., Mignon-Grasteau S., Germon P., Rasschaert D., Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns // J. Clin. Microbiol.–2007.–V.45.–P.3366–3376.
8. Al-harbi H., Ranjbar S., Moore R.J., Alawneh J.I. Bacteria Isolated From Milk of Dairy Cows With and Without Clinical Mastitis in Different Regions of Australia and Their AMR Profiles // Frontiers in Veterinary Science.–2021.–V.8.

9. Krishnamoorthy P., Suresh K.P., Jayamma K.S., Shome B.R., Patil S.S., Amachawadi R.G. An Understanding of the Global Status of Major Bacterial Pathogens of Milk Concerning Bovine Mastitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (Scientometrics) // Pathogens.–2021.– V.10(5).–P.545.
10. Unnerstad H.E., Lindberg A., Waller K.P., Ekman T., Artursson K., Nilsson-Öst M., Bengtsson B. Microbial aetiology of acute clinical mastitis and agent-specific risk factors // Veterinary Microbiology.–2009.–V.137(1–2).–P.90-97.
11. Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors Christian Burvenich // Vet. Res.– 2003.– V.34(5).–P.521-564.

ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК РОДОКОККАМИ

Нуриева Д.С.¹, Криворучко А.В.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. На примере штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 показано, что углеводороды влияют на интенсивность образования биопленок родококками. Установлено, что в присутствии *n*-гексана или дизельного топлива родококки образуют в 2–8 раз более плотные биопленки, которые, по-видимому, выполняют защитную функцию. Показано, что в присутствии углеводородов биопленки родококков характеризуются повышенным содержанием экзополисахаридов. Выделенные из клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 экзополисахариды обладают высокой (11,6–16,5 нН) силой адгезии к твердым поверхностям.

Ключевые слова: углеводородоокисляющие родококки, адаптация, биопленки, экзополисахариды

HYDROCARBON EFFECT ON BIOFILM FORMATION BY RHODOCOCCUS

Nurieva D.S.¹, Krivoruchko A.V.^{1,2}

¹ Perm State University, Perm, Russia

² Perm Federal Research Center UB RAS, Perm, Russia

Abstract. By the example of the strain *Rhodococcus ruber* IEGM 231 is shown that hydrocarbons affect the intensity of biofilm formation by *Rhodococcus*. In the presence of *n*-hexane or diesel fuel, *Rhodococcus* have been found to form 2-8 times denser biofilms, which appear to have a protective function. It is shown that in the presence of hydrocarbons, the biofilms of *Rhodococcus* are characterized by an increased content of exopolysaccharides. The exopolysaccharides isolated from *R. ruber* IEGM 231 cells have high adhesion (11.6-16.5 nN) to hard surfaces.

Keywords: hydrocarbon-oxidizing *Rhodococcus*, adaptation, biofilms, exopolysaccharides.

Углеводородоокисляющие актинобактерии рода *Rhodococcus* играют ключевую роль в восстановлении нефтезагрязненных экосистем. Они способны к окислению широкого спектра углеводородных субстратов, включая линейные и разветвленные алканы C₂–C₃₁, бензол и его гомологи, полициклические ароматические углеводороды, галогензамещенные и гетероциклические производные углеводородов, а также устойчивы к действию неблагоприятных факторов внешней среды, таких как высокая и низкая температура, соленость, pH, низкая влажность, недостаток питательных веществ [1,2]. Присутствие углеводородов в экосистеме приводит к дополнительным стрессовым воздействиям на клетки, что обусловлено накоплением токсичных соединений, снижением доступности питательных

субстратов, нарушением воздухо- и влагообмена, индукцией окислительного стресса [2]. Одним из универсальных механизмов защиты бактерий от действия химических агентов и экстремальных значений физико-химических факторов среды является образование биопленок [3,4]. Биопленки *Rhodococcus* spp. и их роль в адаптации данной группы микроорганизмов к условиям загрязненных биотопов изучены недостаточно.

Цель настоящей работы – исследование влияния углеводов на образование биопленок родококками и оценка возможной роли этого процесса в адаптации родококков к условиям загрязненных биотопов.

В работе использовали штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ, WDCM #768, ЦКП 480868, УНУ 73559, <http://www.iegmcoll.ru>). Бактерии выращивали в мясопептонном бульоне (МПБ) производства “Биотехновация” (Электрогорск) при 160 об/мин, температуре 28°C в течение 28 ч. Клетки отмывали от питательной среды и ресуспендировали в 0,5% NaCl в концентрации $1 \cdot 10^8$ колониеобразующих единиц (КОЕ)/мл. Для получения биопленок использовали покровные стекла (Menzel-Glaser, Германия), слайд-камеры μ -Slide с полимерным дном (Ibidi, Германия) и нитроцеллюлозные мембранные фильтры (Millipore, Германия) диаметром 25 мм и размером пор 0,22 мкм. При этом применяли необработанные или покрытые полилизинном (Sigma-Aldrich) покровные стекла. Суспензию родококков в МПБ в концентрации $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл вносили в пробирки и слайд-камеры, в пробирки помещали также стерильные покровные стекла. Мембранные фильтры располагали на поверхности чашек Петри с мясопептонным агаром (МПА) или агаризованной минеральной средой “К” [5]. На фильтры наносили 200 мкл бактериальной суспензии с концентрацией клеток $1 \cdot 10^6$ КОЕ/мл. Для культивирования бактериальных клеток в парах углеводов стерильные бумажные фильтры, пропитанные 200 мкл *n*-гексана (хч, Криохром, Санкт-Петербург), *n*-гексадекана (хч, Экос-1, Москва) или дизельного топлива (“ЭКТО” зимнее, ЛУКОЙЛ), помещали под крышки чашек Петри. В отдельных экспериментах дизельное топливо в концентрации 1 об. % вносили непосредственно в агаризованную среду. Бактерии инкубировали при 50 об/мин или стационарно при температуре 28°C в течение 6 сут. Количество клеток в биопленках определяли спектрофотометрически (при длине волны 590 нм) после окрашивания биопленок 1% водным раствором кристаллического фиолетового (хч, Реахим, Пермь) в соответствии с ранее описанной методикой [6] по калибровочным графикам между $A_{590 \text{ нм}}$ и концентрацией клеток (КОЕ/мл). Для определения экзополисахаридов (ЭПС) биопленки окрашивали флуорохромным красителем Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, Германия). Визуализацию окрашенных микропрепаратов проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Imager 2 (Carl Zeiss, Германия). ЭПС выделяли из родококков согласно методике [7]. С помощью атомно-силового микроскопа MFP-3D-BIO™ (Asylum Research, США) определяли силу адгезии зонда кантилевера к ЭПС. При этом ЭПС наносили в виде капли концентрированного раствора в воде на поверхность покровного стекла, затем высушивали на воздухе. ЭПС также наносили непосредственно на кантилевер для оценки силы адгезии ЭПС к покровным стеклам. Сканирование проводили в контактном режиме с использованием кантилеверов OMCL-AC240TS-R3 (Olympus, Япония) со следующими характеристиками: материал – кремний, коэффициент жесткости 2 Н/м, резонансная частота 70 кГц. При сканировании получали силовые карты размером 3×3 мкм, при этом число силовых кривых для каждого образца составляло 1024. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности.

В результате проведенных экспериментов получены биопленки *R. ruber* ИЭГМ 231 разной степени плотности. На поверхности нитроцеллюлозных фильтров наблюдали образование умеренных и плотных ($0,9 \cdot 10^9$ – $6,8 \cdot 10^9$ КОЕ/см²) биопленок (таблица 1), тогда как на поверхности покровных стекол и полимерных слайд-камер отмечено слабое ($<0,9 \cdot 10^9$ КОЕ/см²) биопленкообразование (данные не представлены). Слабый рост биопленок родококков на твердых поверхностях в МПБ был обнаружен нами в ранее проведенных исследованиях и, по-видимому, связан с низкой адгезивной активностью клеток и влиянием на процесс формирования биопленок растущих планктонных клеток [8]. Как видно из таблицы 1, такие факторы, как среда культивирования и присутствие углеводов существенно влияют на интенсивность образования биопленок клетками *R. ruber* ИЭГМ 231. Наиболее плотные ($5,6 \cdot 10^9$ – $11,2 \cdot 10^9$ КОЕ/см²) биопленки образуются при культивировании родококков на богатой питательной среде МПА, тогда как плотность биопленок при использовании агаризованной минеральной среды “К” ниже и составляет $0,9 \cdot 10^9$ – $7,0 \cdot 10^9$ КОЕ/см². По нашим данным, биопленки защищают родококки от токсического действия углеводов. На МПА формируются плотные эффективные биопленки, и углеводороды практически не влияют на рост биопленок на этой среде. Лишь внесение дизельного топлива в МПА в концентрации 1 об. % приводит к образованию в 2 раза более плотных биопленок по сравнению с контролем (МПА без углеводов). При культивировании родококков на агаризованной минеральной среде “К” влияние углеводов на рост биопленок заметно выражено. Обнаружено, что в присутствии паров *n*-гексана и дизельного топлива на среде “К” образуются в 3–8 раз более плотные биопленки *R. ruber* ИЭГМ 231 по сравнению с таковыми в контроле (среда “К” без углеводов). Известно, что *n*-гексан и дизельное топливо являются токсичными веществами, действующими на клетки как растворители [9,10]. Внесение дизельного топлива в агаризованную среду “К” в концентрации 1 об. %, на которой родококки не способны образовывать плотные защитные биопленки, по-видимому, становится критическим и приводит к ингибированию роста клеток и отсутствию биопленкообразования. В присутствии нетоксичного углеводорода *n*-гексадекана плотность биопленок не отличается от таковой в контроле (среда без углеводов) независимо от среды культивирования (таблица).

Таблица – Интенсивность биопленкообразования клетками *R. ruber* ИЭГМ 231 в присутствии различных углеводов ($\times 10^9$ КОЕ/см²)

Углеводородный субстрат \ Питательная среда	МПА	Агаризованная минеральная среда “К”
<i>n</i> -Гексан	$5,8 \pm 0,5$	$2,5 \pm 0,3^*$
<i>n</i> -Гексадекан	$5,6 \pm 1,0$	$1,4 \pm 0,1$
Дизельное топливо	$7,4 \pm 0,8$	$7,0 \pm 1,0^*$
Дизельное топливо ¹	$11,2 \pm 2,8^*$	Н.д. ²
Контроль (без углеводов)	$6,8 \pm 1,0$	$0,9 \pm 0,1$

Примечание. В таблице представлены средние значения \pm стандартные отклонения. Интенсивность биопленкообразования оценивали в экспериментах по получению биопленок родококков на нитроцеллюлозных фильтрах в парах углеводов. ¹Дизельное топливо вносили непосредственно в среду. ²Н.д. – ниже детектируемого уровня. *Статистически достоверно ($p < 0,05$) от контроля (среда культивирования без углеводов).

С помощью флуорохромного красителя Calcofluor White Stain выявлены различия в содержании ЭПС в составе биопленок. Как видно из рисунка 1, биопленки *R. ruber* ИЭГМ 231,

полученные в присутствии углеводов, характеризуются более ярким свечением и содержат больше внеклеточного полисахаридного матрикса. Известно, что ЭПС являются главным структурообразующим компонентом микробных биопленок и играют ключевую роль в защите клеток от токсичных химических агентов [3,4].

Из клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 выделены ЭПС и определена их сила адгезии. Установлено, что выделенные ЭПС характеризуются высокой адгезивной способностью. Силы адгезии кремниевого зонда АСМ к ЭПС, нанесенным на поверхность покровного стекла, и зонда АСМ, модифицированного ЭПС, к необработанному стеклу составляют $11,6 \pm 5,0$ и $16,5 \pm 6,8$ нН соответственно (рисунок 2). Согласно данным литературы, эти значения в 16–22, 23–33 и 290–413 раз превышают таковые при адгезии полимерных частиц к миколовым кислотам, гликолипидных *Rhodococcus*-биосурфактантов к полистиролу и ряда микробных полисахаридов к синтетическим полимерам соответственно [8], что позволяет рассматривать ЭПС как возможный адгезин родококков.

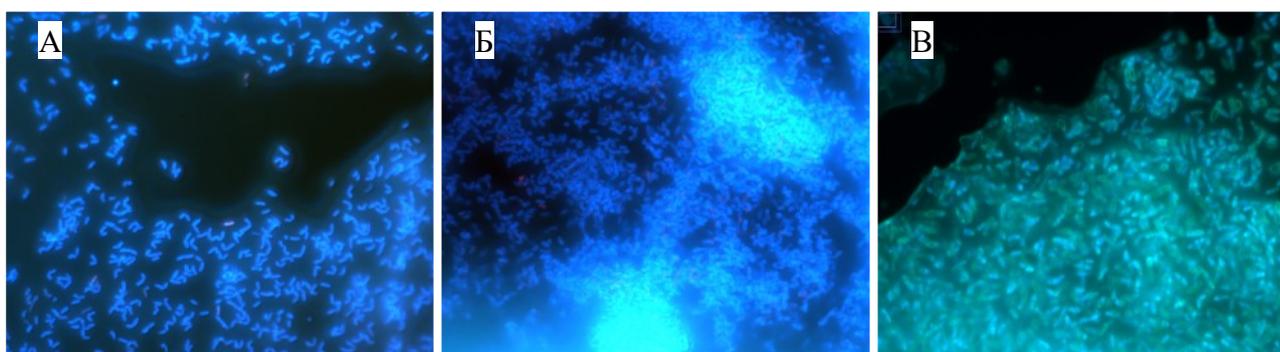


Рисунок 1 – Биопленки *R. ruber* ИЭГМ 231 на нитроцеллюлозных фильтрах, окрашенные специфичным в отношении ЭПС красителем Calcofluor White Stain. Среды культивирования: А – МПА; Б – МПА в парах н-гексадекана; В – минеральная агаризованная среда “К” в парах н-гексана.

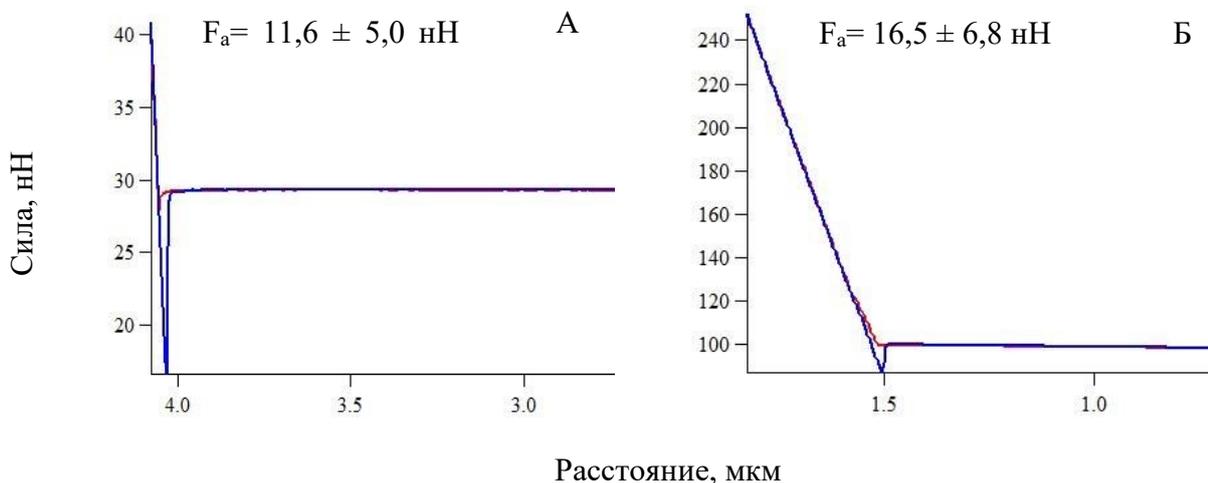


Рисунок 2 – Силовые кривые кантилевера АСМ, характеризующие силу адгезии ЭПС из клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 к абиотическим поверхностям. А – силовая кривая немодифицированного кантилевера к покровному стеклу с ЭПС; Б – силовая кривая модифицированного ЭПС кантилевера к необработанному покровному стеклу. Траектория движения кантилевера: красная линия – кривая подвода, синяя линия – кривая отвода. Для каждого варианта опыта представлены силовые кривые для средних значений силы адгезии.

Полученные результаты исследований свидетельствуют о важной роли биопленок в адаптации актинобактерий рода *Rhodococcus* к присутствию в среде углеводов и могут

быть использованы в дальнейшем при получении эффективных биокатализаторов для биоремедиации нефтезагрязненных сред.

Работа выполнена в рамках госзаданий 122010800029-1, 122031400671-1 и АААА-А20-120081990069-3, а также по гранту МИГ в рамках региональной конкурсной программы Министерства образования Пермского края (Соглашение № С-26/827).

Библиографический список

1. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углекислородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Монография-атлас / Под ред. И.Б. Ившиной. – УрО РАН. – 2021. – 140 с.
2. Pátek M., Grulich M., Nešvera J. Stress response in *Rhodococcus* strains // *Biotechnol. Adv.* – 2021. – V. 53. – 107698.
3. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка – “город микробов” или аналог многоклеточного организма? // *Микробиология.* – 2007. – Т. 76, №2. – С. 149–163.
4. Серегина Н.В., Честнова Т.В., Жеребцова В.А., Хромушин В.А. Обзор биофизических особенностей микробной адгезии // *Вестник новых медицинских технологий.* – 2008. – Т. XV, №. 4. – С. 175–177.
5. Regional specialised collection of alkanotrophic microorganisms [Электронный ресурс] URL: <http://iegmc.ru/medium/med08.html> (дата обращения: 26.09.22).
6. Huber B., Kathrin R., Morten H., Arne H., Astrid G., Michael G., Søren M., Leo E. The csp quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility // *Microbiology.* – 2001. – V. 147, No. 9. – P. 2517–2528.
7. Khan S. T., Ahamed M., Alhadlaq H. A., Musarrat J., Al-Khedhairi A. Comparative effectiveness of NiCl₂, Ni- and NiO-NPs in controlling oral bacterial growth and biofilm formation on oral surfaces // *Archives of Oral Biology.* – 2013. – V. 58, No. 12. – P. 1804–1811.
8. Криворучко А.В. Биофизические и молекулярные механизмы адгезии углекислородокисляющих родококков: дисс. ...докт. биол. наук. – 2021. – 223 с.
9. Иванова А.Е., Канатьева А.Ю., Курганов А.А. Аэробная биодеградация жидких моторных топлив в условиях экстремальной кислотности // *Микробиология.* – 2019. – Т. 88, № 3. – С. 318–327.
10. Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Korshunova I.O., Rubtsova E.V. Assessment of bacterial resistance to organic solvents using a combined confocal laser scanning and atomic force microscopy (CLSM/AFM) // *Journal of Microbiological Methods.* – 2014. – V. 107. – P. 23–29.

ПОГЛОЩЕНИЕ СВИНЦА И МЕДИ БАКТЕРИЯМИ *BACILLUS SUBTILIS*

Переломов Л.В.¹, Сизова О.И.², Мухторов Л.Г.¹, Сиголаева Т.В.¹, Третьякова А.В.¹,
Атрощенко Ю.М.¹

¹Тулский государственный педагогический университет им. Л. Н. Толстого,
Тула, Россия

²Пуцинский научный центр биологических исследований, Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина РАН, Пуцино, Россия

Аннотация. На примере катионов свинца и меди показано, что живые клетки бактерий являются эффективными сорбентами тяжелых металлов, что может быть использовано для очистки загрязненных сточных вод. Кислотность среды и концентрация тяжелых металлов в растворе являются ведущими факторами, определяющими биосорбцию металлов.

Ключевые слова: тяжелые металлы, бактерии, биосорбция, кислотность.

ADSORPTION OF LEAD AND COPPER BY *BACILLUS SUBTILIS* BACTERIA

Perelomov L.V.¹, Sizova O.I.², Mukhtorov L.G.¹, Sigolaeva T.V.¹, Tretyakova A.V.¹,
Atroshchenko Yu.M.¹

¹Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula, Russia.

²Federal Research Center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences», G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms of RAS, Pushchino, Russia

Abstract. The study showed that living bacterial cells are effective lead and copper adsorbents. The ability of bacteria to biosorb heavy metals can be used to treat polluted wastewater. The acidity of the environment and the concentration of heavy metals in the solution are the leading factors determining the biosorption of the pollutants.

Keywords: trace elements, bacteria, biosorption, acidity.

Поглощение тяжелых металлов микроорганизмами может происходить двумя способами: в ходе биосорбции и биоаккумуляции [1]. Под биосорбцией понимают комплекс процессов, происходящих на поверхности клеточных стенок по механизмам ионного обмена, адсорбции, комплексообразования, микроосаждения. Биосорбция не требует затрат метаболической энергии и её контроль осуществляется непрямыми физико-химическими реакциями в растворе [2]. Эффективность биосорбции определяется двумя группами факторов 1) поверхностными свойствами клеточных оболочек (заряд, количество и ориентация металлсвязывающих функциональных групп); 2) концентрацией и формами химических соединений металлов в растворе. Под биоаккумуляцией понимают

биологическое поглощение элементов клеткой по механизму активного или пассивного транспорта с последующим накоплением в цитоплазме. Установлено, что при повышенной концентрации тяжелых металлов в среде основное их поглощение осуществляется в результате биосорбции. Грамположительные бактерии имеют большую сорбционную емкость, благодаря толстому пептидогликановому слою их клеточной оболочки, который содержит многочисленные сорбционные позиции [3]. Биосорбция металлов на поверхности микроорганизмов может происходить в несколько этапов. Для *Bacillus subtilis* Beveridge и Murray [4] предложили двухступенчатый механизм взаимодействия. На 1-й ступени происходит электростатическое взаимодействие ионов металлов с функциональными группами на поверхности клеточной оболочки. На 2-м этапе присоединенные металлы выступают в качестве точек дальнейшего осаждения элементов и инициации роста агрегатов. Причем в гидратированном состоянии масса таких агрегатов может достигать массы бактериальной клетки. В данной работе нами было проведено изучение поглощения свинца и меди биомассой живых клеток распространенных грамположительных бактерий *Bacillus subtilis* в лабораторных условиях.

Для получения бактериальной биомассы микроорганизмы культивировали в течение суток при 37°C на качалке в жидкой питательной LB среде с pH 7, в состав которой входило: 10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта и 5 г NaCl, растворенных в 1 л воды. Отделение клеток от питательной среды было проведено центрифугированием при 6000 оборотах в минуту в течение 10 минут с последующей трехкратной промывкой осадка клеток стерильным физиологическим раствором и центрифугированием. Полученный осадок клеток был суспендирован в 0,02 М KNO₃. Оптическая плотность бактериальных суспензий была определена. Биомасса бактерий была рассчитана по формуле на основе оптической плотности [5]:

$$W = 9929(1 - \sqrt{1 - 0.07347A_{660}}),$$

где

W – биомасса микроорганизмов (мкг/мл),

A₆₆₀ – оптическая плотность бактериальной суспензии при длине волны 660 нм

В ходе сорбционных экспериментов было изучено поглощение Pb и Cu полученной биомассой при концентрации металлов в растворе 25, 50, 100, 150, 200 и 250 мкМ и различных значениях pH – 4, 5 и 6. Суспензии клеток в растворе свинца или меди соответствующей концентрации встряхивали в течение 3 часов на орбитальных шейкерах. По окончании эксперимента клетки и раствор разделяли центрифугированием при 6000 оборотах/минуту в течение 10 минут. Количество адсорбированных металлов рассчитывали, как разность между их содержанием в исходном и равновесном растворах. Определение концентраций металлов производили на атомно-абсорбционном спектрометре Analytik Jena contraAA® 800 F (ФРГ) с пламенной атомизацией проб.

Данные о биосорбции ионов Pb и Cu биомассой живых клеток микроорганизмов при различных значениях кислотности сорбционного раствора изображены на Рисунке.

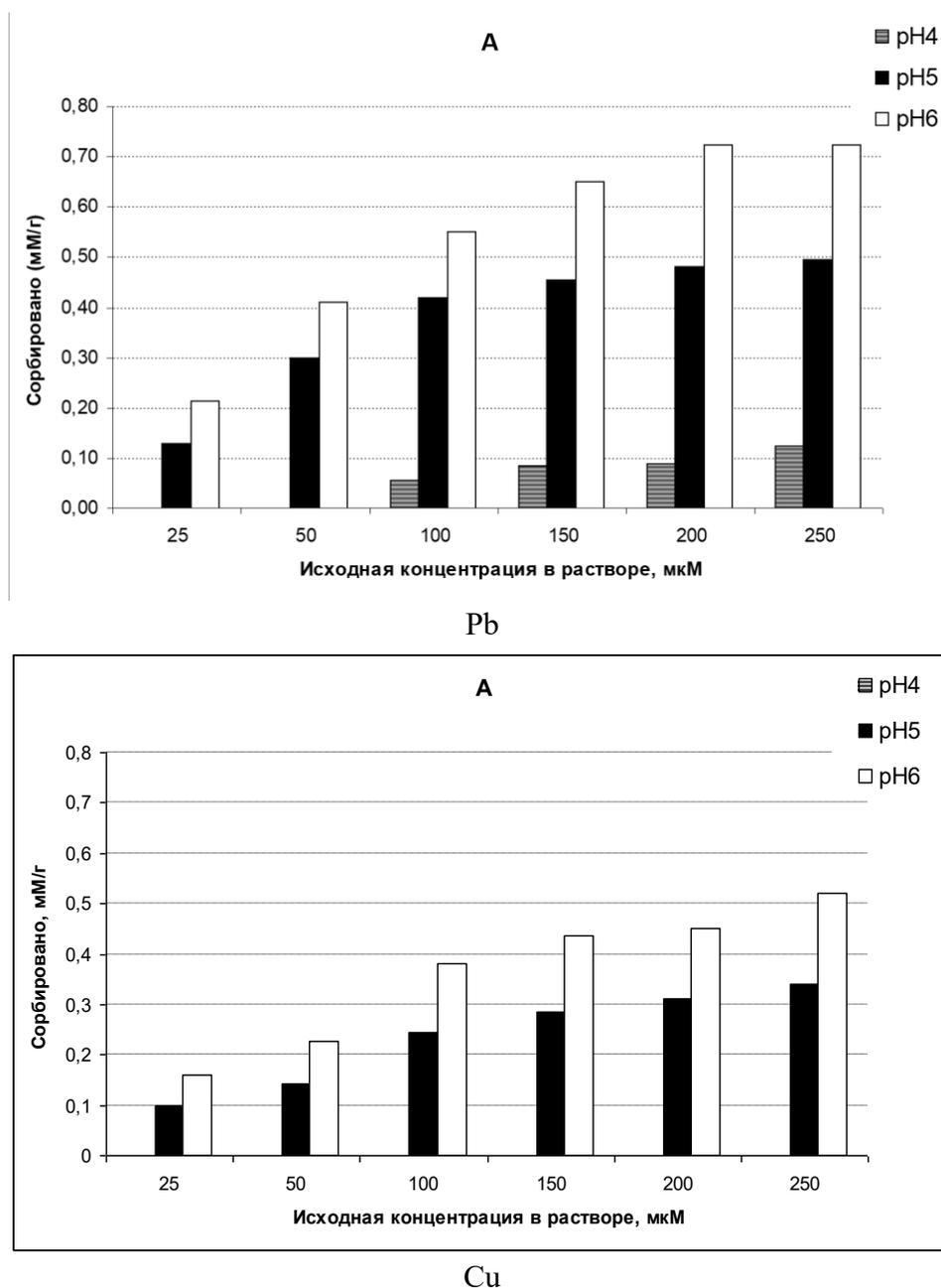


Рисунок – Поглощение свинца и меди клетками бактерий при различных значениях рН в диапазоне концентраций 25-250 мкМ.

При рН 4 Рb поглощался клетками только при концентрации металла от 100 мкМ и выше. Очевидно, в кислой среде катионы тяжелых металлов не могут конкурировать с протонами за связывание сорбционными центрами на поверхности клеточных оболочек. С ростом рН поглощение металла биомассой клеток увеличивалось и было максимальным при наибольших использованных концентрациях. Максимальные значения биосорбции Рb клетками бактерий составляли при рН 5 – 0,5 мМ/г и 6 и при рН 6 – 0,72 мМ/г.

Результаты сорбционных экспериментов показывают, что при рН 4 биосорбции меди клетками *Bacillus subtilis* не происходит. При рН 5 и рН 6 происходит постепенное увеличение поглощения металла с ростом его концентрации. Поглощение Cu клетками *Bacillus subtilis* при максимальных концентрациях металла в растворе была ниже биосорбции Рb и достигала при рН 5 – 0,34 мМ/г и при рН 6 – 0,52 мМ/г. Известно, что суммарные изоэлектрические точки поверхностей большинства бактериальных клеток находятся в интервале между рН 2-4 [6].

Таким образом, при рН сорбционного раствора выше 4, поверхность клеток микроорганизмов была заряжена отрицательно, что обеспечивало электростатическое взаимодействие с катионами металлов.

Полученные экспериментальные и известные литературные данные показывают, что клетки бактерий являются эффективными сорбентами тяжелых металлов. Высокая скорость размножения и поглотительная способность бактерий делает их незаменимыми агентами для очистки загрязненных тяжелыми металлами бытовых и промышленных сточных вод. При этом кислотность среды и концентрации металлов являются ведущими факторами, влияющими на биосорбцию поллютантов.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-24-20074 (региональный конкурс), проведенного совместно с органами власти субъекта Российской Федерации: Тульская область (Соглашение с Правительством Тульской области № 2 от 19.04.22 г.).

Библиографический список

1. Переломов Л.В., Переломова И.В., Пинский Д.Л. Молекулярные механизмы взаимодействия между микроэлементами и микроорганизмами в биокосных системах (биосорбция и биоаккумуляция) // *Агрехимия*, 2013. № 3. С. 80–94
2. Gadd G., White C., de Rome L. Heavy metal and radionuclide uptake by fungi and yeasts // *Biohydrometallurgy*. Kew, Surrey: Science and Technology Letters, 1988. P. 421–435.
3. Beveridge T.J., Pouwels P.H., Sara M. et al. Function of S-layers // *FEMS Microbiology Reviews*. 1997. V. 20. № 1–2. P. 99–149.
4. Beveridge T., Murray R. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis* // *Journal of Bacteriology*. 1980. V. 141. № 2. P. 876–887.
5. Методы общей бактериологии. В трех томах. Том 1. Под редакцией Ф. Герхарда и др. М.: Мир, 1983. 536 с.
6. Beveridge T. Interactions of metal ions with components of bacterial cellwalls and their biomineralization // *Metal-Microbe Interactions. Spec. Publ. Soc. Gen. Microbiol.* 1989. P. 65–83.

ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФТАЛАТОВ *RHODOCOCCLUS* SP. S6

Прохорова А.А.², Ястребова О.В.¹, Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия*

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Аннотация. Изучена способность штамма *Rhodococcus* sp. S6, выделенного из активного ила БОС химического предприятия, к росту на терефталевой кислоте (ТФК) и сложных эфирах фталевой кислоты в качестве субстрата. Установлено, что штамм S6 способен к утилизации ТФК в концентрации до 30 г/л. В клетках штамма S6 обнаружена плаزمида размером около 100 т.п.н. Штамм *Rhodococcus* sp. S6 является перспективными для разработки методов очистки почв и сточных вод, загрязненных фталатами, ТФК.

Ключевые слова: фталаты, терефталевая кислота, *Rhodococcus*, биodeградация, плазмиды.

CHARACTERIZATION OF THE PHTHALATES-DEGRADING STRAIN *RHODOCOCCLUS* SP. S6

Prokhorova A.A.², Yastrebova O.V.¹, Plotnikova E.G.^{1,2}

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

² *Perm State University, Perm, Russia*

Abstract. The ability of the strain *Rhodococcus* sp. S6, isolated from the activated sludge of the biological treatment facilities of a chemical plant, to grow on terephthalic acid (TPA) and phthalic acid esters as a substrate was studied. It was found that strain S6 is capable of utilizing TPA at concentrations up to 30 g/l. In the cells of strain S6 a plasmid of about 100 kb was found. *Rhodococcus* sp. S6 is promising for the development of methods for treating soils and wastewater contaminated with phthalates, TPA.

Keywords: phthalates, terephthalic acid, *Rhodococcus*, biodegradation, plasmids

Терефталевая кислота (ТФК), молекулярная формула $C_6H_4(COOH)_2$, как фталевая и изофталевая кислоты, представляет собой изомер бензолдикарбоновой кислоты, имеющий карбоксильные группы в *para*-положениях 1, 4 (рис.1). ТФК входит в число 50 химических веществ, производимых в наиболее крупных масштабах в мире, широко используется в химической промышленности для получения искусственных волокон и пластмасс, в том числе полиэтилентерефталата, применяемого в изготовлении одежды, пластиковых бутылок и

контейнеров, а также является важным сырьем для изготовления терефталатных пластификаторов, таких как диоктилтерефталат и дибутилтерефталат [1, 2].

Фталаты и их метаболиты обладают гепатотоксичными, мутагенными и канцерогенными свойствами и признаны потенциально опасными для человека и животных [3]. В связи с крупномасштабным промышленным производством и широким применением ТФК становится распространенным загрязнителем окружающей среды. На каждую тонну произведенной ТФК образуется примерно 3-4 м³ сточных вод, содержащих фталевую и терефталевую кислоты, а также бензойную кислоту и другие ароматические соединения [3, 4]. Данное соединение обнаружено в сточных водах и различных экосистемах (почвах, водоемах, водных организмах). ТФК способна к биоаккумуляции, которая усиливается в пищевой цепи, и представляет угрозу здоровью человека и животных [3], в связи с чем возникает необходимость в мониторинге и утилизации данного соединения.

Бактериальная деструкция является наиболее безопасным, экологичным и экономичным методом утилизации фталатов. Описаны штаммы бактерий родов *Rhodococcus*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, способных к росту на ТФК в качестве единственного источника углерода и энергии [5-8]. В последние десятилетия для очистки сточных вод нефтехимических предприятий, содержащих ТФК, широко применяется биологический метод с использованием активного ила биологических очистных сооружений (БОС) [9].

Актинобактерии рода *Rhodococcus* отличаются генетическим и физиологическим разнообразием, выделены из различных местообитаний и обладают способностью к утилизации и трансформации широкого спектра природных соединений и ксенобиотиков. Известны бактерии рода *Rhodococcus*, выделенные из активного ила БОС химических предприятий, способные к деструкции фталевой кислоты и ее сложных эфиров [10, 11]. В литературе описан путь деструкции терефталата бактериями рода *Rhodococcus*: разложение ТФК начинается с образования *цис*-1,2-дигидрокси-1,2-дигидротерефталата под действием терефталат 1,2-диоксигеназы, при трансформации которого образуется протокатеховая кислота (ПКК), которая утилизируется с расщеплением ароматического кольца до основных клеточных метаболитов [7, 8] (рис. 1). Для штамма *Rhodococcus* sp. RHA1, наряду с утилизацией ПКК по *орто*-пути, описан также путь разложения ПКК с образованием катехола в качестве метаболита [7].

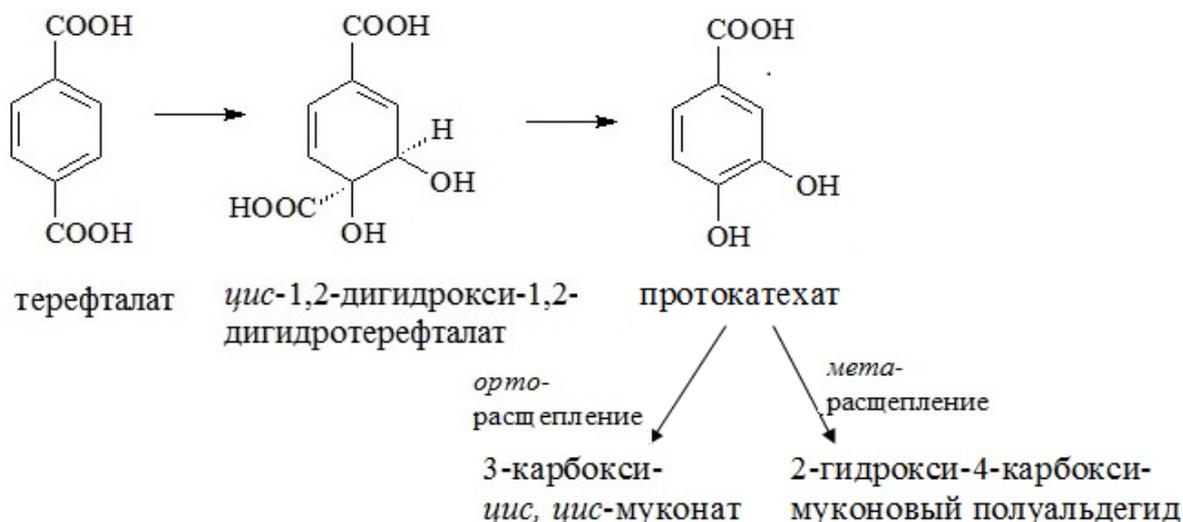


Рисунок 1 – Путь бактериальной деструкции терефталевой и протокатеховой кислот в аэробных условиях [7, 8].

Цель работы – характеристика штамма-деструктора терефталевой кислоты *Rhodococcus* sp. S6, выделенного из активного ила БОС химического предприятия.

Ранее из образца активного ила БОС химического предприятия (г. Пермь) путём прямого высева на минеральную среду K1 с терефталатом в качестве субстрата был выделен грамположительный штамм-деструктор ТФК, обозначенный S6.

На основании секвенирования и последующего биоинформационного анализа гена 16S рНК, данный штамм был идентифицирован как представитель рода *Rhodococcus*, близкородственный типовому штамму *Rhodococcus qingshengii* JCM 15477^T (МК424306.1), уровень сходства по гену 16S рНК составлял 99,13%.

Установлено, что штамм *Rhodococcus* sp. S6 обладает широкой субстратной специфичностью и растет в минеральной среде на следующих субстратах: ТФК, орто-фталевой кислоте, диоктилтерефталате, дибутилфталате, а также на бензойной и протокатеховой кислотах. Можно предположить, что деструкция сложных фталатов штаммом S6 осуществляется через образование фталевой и затем протокатеховой кислоты, в качестве ключевого метаболита, как показано для штаммов рода *Rhodococcus* [7, 8].

Исследованы ростовые характеристики штамма *Rhodococcus* sp. S6 при культивировании в минеральной среде с разной концентрацией ТФК (1, 20, 30 г/л), представленные в виде кривых роста на рисунке 2, а также утилизация данного субстрата методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (табл. 1).

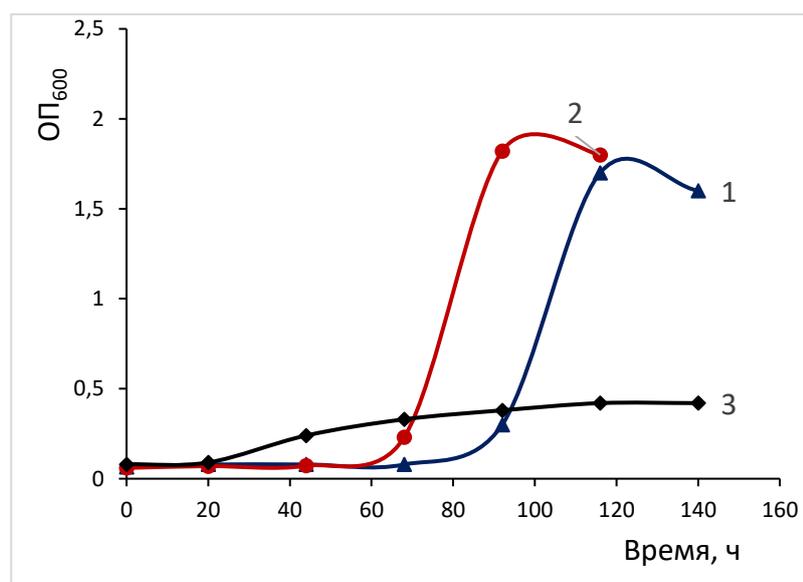


Рисунок 2 – Рост штамма-деструктора S6 при различных концентрациях ТФК (г/л): 1 - 1 ; 2 - 20; 3 - 30.

Максимальные значения ростовых параметров штамма S6 ($ОП_{600}=1,82$) и минимальная лаг-фаза роста (68 ч) зафиксированы при выращивании в среде с 20 г/л ТФК. При данной концентрации субстрата наблюдались также наиболее высокие значения удельной скорости роста культуры ($0,07 \text{ ч}^{-1}$) и удельной скорости утилизации субстрата ($0,3 \text{ сут}^{-1}$).

При концентрации ТФК 1 г/л в среде культивирования также зафиксированы высокая оптическая плотность (1,70) и удельная скорость роста культуры ($0,06 \text{ ч}^{-1}$). Наиболее высокий процент утилизации ТФК (87,0) наблюдался в среде с 1 г/л ТФК, тогда как при 20 г/л ТФК утилизация субстрата снижалась до 46,0%. Высокий уровень утилизации субстрата (87%) в среде с 1 г/л ТФК можно объяснить низкой начальной концентрацией терефталата. Также,

можно предположить, что сопоставимый уровень накопления биомассы штамма S6 (максимальные значения ОП₆₀₀) при выращивании штамма на 1 и 20 г/л ТФК (1,70 и 1.82, соответственно) обусловлены накоплением в среде с высокой концентрацией ТФК метаболитов, ингибирующих рост клеток штамма, как показано для штаммов, растущих на ряде ароматических соединений [12, 13]. Наиболее низкие ростовые показатели штамма отмечены при выращивании в среде, содержащей 30 г/л ТФК (таблица).

Таблица – Параметры роста и утилизации ТФК штаммом *Rhodococcus* sp. S6

Параметры роста	ТФК (г/л)		
	1	20	30
Удельная скорость роста (ч ⁻¹)	0.060	0.070	0.003
Максимальное значение ОП ₆₀₀	1.70	1.82	0.42
Лаг-фаза роста (ч)	92	68	-
Утилизация ТФК (%)	87.0	46.0	11.4
Удельная скорость утилизации (сут ⁻¹)	0.078	0.300	0.001

Исследование на наличие экстрахромосомной ДНК модифицированным методом щелочного лизиса [14] показало присутствие плазмиды молекулярной массой ~100 т.п.н. в клетках штамма S6. Для ряда штаммов рода *Rhodococcus* описано наличие плазмид биодegradации ароматических соединений, в том числе у штамма *Rhodococcus* sp. RHA1 обнаружены плазмиды, включающие гены катаболизма терефталевой кислоты [15, 16]. Можно предположить, что гены, контролирующие деструкцию ТФК, штамма S6 также расположены в плазмиде.

Таким образом, показано, что штамм *Rhodococcus* sp. S6 способен к росту и эффективной утилизации ТФК в качестве субстрата, при ее высокой концентрации в минеральной среде, до 30 г/л. Для штаммов рода *Rhodococcus* ранее не была показана способность к утилизации ТФК в данной концентрации. Штамм *Rhodococcus* sp. S6 является перспективным для дальнейших исследований и разработки новых биотехнологий очистки загрязненных почв и промышленных стоков.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: АААА-А19-119112290008-4.

Библиографический список

1. Karthik M., Dafale N., Pathe P., Nandy T. Biodegradability enhancement of purified terephthalic acid wastewater by coagulation–flocculation process as pretreatment // J. Hazard. Mater. – 2008. – Т. 154. – №. 1-3. – С. 721-730.
2. Sheehan R. Terephthalic Acid, Dimethyl terephthalate, and isophthalic acid // Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH. doi:10.1002/14356007.a26_193
3. Zhang Z., Ma L., Zhang X.X., Li W., Zhang Y., Wu B., Yang L., Cheng S. Genomic expression profiles in liver of mice exposed to purified terephthalic acid manufacturing wastewater // J. Hazard. Mater. – 2010. – V. 181. – P. 1121-1126.

4. Zhang X., Wan, Y., Cheng S., Sun S., Zhu C., Li W., Zhang X., Wang G., Lu J., Luo X. Purified terephthalic acid wastewater biodegradation and toxicity // J. Environ. Sci. (China). – 2005. – V. 17(5). – P. 876-80.
5. Wang Z.J., Teng L.H., Zhang J.F. Study on optimal biodegradation of terephthalic acid by an isolated *Psuedomonas* sp. // Afr. J. Biotechnol. – 2011. – V. 10. – №. 16. – P. 3143-3148.
6. Kasai D., Kitajima M., Fukuda M., Masai E. Transcriptional regulation of the terephthalate catabolism operon in *Comamonas* sp. strain E6 // Appl. Environ. microbiol. – 2010. – V. 76. – № 18. – P. 6047–6055.
7. Hara H., Eltis L.D., Davies J.E., Mohn W.W. Transcriptomic analysis reveals a bifurcated terephthalate degradation pathway in *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // J. Bacteriol. – 2007. – V. 189. – № 5. – P. 1641–1647.
8. Choi K.Y., Kim D., Sul W.J., Chae J.C., Zylstra G.J., Kim Y.M., Kim E. Molecular and biochemical analysis of phthalate and terephthalate degradation by *Rhodococcus* sp. strain DK17 // FEMS Microbiol. Letters. – 2005. – V. 252. – P. 207–213.
9. Aksu D., Vura C., Karabey B., Ozdemir G. Biodegradation of terephthalic acid by isolated active sludge microorganisms and monitoring of bacteria in a continuous stirred tank reactor // Braz. Arch. Biol. Technol. – 2021. – V.64 – P. 1678-4324.
10. Lu Y., Tang F., Wang Y., Zhao J., Zeng X., Luo Q., Wang L. Biodegradation of dimethyl phthalate, diethyl phthalate and di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. L4 isolated from activated sludge // J. Hazard. Mater. – 2009. – V. 168. – № 2–3. – P. 938-943.
11. Jin D.-C., Liang R.-X. Biodegradation of di-*n*-butyl phthalate by *Rhodococcus* sp. JDC-11 and molecular detection of 3,4-phthalate dioxygenase gene // Microbiol. Biotechnol. – 2010. – V. 20. – № 10. – P. 1440-1445.
12. Chauhan A., Fazlurrahman, Oakeshott J.G., Jain R. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation // Indian J. Microbiol. – 2008 –V. 48 – P. 95–113.
13. Pumphrey G.M., Madsen E.L. Naphthalene metabolism and growth inhibition by naphthalene in *Polaromonas naphthalenivorans* strain CJ2 // Microbiol. – 2007 – V. 153 – P. 3730-3738.
14. Marko M.A., Chipperfield R., Birnboim H.C. A procedure for the large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder // Analit. Biochem. – 1982. – V. 121. – № 2. – P. 382–387.
15. Warren R., Hsiao W.W., Kudo H., Myhre M., Dosanjh M., Petrescu A. Functional characterization of a catabolic plasmid from polychlorinated-biphenyl-degrading *Rhodococcus* sp. strain RHA1 // J. Bacteriol. – 2004. – V. 186. – P. 7783-7795.
16. Patrauchan M.A., Florizone C., Dosanjh M., Mohn W.W., Davies J., Eltis L.D. Catabolism of benzoate and phthalate in *Rhodococcus* sp. strain RHA1: redundancies and convergence // J. Bacteriol. – 2005. – V. 187. – № 12. – P. 4050–4063.

АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ БИОТОПОВ АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ ФИКСИРОВАТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АЗОТ

Пьянкова Е.В.¹, Максимова Ю.Г.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Выделено 12 штаммов азотфиксирующих бактерий из образцов грунта старой карты содового шламохранилища Березниковского содового завода. Изучены их морфологические и физиолого-биохимические свойства. Исследована способность бактерий к росту на безазотистой среде и выделению в среду ионов аммония, а также изучено влияние инокуляции торфогрунта бактериальным изолятом Т.3.8.2Б на рост томатов.

Ключевые слова: фиксация азота, содовое шламохранилище, алкалотолерантные бактерии.

ALKALOTOLERANT BACTERIA OF ANTHROPOGENIC BIOTOPES CAPABLE OF FIXING MOLECULAR NITROGEN

Ryankova E.V.¹, Maksimova Y.G.^{1,2}

¹ Perm State University, Perm, Russia Federation

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. 12 strains of nitrogen-fixing bacteria were isolated from soil samples from the old map of the soda sludge storage of the Berezniki soda plant. Their morphological and physiological-biochemical properties have been studied. The ability of bacteria to grow on a nitrogen-free medium and release ammonium ions into the medium was studied, and the effect of inoculation of peat soil with bacterial isolate T.3.8.2B on the growth of tomatoes was studied.

Keywords: nitrogen fixation, soda sludge storage, alkalitolerant bacteria.

Введение. Техногенное загрязнение почв происходит в результате деятельности человека при попадании в грунты экотоксикантов, высоких концентраций различных химических соединений, тяжелых металлов, и приводит к деструкции почв и исчезновению растительного покрова. Одним из видов такого загрязнения являются шламонакопители твердых отходов и дистиллерной жидкости производства кальцинированной соды. Основным способом производства соды является аммиачный способ. Негативное влияние такого производства заключается в отчуждении больших площадей под складирование отходов, имеющих высокую щелочность и минерализацию. Отходы содержат в большом количестве

хлорид-ионы и кальций, а также карбонат-, сульфат-ионы, ионы аммония, натрия и магний [1, 2]. На территории России АО «Башкирская содовая компания» (г. Стерлитамак) и АО «Березниковский содовый завод» (г. Березники) производят порядка 2,1 млн тонн соды за год данным способом [3].

Экстремальные условия, создаваемые на шламонакопительных площадках, являются уникальной средой для обитания микроорганизмов, устойчивых к высоким рН и минерализации. В составе микробиома встречаются алкалофильные и галофильные, а также алкалотолерантные и галотолерантные микроорганизмы. При восстановлении растительности на этих территориях после прекращения сброса шлама в грунте появляются представители домена *Bacteria*, которые обитают в растительно-микробных сообществах и способны фиксировать молекулярный азот.

Бактерии, способные фиксировать молекулярный азот, в первую очередь привлекают внимание как биоудобряющие агенты [4]. При внесении их в почву наблюдается стимуляция роста растений и увеличение урожая [5,6]. Азотфиксирующие бактерии, обитающие в старых шламонакопителях, где происходит постепенное восстановление грунта и растительного покрова, но при этом длительное время сохраняются высокие концентрации солей, представляют особый интерес, потому что способность к фиксации азота у них сочетается с повышенной общей устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, что делает их перспективными объектами для создания биопрепаратов.

Цель данной работы – исследование биоразнообразия азотфиксирующих бактерий старой карты содового шламохранилища в процессе восстановления почвенного и растительного покрова и ростостимулирующей активности выделенных изолятов.

Материалы и методы.

Объектом исследования являются грунты содового шламонакопителя Березниковского содового завода (г. Березники, Пермский край).

Образцы грунта были отобраны с территории старой карты шламонакопителя в точке Т.2 (59°26'31,9" с.ш., 56°44'11,4" в.д., эксплуатация прекращена 10 лет назад) и точке Т.3 (59°25'40,8" с.ш., 56°43'24,6" в.д., эксплуатация прекращена в 70-х гг. XX в.). Отбор проб почвогрунта произведен с поверхности (Т.3.9), на глубине 10-20 см (Т.3.8), и из грунта с ризосферой березы (Т.2). Образцы хранили в холодильники при температуре +4°C.

Чистые культуры азотфиксирующих бактерий выделяли из образцов грунта содового шламохранилища на селективной агаризованной среде Эшби (г/л): маннит – 20,0, K₂HPO₄ – 0,2, MgSO₄ · 7H₂O – 0,2, NaCl – 0,2, CaCO₃ – 5,0, K₂SO₄ – 0,1, агар-агар – 20,0 [7]. Культуры инкубировали при температуре 30 °С. Общее количество азотфиксирующих бактерий в образцах определяли при высеве на агаризованную безазотистую среду Эшби из десятикратных разведений и выражали как количество колониеобразующих единиц (КОЕ) на грамм сухой массы. Для изучения морфологических и физиолого-биохимических свойств выделенных чистых культур проводили следующие тесты: окраску по Граму, для подтверждения дополнительно проводили КОН-тест, который также показывает принадлежность культур бактерий; микроскопию, тест на наличие каталазы и оксидазы, изучение роста на различных источниках углерода.

Способность расти на безазотистой среде оценивали по изменению оптической плотности (ОП₅₄₀) культуральной жидкости после инокуляции биомассой выделенных изолятов и по массовой концентрации аммонийного азота, выделяемого в среду в процессе роста. Содержание аммонийного азота в среде определяли с реактивом Несслера.

Концентрацию ионов аммония в культуральной жидкости определяли с помощью градуировочного графика, построенного для растворов с известной концентрацией аммония. Для исследования брали 6 мл культуральной жидкости после выращивания изолята в течение определенного времени на безазотистой среде Эшби, добавляли 1 мл реактива Несслера, 1 мл тиосульфата натрия для устранения мешающего влияния хлора и доводили безаммиачной водой до 50 мл, перемешивали. Спустя 10 минут измеряли оптическую плотность (ОП) полученных растворов в кювете с толщиной слоя 3 см при длине волны 430 нм на фотометре КФК-3 (Россия). В качестве раствора сравнения использовали безаммиачную воду. Эксперимент проводили в течение 3 недель, чтобы проследить динамику выделения аммония в среду.

Для оценки влияния инокуляции грунта выделенными нами изолятами на рост растений суспензию азотфиксирующего изолята Т.3.8.2Б добавляли к грунту при выращивании рассады томатов сорта «Балконное чудо» и оценивали интенсивность роста растений. Для инокуляции изолят Т.3.8.2Б культивировали в колбах Эрленмейера до стационарной фазы, добавляли в контейнеры на 300 г почвогрунта в количестве 0,33 г сырой бактериальной массы и высаживали 15-суточную рассаду томатов.

Результаты и обсуждение.

Из почвогрунтов с территории старой карты содового шламохранилища было выделено 12 изолятов бактерий, способных расти на селективной безазотистой среде Эшби. Пассажи на данную среду выполняли последовательно 3 раза. Количество жизнеспособных азотфиксирующих бактерий определяли в точках Т.2, Т.3.8, Т.3.9 методом подсчета КОЕ при высеве на чашки Петри (рис. 1). Наибольшее содержание этих микроорганизмов определено в образце грунта Т.2 ($1,95 \cdot 10^6$ КОЕ/г). Вероятно, это связано с тем, что грунт в этом месте отбора пробы содержал ризосферу.

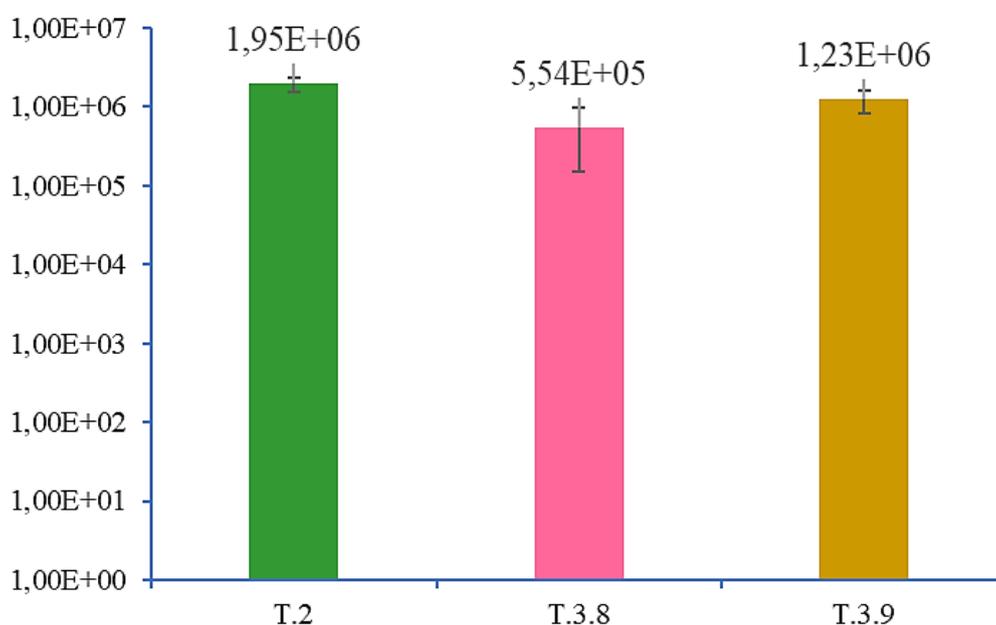


Рисунок 1 – Количество КОЕ/г бактерий на безазотистой среде Эшби.

Морфологию клеток выделенных штаммов определяли микроскопией мазков, окрашенных по Граму. Мазки готовили из 24-часовой жидкой культуры, выращенной при комнатной температуре. Четыре из двенадцати выделенных штаммов являются

грамотрицательными, остальные – грамположительными. КОН-тест подтвердил грампринадлежность культур. Форму и подвижность клеток определяли микроскопированием с фазовым контрастом. Клетки двух штаммов, выделенные из грунта в точках Т.3.8 и Т.3.9, являются кокками, остальные – палочками. Бактерии пяти штаммов являются неподвижными при комнатной температуре.

Биологическая фиксация азота имеет большое значение для повышения плодородия почв и урожайности сельскохозяйственных культур. Установлено, что некоторые почвенные бактерии обладают способностью фиксировать молекулярный азот и переводить его в минеральные соединения, доступные для усвоения растениями. Для определения образования и выделения в среду ионов аммония использовали методику определения массовой концентрации аммонийного азота с реактивом Несслера. Исследование показало, что в среднем больше всего аммония выделилось в первую неделю культивирования (рис. 2). Больше всего аммония в среду выделяли бактерии, относящиеся к штаммам Т.3.8.2Б и Т.3.8.4Б. В культуральных жидкостях с этими штаммами и на второй неделе наблюдалось увеличение массовой концентрации ионов аммония. Далее концентрация аммония начала снижаться. Предположительно, это связано с тем, что бактерии начали его поглощать в процессе своей жизнедеятельности. Наличие ионов аммония в среде подтверждает то, что данные штаммы способны фиксировать молекулярный азот и переводить его в формы, пригодные для потребления растениями.

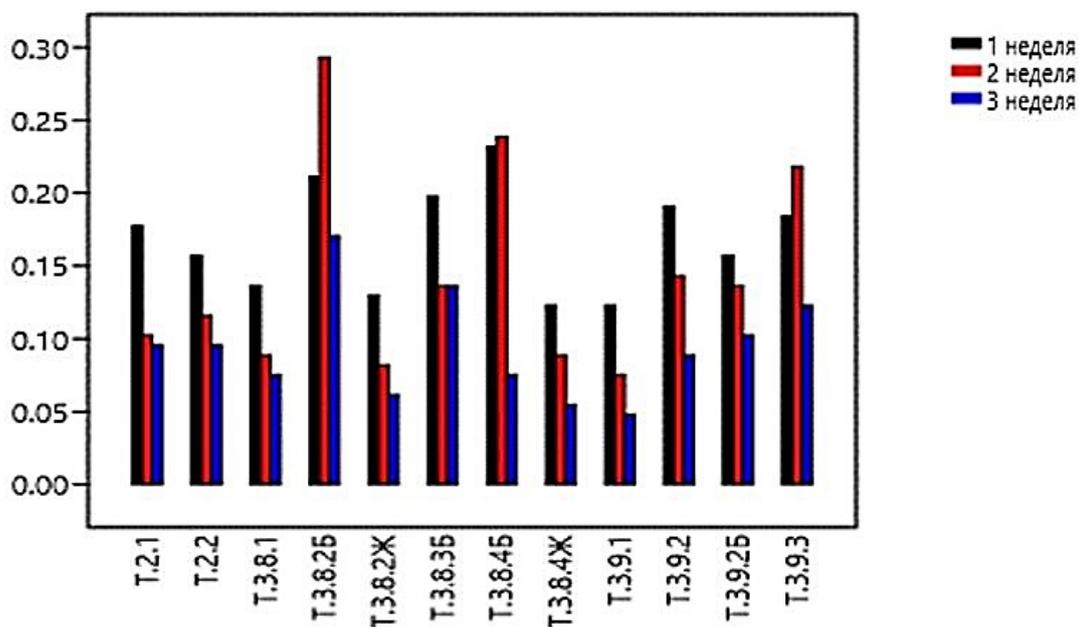


Рисунок 2 – Массовая концентрация аммонийного азота в культуральной жидкости на протяжении трех недель роста бактериальных изолятов на среде Эшби, мг/л.

Было исследовано влияние инокуляции бактериального изолята Т.3.8.2Б на рост томатов, выращенных в равных с контролем условиях освещения, температуры, увлажнения в течение 45-ти суток в контейнерах с обедненным торфогрунтом (таблица). Установлено, что внесение азотфиксирующего изолята Т.3.8.2.Б. в грунт оказывает стимулирующее действие на рост растений по сравнению с контрольным вариантом без добавок.

Таблица – Средние морфометрические параметры томатов на 45-е сутки роста после инокуляции изолятом азотфиксирующих бактерий

Вариант	Длина, см		Сухая масса, г	
	корня	побега	корня	побега
Контроль	11.5±1.9	17.5±1.9	0.20±0.04	1.43±0.19
Т.3.8.2Б	15.4±2.1	23.5±2.4	0.26±0.07	2.39±0.21

Таким образом, выделенные на безазотистой среде бактериальные изоляты обладают способностью фиксировать молекулярный азот и могут быть использованы в составе бактериального препарата с целью увеличения урожайности сельскохозяйственных культур.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Библиографический список

1. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Изменения микробиома как индикатор восстановления природных сред содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод» // Вода и экология. Проблемы и решения. –2020. –№1(81). –С.81-94.
2. Калинина Е.В., Рудакова Л.В. Снижение токсичных свойств шламов содового производства с последующей их утилизацией // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. –2018. –Т.329. –№6. –С.85-96.
3. Горожанин В.М. Альтернативный источник минерального сырья для производства соды в г. Стерлитамаке // Вестник академии наук РБ. –2018. –Т.29.–№4.–С.87-97.
4. Шабаев В.П. Эффективность применения азотфиксирующей бактерии при выращивании растений в различных почвенных условиях // Агрохимия.–2020.–№11.–С.41-52.
5. Умаров М.М., Бурлуцкая Г.Р., Давидович О.Г., Матвеева Н.Г. Влияние инокуляции бактериями рода *Pseudomonas* на процессы азотного цикла в ризосфере небобовых растений // Микробиология.–1994.–Т.63.–Вып.2.–С.–326-333.
6. Gupta G., Parihar S.S., AHIRWAR N.K., Snehi S.K., Singh V. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Current and future prospects for development of sustainable agriculture // J. Microb. Biochem. Technol.–2015.–V.7.–P.1-7.
7. Тепер Е.З. Практикум по микробиологии: Учебное пособие для вузов / Е.З. Тепер, В. К. Шильникова, Г. И. Переверзева; Под ред. В. К. Шильниковой. – 5-е изд., перераб. и доп. – М.: Дрофа.–2004.–256 с.

ТИПИЧНЫЕ И АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ: СХОДСТВА И ОТЛИЧИЯ

Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

*Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пушкино, Россия*

Аннотация. Большинство известных грибных лакказ проявляют свою максимальную активность в кислых условиях среды. Однако встречаются единичные грибные лакказы, демонстрирующие высокую активность в нейтрально-щелочной среде и для которых в настоящее время не найдено объяснения их функциональной активности в данных условиях. В настоящей работе показаны результаты сравнительного анализа структурных и функциональных свойств типичных и алкалофильных лакказ

Ключевые слова: алкалофильные лакказы, грибы, структура, активность.

TYPICAL AND ALKALOPHILIC LACCASES: SIMILARITIES AND DIFFERENCES

Renfeld Zh.V., Chernykh A.M., Kolomytseva M.P.

*Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms RAS,
PSCBR RAS, Pushchino, Russia*

Abstract. Most of the known fungal laccases show their maximum activity under acidic environmental conditions. However, there are single fungal laccases that demonstrate high activity in a neutral alkaline medium and for which no explanation of their functional activity under these conditions has been found so far. This paper presents the results of a comparative analysis of the structural and functional properties of typical and alkaliphilic laccases

Keywords: alkaliphilic laccases, fungi, structure, activity

Лакказа (ЕС 1.10.3.2, “голубая” оксидаза) – это промышленно ценный фермент, имеющий широкую субстратную специфичность в отношении к донорам электронов, способна окислять различные замещенные фенолы, ароматические амины и некоторые неорганические ионы. Единственным кофактором для каталитической реакции, осуществляемой лакказами является молекулярный кислород воздуха, а единственным побочным продуктом катализируемой ею реакции является вода.

Лакказы широко представлены в природе, однако основным их продуцентом являются грибы, в которых эти ферменты выполняют важную функцию – участвуют в процессе разложения лигнина. Главным преимуществом грибных лакказ перед бактериальными является высокий редокс-потенциал Т1-атома меди, что значительно расширяет спектр атакуемых ими субстратов. Однако, большая часть исследованных грибных лакказ является

«типичными» и обладает наибольшей активностью в кислой области рН. В то же время найдены малочисленные грибные алкалофильные лакказы с наибольшей активностью в нейтрально-щелочной среде, чаще всего представленные среди аскомицетов [1].

Сферы применения лакказ очень разнообразны. Их используют в пищевой промышленности для удаления фенольных соединений из различных напитков, в хлебопечении для улучшения свойств теста, а также для продления срока годности продуктов питания [2], в текстильной промышленности для обесцвечивания волокон [3], в косметической промышленности для создания отбеливающей зубной пасты, а также для обесцвечивания волос и кожи [4], в производстве синтетических моющих средств [5], для биоремедиации почв, обесцвечивания красителей и деградации токсичных соединений в промышленных сточных водах [2], в органическом синтезе биоактивных соединений [6].

Относительно недавно найденные алкалофильные лакказы расширили границы применения этих ферментов за счет активности в нейтрально-щелочной среде. Так, алкалофильные лакказы активно используются при разработке новых биотехнологических процессов, таких как биотопливные ячейки имплантируемых приборов, клеточный синтез фармакологически ценных соединений, нанобиотехнологии и биосенсоры, основной средой которых являются физиологические жидкости организма или цитоплазма клеток [7].

Известно, что рН-оптимум типичных лакказ имеет куполообразную форму [8], что обусловлено двумя факторами. Во-первых, при повышении рН снижается окислительно-восстановительный потенциал фенольных субстратов, что делает эти соединения более доступными для окисления лакказой. Во-вторых, на снижение лакказной активности при нейтральных или щелочных значениях рН влияет усиление связи гидроксид-аниона с медным центром T2/T3, что ингибирует перенос электрона от T1 меди к T2/T3 медному центру лакказы [8]. Поэтому механизм сохранения высокой активности алкалофильных грибных лакказ в нейтрально-щелочной среде в настоящее время не исследован и требует объяснения.

Целью настоящей работы являлся поиск структурных факторов в молекулах алкалофильных лакказ, определяющих каталитическую активность этих ферментов в нейтрально-щелочной среде.

Для достижения поставленной цели были исследованы физико-химические, кинетические и структурные свойства новой алкалофильной лакказы гриба *Myrothecium roridum*, а также был проведен ее сравнительный анализ с известными алкалофильными и ацидофильными лакказами с известной пространственной структурой.

В ходе работы, из культуральной жидкости гриба с высокой лакказной активностью была очищена нативная мономерная лакказа, обладающая максимальной активностью со всеми протестированными фенольными субстратами (2,6 диметоксифенолом, сиригалазином, феруловой кислотой и кониферилловым спиртом) в нейтрально-щелочной среде и определены ее физико-химические и кинетические свойства. Была определена полная нуклеотидная последовательность гена, кодирующего данную алкалофильную лакказу, а также получена ее аминокислотная последовательность.

Посредством гомологического моделирования была предсказана пространственная структура исследуемой алкалофильной лакказы. Показано, что она содержит три купредоксин подобных домена, что типично для всех грибных лакказ. Кроме того, активный центр лакказы способен связывать 4 иона меди, формирующие T1 и T2/T3 активные центры фермента (Рис.).

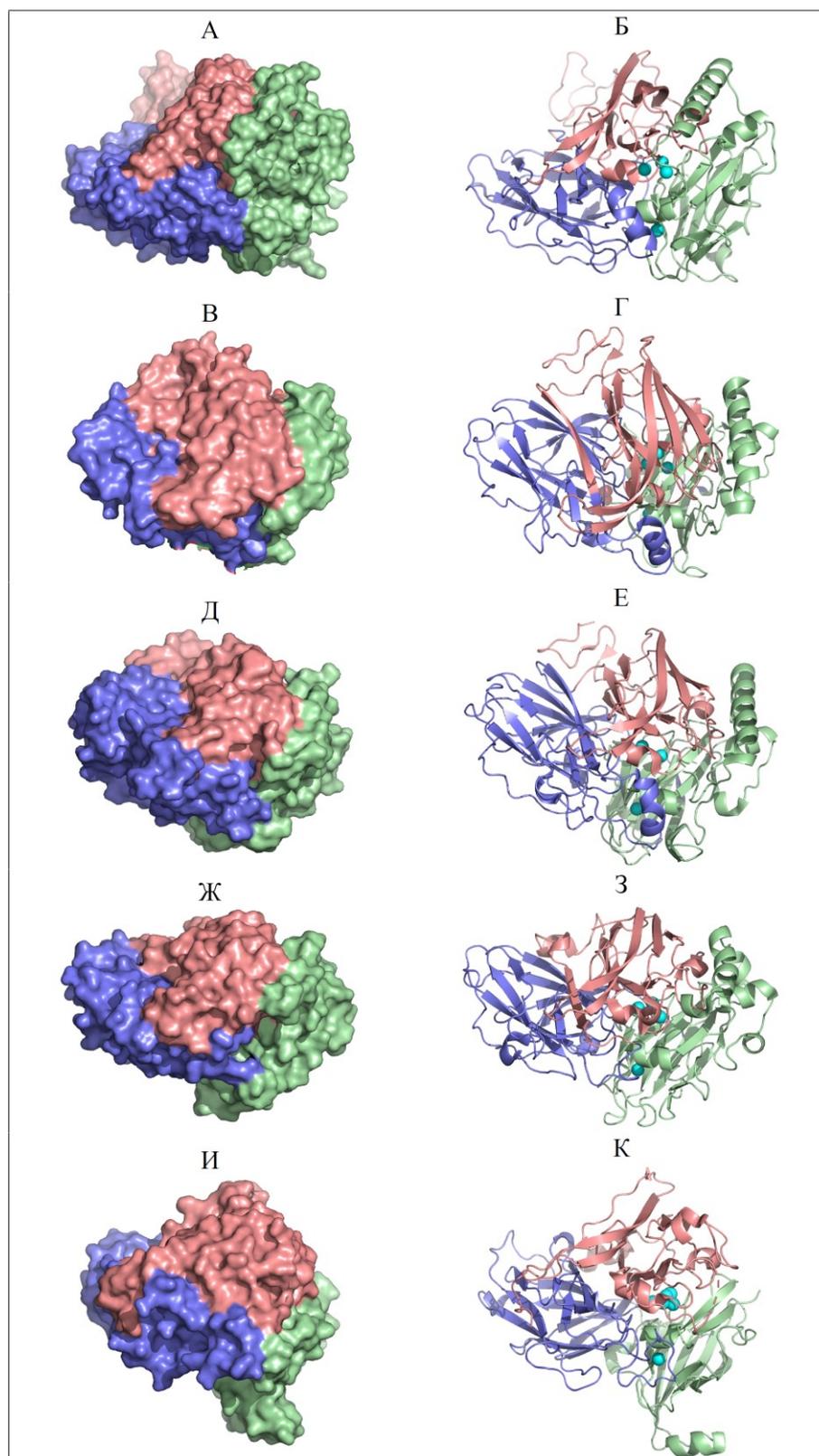


Рисунок – Пространственная структура лакказ: алкалофильной лакказы аскомицета *M. roridum* (А и Б), алкалофильной лакказы аскомицета *Melanocarpus albomyces* (В и Г), типичной лакказы аскомицета *Botrytis aclada* (Д и Е), типичной лакказы базидиомицета *Lentinus tigrinus* (Ж и З), алкалофильной лакказы бактерии *Bacillus subtilis* (И и К). Слева показаны поверхности молекул, справа – укладка белковой цепи. Синим, красным и зеленым цветом показаны лакказные домены. Голубым цветом отмечены атомы меди в Т1 и Т2/Т3 центрах ферментов.

С помощью множественного выравнивания аминокислотных последовательностей и сравнительного структурного анализа исследуемой алкалофильной лакказы аскомицета *M. roridum* и алкалофильных и ацидофильных грибных лакказ с известной пространственной структурой было показано наличие канала (Т1/Т3α), который ответственен за поступление молекулярного кислорода и в котором происходит связывание ароматического субстрата, а также Т2-канала, ответственного за высвобождение молекулы воды, образуемой в ходе каталитической реакции.

В результате расчета и анализа электростатических потенциалов на поверхности Коннолли в молекулах, исследуемых лакказ было показано формирование более отрицательного заряда на внутренних и внешних поверхностях молекул при повышении рН среды. При этом значимой зависимости рН-оптимума лакказ от электростатического заряда на внутренней поверхности Т1/Т3α- и Т2-каналов замечено не было. Однако, сравнительный анализ структур позволил обнаружить дополнительный внутримолекулярный канал, предположительно отвечающий за аккумуляцию и транспорт протонов к Т2/Т3-активному центру, что обеспечивает его функциональную активность в нейтрально-щелочных условиях среды.

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта РФФИ-Аспиранты № 20-34-90059 и гранта фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере по проекту «УМНИК-2021» (№ 17366ГУ/2022 (номер 0074517)).

Библиографический список

1. Kolomytseva M.P., Myasoedova N.M., Chernykh A.M., Gaidina (Samoilova) A.S., Shebanova A.D., Baskunov B.P., Aschenbrenner J., Rosengarten J.F., Renfeld Zh.V., Gasanov N.B., Pinchuk I.P., Classen T., Pietruszka J., Golovleva L.A. Laccase isoform diversity in basidiomycete *Lentinus strigosus* 1566: potential for phenylpropanoid polymerization // Int. J. Biol. Macromol. – 2019. – V. 137. – №137. – P. 1199-1210.
2. Couto S. R., Herrera J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review // Biotechnology Advances. – 2006. – V. 24. – №5. – P. 500-513.
3. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. How to enjoy laccases // Cell. Mol. Life Sci. – 2015. – V. 72. – P. 923-940.
4. Lang G., Cotteret J. «Dyeing composition containing a laccase and method for dyeing keratinous fibres» US Patent Application № 20060021155, February 2, 2006.
5. Gardner R.R., Glogowski M.W., Haught J.C., Baeck A.C., Convents A.C., Smets J., Van Steenwinckel P.C.A., Gray P.G., Cruickshank G.D., Costello A., Duncan M. «Compositions for cleaning with softened water» W02006044952, April 27, 2006.
6. Mate D. M., Gonzalez-Perez D., Kittl R., Ludwig R. Functional expression of a blood tolerant laccase in *Pichia pastoris* // BMC Biotechnology. – 2013. – V. 13. – №1. – P. 38.
7. Marienhagen J., Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products // J. Biotechnol. – 2013. – V. 163. – P. 166-178.
8. Xu F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases // J. Biol. Chem. – 1997. V. 272. – №2. – P. 924-928.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОГЕННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Рожина Э.В., Ахатова Ф.С., Крючкова М.А., Баташева С.Н., Фахруллин Р.Ф.

*Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский Федеральный университет,
Казань, Россия*

Аннотация. С использованием водного экстракта сфагнома получены биогенные наночастицы серебра. С помощью колориметрического мтт-теста оценивалось влияние биогенных наночастиц серебра на метаболическую активность клеток карциномы легкого человека через 24 часа совместной инкубации. Показана низкая цитотоксичность полученных наночастиц для клеток млекопитающих.

Ключевые слова: биогенные наночастицы серебра, клетки млекопитающих, цитотоксичность, мтт-тест.

DETERMINATION OF THE EFFECT OF BIOGENIC SILVER NANOPARTICLES ON MAMMALIAN CELLS

Rozhina E.V., Akhatova F.S., Kruchkova M.A., Batasheva S.N., Fakhrullin R.F.

Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. Biogenic silver nanoparticles were obtained using an aqueous extract of sphagnum. The effect of biogenic silver nanoparticles on the metabolic activity of human lung carcinoma cells after 24 hours of co-incubation was evaluated using the colorimetric MTT test. The low cytotoxicity of the obtained nanoparticles for mammalian cells was shown.

Keywords: Silver biogenic nanoparticles, mammalian cells, cytotoxicity, MTT-test.

Развитие у микроорганизмов устойчивости к лекарственным препаратам приводит к использованию высоких доз лекарств, более длительному пребыванию пациентов в больницах и увеличению смертности [1]. Существуют различные факторы, которые способствуют устойчивости микроорганизмов к антибиотикам, такие как неправильное и чрезмерное использование антибиотиков, их широкое сельскохозяйственное использование и недостаток новых антибиотиков [2]. Возможные известные механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам: (1) снижение поглощения противомикробных препаратов, (2) изменение мишени антибиотика, (3) развитие ферментов, разрушающих / модифицирующих лекарственные средства в микроорганизмах, и (4) образование слоя биопленки, которая окружает бактерии и избегает воздействия антибиотиков [3]. В результате необходимо увеличивать терапевтические дозы лекарств, что приводит к неблагоприятным побочным

эффектам на людей и животных. Патогенные микроорганизмы выработали устойчивость почти ко всем типам антибиотиков, которые используются в настоящее время [4]. Металлические наночастицы стали одним из наиболее многообещающих вариантов преодоления микробной устойчивости и борьбы с микроорганизмами с множественной лекарственной устойчивостью [5]. В свою очередь биогенные металлические наночастицы показали свою эффективность против микроорганизмов, обладающих устойчивостью к лекарственным препаратам, как при использовании самостоятельно, так и совместно с антибиотиками. Важно отметить, что биогенные наночастицы просты в получении, обладают высокой биосовместимостью и экологически безопасны. Кроме того, благодаря биопокрытию наночастицы на поверхности наночастиц находятся свободные функциональные группы, что позволяет им конъюгировать с антимикробными препаратами, генами и пептидами, с целью повышения их эффективности и доставки.

Цель работы – определение цитотоксичности биогенных наночастиц серебра, полученных с использованием водного экстракта сфагнома (*Sphagnum fallax*). Кроме того, по составу метаболитов сфагнум схож с лекарственными растениями. Известно также, что способность сфагнома препятствовать процессам гниения обусловлена высоким содержанием природных антибиотиков, благодаря которым эти мхи считаются одними из самых популярных антисептиков в медицине. Растения *S. fallax* были взяты из природного источника – с олиготрофного болота в Ульяновской области (Болото Малое, в 2 км к юго – востоку от с. Юлово Инзенского района). В лабораторных условиях растения были промыты и высушены.

Визуализация полученных биогенных наночастиц серебра проводилась с помощью темнопольной, атомно-силовой и просвечивающей электронной микроскопии. Показано, что суспензия наночастиц стабильная при комнатной температуре и размер наночастиц составляет около 40 нм (Рисунок).

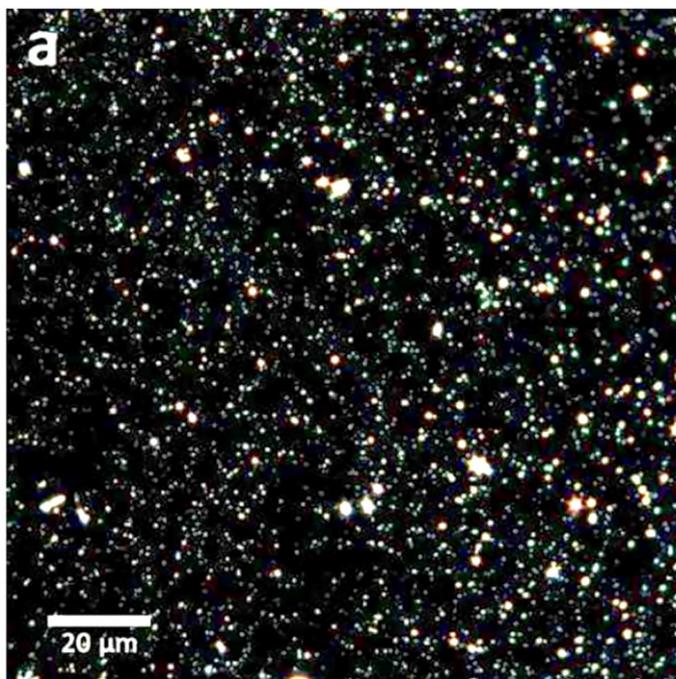


Рисунок – Визуализация биогенных наночастиц серебра с помощью темнопольной микроскопии.

Для оценки токсичности наноматериалов был применен широко используемый МТТ-тест. Известно, что желтая соль МТТ (тетразол) восстанавливается цитозольными ферментами жизнеспособных клеток до пурпурного формазана и по изменению оптической плотности в опытных вариантах относительно контроля можно определить влияние наночастиц на клетки. Жизнеспособность клеток после инкубации с наночастицами и прекурсорами оценивали с помощью МТТ-теста [6]. Для этого клетки А549 (АТСС, США) культивировали в 96-луночных планшетах (Corning) в концентрации 3000 тысячи клеток на лунку и обрабатывали биогенными наночастицами серебра в течение 24 ч при 37°C. Дополнительно клетки инкубировали только со средой или экстрактом сфагнома, или наночастицами серебра, полученными химическим методом.

После инкубации с исследуемыми соединениями клетки А549 инкубировали в течение 4 ч при 37°C с раствором МТТ (0,5 мг/мл). После раствор МТТ удаляли, а выпавший в осадок краситель растворяли в ДМСО (диметилсульфоксиде) и осторожно встряхивали в течение 15 мин. Затем измеряли изменение оптической плотности раствора на планшетном флюориметре при 540 нм (LBG Omega, Германия), а результаты выражали в процентах от показателей клеток в контроле (нативные клетки). Для оценки зависимости цитотоксичности биогенных наночастиц серебра от дозы вносимых наноматериалов клетки А549 обрабатывали различными концентрациями наноматериалов (0,25-100 мкг/мл), как описано выше.

Показано, что экстракт сфагнома в концентрациях 1, 5 % не оказывает токсического влияния на метаболическую активность клеток карциномы легкого человека, при этом концентрация сфагнома в среде 20% снижала жизнеспособность клеток А549 на 20% относительно контроля. При этом биогенные наночастицы серебра были менее токсичны для раковых клеток А549, чем полученные химическим методом.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда номер проекта 21-74-10034.

Библиографический список

1. Pelgrift R. Y., Friedman A. J. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance //Advanced drug delivery reviews. – 2013. – Т. 65. – №. 13-14. – С. 1803-1815.
2. Ventola C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats //Pharmacy and therapeutics. – 2015. – Т. 40. – №. 4. – С. 277.
3. Blecher K., Nasir A., Friedman A. The growing role of nanotechnology in combating infectious disease //Virulence. – 2011. – Т. 2. – №. 5. – С. 395-401.
4. Teixeira G. L. et al. Sapucaia nut (*Lecythis pisonis* Cambess.) flour as a new industrial ingredient: Physicochemical, thermal, and functional properties //Food Research International. – 2018. – Т. 109. – С. 572-582.
5. Huh A. J., Kwon Y. J. “Nanoantibiotics”: a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era //Journal of controlled release. – 2011. – Т. 156. – №. 2. – С. 128-145.
6. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays //Journal of immunological methods. – 1983. – Т. 65. – №. 1-2. – С. 55-63.

ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КЛЕТОК *ESCHERICHIA COLI* С ВЫСОКОЙ ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Сагидуллина В.И.¹, Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Исследовано влияние условий культивирования (рН среды, время культивирования, интенсивность перемешивания) на лизиндекарбоксилазную активность в экстрактах клеток природных изолятов *Escherichia coli*. Получены экстракты клеток природного изолята *Escherichia coli* N48, обладающие высокой лизиндекарбоксилазной активностью.

Ключевые слова: 1,5-диаминопентан, кадаверин, лизиндекарбоксилаза, фермент, биокатализатор.

PREPARATION OF EXTRACTS WITH HIGH LYSINE DECARBOXYLASE ACTIVITY FROM *ESCHERICHIA COLI* CELLS

Sagidullina V. I.¹, Akhova A. V.^{1,2}, Tkachenko A. G.²

¹Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

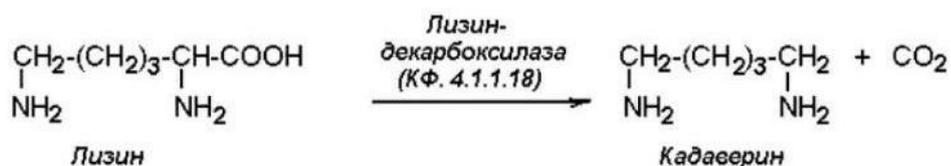
²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russia

Abstract. The effect of cultivation conditions, such as pH of the medium, cultivation time, and stirring intensity, on lysine decarboxylase activity in cell extracts of natural *Escherichia coli* isolates was studied. The optimal conditions for obtaining the highest lysine decarboxylase activity were selected.

Keywords: 1,5-diaminopentane, cadaverine, lysine decarboxylase, enzyme, biocatalyst.

Полиамины – алифатические, по большей части линейные, поликатионные соединения, содержащие в основном от 2 до 4 аминогрупп, которые присутствуют у всех форм организмов. Полиамины принимают участие в синтезе дезоксирибонуклеиновой кислоты, рибонуклеиновой кислоты и белка, а также в клеточном делении [1]. Кроме того, полиамины способствуют борьбе бактериальных клеток с различными видами стресса, такими как, воздействие активных форм кислорода (АФК), ультрафиолета (УФ), нагревания [2]. Таким образом, полиамины играют важную физиологическую роль для живых организмов, но их специфические функции полностью не изучены. Клетки *Escherichia coli* продуцируют пугресцин (1,4-диаминобутан), спермидин (N-(3-аминопропил)-1,4-диаминобутан) и кадаверин (1,5-диаминопентан) [1].

Кадаверин образуется при ферментативном декарбоксилировании L-лизина при участии фермента – лизиндекарбоксилазы [3].



Кадаверин продуцируется только клетками растений и бактерий [2].

В клетках *Escherichia coli* в синтезе 1,5-диаминопентана принимают участие два типа лизиндекарбоксилаз: конститутивная LdcC и индуцибельная CadA. Несмотря на то, что конститутивная и индуцибельная лизиндекарбоксилазы имеют на 68% одинаковые аминокислотные последовательности, максимальная активность каждой изоформы достигается при разных значениях pH. Максимальная активность LdcC проявляется при pH, равном 7,5, а оптимальный pH для достижения максимальной активности CadA равен 5,5 [3]. Для проявления лизиндекарбоксилазной активности ферменту необходим кофактор – пиридоксальфосфат [1].

Широкие перспективы применения полиаминов обуславливают их практическое значение для человека. К примеру, 1,5-диаминопентан является мономером полиамидов PA 5X. При сополимеризации кадаверина с янтарной кислотой, адипиновой кислотой и себациновой кислотой могут быть получены полиамиды PA 5.4, PA 5.6 и PA 5.10 соответственно [3, 4]. Полиамиды PA 5X обладают высокой прочностью, высокой температурой плавления, высокой ударной вязкостью, устойчивостью к действию органических растворителей и низкой плотностью. Область их применения различна: машиностроение, производство промышленных деталей, текстильная промышленность, производство упаковочных материалов, поскольку такие пластмассы легки, прозрачны и, вместе с тем, прочны [3]. На сегодняшний день промышленное производство полиамидов основано на химическом синтезе, требующем дорогостоящих каталитических систем и реагентов, невозобновляемых источников сырья, а именно нефтепродуктов, дорогостоящей и стойкой к агрессивным условиям аппаратуры [5]. Такая технология нецелесообразна с экологической и экономической точки зрения, что наводит на мысль о поиске альтернативных способов решения. Поиск эффективного и безопасного способа решения проблемы требует привлечения биотехнологии, которая предлагает способы производства мономеров из возобновляемого биологического сырья на основе использования цельных клеток или выделенных ферментов.

В настоящее время биотехнологический способ получения 1,5-диаминопентана основан на использовании цельных клеток микроорганизмов-продуцентов в качестве биокатализаторов или выделенных ферментов синтеза кадаверина [6]. Однако в качестве основы для разработки биокатализаторов используют узкий круг лабораторных штаммов или генетически-модифицированных штаммов, полученных с применением генно-инженерных технологий, защищенных авторским правом, что ограничивает возможности развития данного направления. В связи с этим, поиск продуцентов высокоактивных лизиндекарбоксилаз среди природных микроорганизмов является весьма актуальной задачей. Поскольку отечественные аналоги таких разработок отсутствуют, необходимо оценить способность микроорганизмов продуцировать 1,5-диаминопентан и подобрать оптимальные условия культивирования, наиболее способствующие биосинтезу фермента лизиндекарбоксилазы.

Целью данного исследования является подбор условий культивирования клеток *E. coli* для получения бесклеточных экстрактов с высокой лизиндекарбоксилазной активностью.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов данного исследования использованы природные изоляты *E. coli*, сверхпродуценты 1,5-диаминопентана, выделенные от животных фермерских хозяйств Пермского края.

Бактериальные клетки культивировали в колбах Эрленмейера, содержащих 40 мл бульона LB, при T=37°C. Клетки, сохраняемые на скошенном агаре LB, переносили в бульон LB (рН 7,4), культивировали 16-18 ч и использовали в качестве инокулята, внося в свежую питательную среду в соотношении 1:50. В зависимости от задач варьировали рН среды культивирования (5,0 или 7,4) и интенсивность перемешивания (0, 100 или 200 оборотов/мин). Культивирование проводили в термостате или водном термостатируемом шейкере GFL-1092 (GFL, Германия).

Бесклеточные экстракты получали методом ультразвуковой обработки по разработанной ранее методике [7]. Количественное определение белка проводили по методу Лоури [8].

Активность лизиндекарбоксилазы определяли при рН реакционной смеси равной 5,5 или 7,5 по количеству нмоль 1,5-диаминопентана, образуемого 1 мг белка в минуту. Для определения концентрации образующихся в реакционной смеси полиаминов проводили их дериватизацию дансилхлоридом. В микропробирках объёмом 2 мл смешивали раствор пробы, дансил хлорида и карбоната натрия. Дериватизацию дансил-хлоридом проводили на протяжении 2 часов в термостате при T=37°C. По окончании реакции смесь выпаривали и экстрагировали бензолом. Далее проводили тонкослойную хроматографию дансил-полиаминов, высушивали хроматограммы и фотографировали в ультрафиолетовом свете, возбуждающем свечение пятен дансил-полиаминов сине-зелёного цвета, величина и яркость которых пропорциональны их концентрации. Количественный анализ полиаминов проводили методом внешнего стандарта [9].

Результаты и их обсуждение

В нашем предыдущем исследовании было проанализировано 60 природных изолятов *E. coli* на способность продуцировать 1,5-диаминопентан, из которых отобрано 3 (N20, N48 и N50), обладающих высокоактивными лизиндекарбоксилазами [10]. Предметом исследования данной работы является подбор условий культивирования, обеспечивающих высокий уровень биосинтеза и активности лизиндекарбоксилазы. Изучено влияние рН среды культивирования и интенсивности перемешивания/аэрации на активность лизиндекарбоксилаз в бактериальных клетках, а также ее зависимость от продолжительности культивирования/фазы роста периодической культуры.

Для оценки влияния рН среды культивирования на лизиндекарбоксилазную активность природные изоляты *E. coli* культивировали при рН среды 7,4 и при рН среды 5,0 без перемешивания в течение 3 часов, что соответствовало экспоненциальной фазе роста. Экстракты клеток, выращенных при рН среды 5,0, обладали большей активностью по сравнению с экстрактами клеток, выращенных в нейтральной среде. Максимальная лизиндекарбоксилазная активность была достигнута в экстрактах клеток изолята N48, выращенного при культивировании в кислой среде.

Для оценки лизиндекарбоксилазной активности экстрактов, полученных на разных стадиях роста, природные изоляты *E. coli* культивировали в среде с рН 7,4 или 5,0 без

перемешивания в течение 3, 6 и 18 часов, что соответствовало фазе активного роста, переходу к стационарной фазе роста и стационарной фазе роста. Активность индуцибельной лизиндекарбоксилазы в экстрактах, полученных из клеток трех изолятов, была выше на первых этапах культивирования и снижалась по мере приближения к стационарной фазе роста. Активность конститутивной изоформы в экстрактах изолятов N20 и N50 также снижалась по мере движения от экспоненциальной к поздней стационарной фазе роста. Напротив, для N48 наибольшая ферментативная активность наблюдалась в экстрактах, полученных из клеток культуры в стационарной фазе роста.

После оптимизации параметров pH среды культивирования и времени культивирования было исследовано влияние перемешивания/аэрации на лизиндекарбоксилазную активность в экстрактах клеток *E. coli* N48. Для оценки влияния перемешивания на лизиндекарбоксилазную активность экстрактов клетки культивировали в среде с pH 7,4 в течение 18 часов, что соответствовало стационарной фазе роста, без перемешивания, при перемешивании со скоростью 100 об/мин и 200 об/мин. Перемешивание со скоростью 100 об/мин приводило к снижению, а перемешивание со скоростью 200 об/мин к незначительному повышению активности индуцибельной лизиндекарбоксилазы в сравнении с культивированием без перемешивания. Активность конститутивной изоформы фермента была одинакова в экстрактах, полученных из клеток, выращенных при перемешивании со скоростью 0 об/мин и 200 об/мин, и выше по сравнению с экстрактами клеток, выращенных при 100 об/мин.

Заключение

Подобраны оптимальные условия культивирования клеток *E. coli* с целью получения бесклеточных экстрактов с высокой лизиндекарбоксилазной активностью. Культивирование клеток *E. coli* N48 в среде с pH 7,4 в течение 18 часов без перемешивания способствует активации конститутивной формы лизиндекарбоксилазы. Высокая активность индуцибельной формы лизиндекарбоксилазы достигалась в бесклеточных экстрактах *E. coli* N48, выращенных в среде с pH 5,0 в течение 3 часов при перемешивании со скоростью 200 об/мин.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Tabor C.W., Tabor H. Polyamines in microorganisms // *Microbiological Reviews*. – 1985. – V. 49. – P. 81-99.
2. Rhee H.J., Kim E.-J., Lee J.K. Physiological polyamines: simple primordial stress molecules // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – V. 11. – № 4. – P. 685-703.
3. Ma W., Chen K., Li Y, Hao N., Wang X., Ouyang P. Advances in cadaverine bacterial production and its applications // *Engineering*. – 2017. – V. 3. – P. 308-317.
4. Qian Z.X., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of cadaverine: a five-carbon diamine // *Biotechnology and Bioengineering*. – 2011. – V. 108. – № 1. – P. 93-103.
5. Chung H., Yang J.E., Ha J.Y., Chae T.U., Shin J.H., Gustavsson M., Lee S.Y. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganism // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2015. – V. 36. – P. 73-84.
6. de Carvalho C. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes // *Biotechnol Adv.* – 2011. – V. 29. – № 1. – P. 75-83.

7. Ахова А.В., Сагидуллина В.И., Хасанова Р.А., Ткаченко А.Г. Применение ультразвуковой дезинтеграции для выделения лизиндекарбоксилаз из клеток *Escherichia coli* // Вестник ПНИПУ. – 2021. – №2. – С. 7-16.
8. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193. – № 1. – P. 265-275.
9. Чудинов А.А., Чудинова Л.А., Коробов В.П. Метод определения низкомолекулярных олигоаминов в различном биологическом материале // Вопросы медицинской химии. – 1984. – № 4. – С. 127-132.
10. Сагидуллина В.И., Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Поиск бактерий-продуцентов 1,5-диаминопентана // Химия. Экология. Урбанистика. – 2021. – №2. – С. 177-181.

МОДУЛЯЦИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТА *RHAPONTICUM CARTHAMOIDES*

Самойлова З.Ю., Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия*

Аннотация. Представлены результаты исследования биологической активности коммерческого препарата левзеи сафлоровидной с помощью микробных тест-систем. Показано двухкратное защитное действие испытуемого экстракта на скорость роста культур *Escherichia coli* BW25113 в присутствии 2мм H₂O₂. Выявлено отрицательное влияние экстракта на показатель валового биопленкообразования, что не было связано с модуляцией продукции матрикса биопленок, курлей, подвижностью и изменением колониеобразующей способности клеток.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, микробные тест-системы, фенольные соединения, антиоксиданты, биопленки.

MODULATION OF BIOFILM FORMATION OF INTESTINAL BACTERIA UNDER THE ACTION OF RHAPONTICUM CARTHAMOIDES EXTRACT

Samoilova Z.Yu., Sutormina L.V., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

*Federal State Budgetary Institution Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural
Branch of the Russian Academy of Sciences – branch of the PFRC, Ural Branch of the Russian
Academy of Sciences, Perm, Russia*

Abstract. The results of a study of the biological activity of a commercial preparation of *Leuzea safflower-like* using microbial test systems are presented. A two-fold protective effect of the test extract on the growth rate of *Escherichia coli* BW25113 cultures in the presence of 2 mm H₂O₂ was shown. A negative effect of the extract on the indicator of gross biofilm formation was revealed, which was not associated with the modulation of biofilm matrix production, curls, mobility and changes in the colony-forming ability of cells.

Keywords: *Escherichia coli*, microbial test systems, phenolic compounds, antioxidants, biofilms.

Травянистое растение левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides*) выращивается как медонос, является источником лекарственного сырья, а также относится к перспективным кормовым культурам. Из широкого спектра биологических активностей у левзеи отмечают адаптогенное и антиоксидантное действие, обусловленные высоким содержанием экидистерона и фенольных соединений. Богатые фенольными соединениями экстракты растений находят широкое применение в официальной и народной медицине. Во многих случаях их высокую биологическую активность связывают с непрямыми антиоксидантными эффектами, когда основным объектом воздействия становится микрофлора кишечника [1].

Считается, что посредством модуляции активности кишечных бактерий происходит настройка обмена веществ макроорганизма [2,3].

Целью настоящей работы явилось исследование влияния экстракта левзеи сафлоровидной на биоупленкообразование непатогенного модельного штамма *Escherichia coli* BW25113.

Экстракт травы левзеи сафлоровидной сухой водорастворимый был предоставлен Пермским НИИСХ – ООО «Тенториум». Действующая доза в опытах составила 300 мкг сухого вещества/мл.

Выращивание бактериальных культур проводили в 96-луночных полистироловых планшетах со средой М9 с добавлением 4 г/л глюкозы при температуре 37°C. Изменения оптической плотности оценивали с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ (Bio-Rad, США) через 22 часа инкубации. Интенсивность биоупленкообразования оценивали с помощью окрашивания генцианвиолетом [4,5]. Антиоксидантные свойства *in vitro* (способность связывать свободные радикалы в тесте с DPPH и подавлять их образование в реакциях типа Фентона за счет хелатирования ионов Fe²⁺ в тесте с феррозином) измеряли согласно [6,7], в качестве стандартов используя антиоксидант тролокс (аналог витамина E) и хелатор железа дипиридил. Эффективность указанных параметров оценивали по величинам IC₅₀ и EC₅₀ (мг/мл), обозначающим дозу экстракта, при которой происходило связывание 50% свободных радикалов или ионов Fe²⁺, соответственно. Таким образом, чем меньше значения IC₅₀ и EC₅₀, тем выше антиоксидантные свойства экстракта *in vitro* по сравнению со стандартами. Общее содержание полифенолов определяли по [8]. Антиоксидантное действие экстракта в растущих бактериальных культурах оценивали по изменению удельной скорости роста после добавления 2мМ перекиси водорода. До добавления оксиданта, культуры инкубировались с экстрактом в течение 1 часа, после чего добавляли H₂O₂ и отслеживали изменения оптической плотности культур каждые 15 мин в течение 2 часов. Экспериментальные данные обрабатывали, вычисляя стандартную ошибку и доверительный интервал. Каждый результат показан как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Достоверность различий оценивали согласно *t*-критерию Стьюдента, различия считались значимыми при *p* < 0,05. Символом * обозначены статистически достоверные различия между образцом и контролем.

Таблица – Антиоксидантные свойства *in vitro*, общее содержание полифенолов в испытуемом экстракте левзеи сафлоровидной

	Общее содержание полифенолов, мг-экв галловой кислоты / г сухого вещества	IC ₅₀ , мг/мл	EC ₅₀ , мг/мл
экстракт	54,8 ± 1,1	18,12 ± 0,61	6,17 ± 0,1
тролокс	0	2,53 ± 0,75	0
дипиридил	0	0	0,19 ± 0,004

Согласно нашим данным, представленным в таблице, испытуемый экстракт обладал способностью в 7 раз менее эффективно связывать свободные радикалы по сравнению со стандартным антиоксидантом тролоксом в тесте с DPPH. При этом способность подавлять образование радикалов в реакциях типа Фентона за счет хелатирования ионов Fe²⁺ у экстракта

была выражена в 32 раза слабее по сравнению со стандартным хелатором ионов Fe^{2+} дипиридиллом.

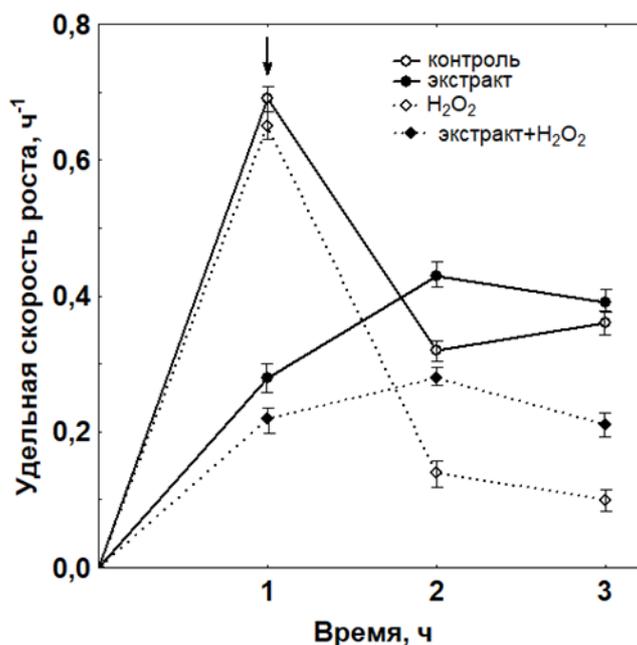


Рисунок 1 – Антиоксидантные эффекты испытуемого экстракта на растущие культуры *E. coli* BW25113 при действии 2мМ пероксида водорода. Время добавления оксиданта обозначено стрелкой.

На рисунке 1 можно видеть, что инкубация бактериальных культур с экстрактом в течение часа приводила к снижению удельной скорости роста в 2,5 раза по сравнению с необработанной культурой ($0,28 \pm 0,03$ и $0,69 \pm 0,06$ $ч^{-1}$, соответственно). При этом, в случае последующего добавления 2мМ перекиси водорода необработанные культуры демонстрировали падение скорости роста до $0,14 \pm 0,01$ $ч^{-1}$. А в культурах, обработанных экстрактом, скорость роста была приблизительно в два раза выше. Таким образом, нами было показано антиоксидантное действие экстракта на растущие бактериальные культуры. По-видимому, наблюдаемый защитный эффект от действия перекиси водорода был связан с замедлением роста во время предобработки экстрактом, что вполне согласуется с ранее опубликованными работами разных научных коллективов о том, что снижение скорости роста повышает устойчивость к стрессовым факторам [9,10].

В отдельной серии опытов нами было исследовано влияние экстракта на биопленкообразование. Как показано на рисунке 2, через 22 часа инкубации с испытуемым экстрактом валовое биопленкообразование достоверно снижалось в 1,5 раза по сравнению с необработанными культурами. При этом, оптическая плотность планктонных культур над поверхностью биопленок отличалась незначительно и составила $0,373 \pm 0,005$ и $0,320 \pm 0,014$ в контроле и обработанных экстрактами культурах, соответственно. Инкубация с испытуемым экстрактом не влияла на подвижность и продукцию курлей у бактериальных клеток. В тестах на агаре с конго красным выявлен гладкий розовый морфотип колоний, что указывает на производство целлюлозы как основного компонента матрикса биопленок как в контроле, так и в присутствии испытуемого экстракта.

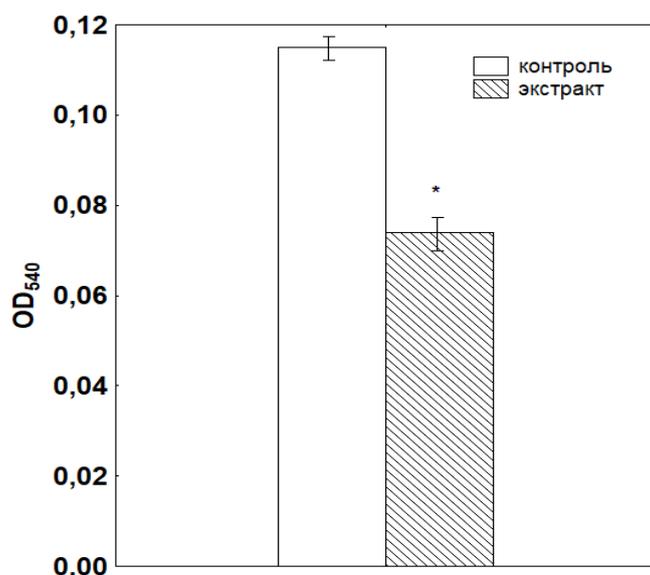


Рисунок 2 – Влияние испытуемого экстракта на валовое биопленкообразование (OD₅₄₀) в культурах *E. coli* BW25113.

Присутствие экстракта левзеи в течение 22 часов инкубации приводило к повышению числа колониобразующих единиц (КОЕ) в 1,75 раза в планктонных культурах, но не оказывало достоверного влияния на количество КОЕ в составе биопленок.

Таким образом, коммерческий экстракт левзеи проявлял выраженные биологические эффекты на модельный штамм *E. coli* BW25113, которые заключались в снижении скорости роста, повышении устойчивости к окислительному стрессу и ингибировании биопленкообразования. Механизмы наблюдаемых эффектов нуждаются в дальнейшем исследовании.

С практической точки зрения, полученные данные указывают на способность экстракта левзеи модулировать активность кишечной микрофлоры за счет антиоксидантного действия. Обнаруженное замедление скорости роста бактериальных культур в присутствии экстракта левзеи может препятствовать колонизации кишечника болезнетворными организмами.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119112290009-1, а также поддержана грантом РФФИ-Урал 19-44-590009.

Библиографический список

1. Kawabata K., Yoshioka Y., Terao J. Role of Intestinal Microbiota in the Bioavailability and Physiological Functions of Dietary Polyphenols // *Molecules*. – 2019. – V.24(2). – P.370.
2. Espín J.C., González-Sarrías A., Tomás-Barberán F.A. The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols // *Biochem Pharmacol*. – 2017. – V.139. – P.82-93.
3. Ozdal N., Sela D.A., Xiao, J, Boyacioglu D., Chen F., Capanoglu E. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility // *Nutrients*. – 2016. – V.8(2). – P.78.
4. O’Toole G.A., Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis // *Mol. Microbiol*. – 1998. – V.28. – P.449-461.

5. Naves P., del Prado G., Huelves L., Gracia M., Rui, V., Blanco J., Rodríguez-Cerrato V.; Ponte M.C., Soriano F. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent // J. Appl. Microbiol. – 2008. – V.105. – P.585-590.
6. Shyur L.-F., Tsung J.-H., Chen J.-H., Chiu C.-Y., Lo C.-P. Antioxidant properties of extracts from medicinal plants popularly used in Taiwan // Int. J. Appl. Sci. Eng. – 2005. – V. 3. – P.195-202.
7. Kim H.-J., Chen F., Wang X., Chung H.Y., Jin, Z. Evaluation of antioxidant activity of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.) oil and identification of its antioxidant constituents // J. Agric. Food Chem. – 2005. – V. 53. – P.7691-7695.
8. Wu L.-C., Hsu H.-W., Chen Y.-C., Chin C.-C., Lin Y.-I., Ho J.A. Antioxidant and antiproliferative activities of red pitaya // Food Chem. – 2006. – V.95. – P.319-327.
9. Gilbert P., Collier P.J., Brown M.R.W. Influence of growth rate on susceptibility to antimicrobial agents: biofilms, cell cycle, dormancy, and stringent response // Antimicrob Agents Chemother. – 1990. – V.34 (10). – P.1865-1868.
10. Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N. Relationship between *Escherichia coli* growth rate and bacterial susceptibility to ciprofloxacin // FEMS Microbiol Lett. – 2018. – 365:fnx 254.

АДАПТАЦИИ КЛЕТОК *RHODOCOCCLUS CERASTII* ИЭГМ 1243 НА МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНОМ УРОВНЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИБУПРОФЕНА

Субботина М.В.^{1,2}, Тюмина Е.А.^{1,2}, Бажутин Г.А.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Понимание природы адаптивных реакций клеток *Rhodococcus cerastii*, вызванных присутствием в среде ибупрофена, позволяет определить основные химические внутриклеточные события, обуславливающие способность родококков к катаболизму лекарств. Знание бактериальных механизмов деструкции НПВП послужит заделом для создания наиболее подходящих условий *in vitro*, а в дальнейшем и *in situ* для высокоэффективной очистки воды от фармацевтических загрязнителей.

Ключевые слова: флюоресцентная микроскопия, биodeградация, ибупрофен, *Rhodococcus cerastii*.

CELL ADAPTATIONS *RHODOCOCCLUS CERASTII* ИЭГМ 1243 AT THE MOLECULAR STRUCTURAL LEVEL UNDER THE INFLUENCE OF IBUPROFEN

Subbotina M. V.^{1,2}, Tyumina E. A.^{1,2}, Bazhutin G. A.^{1,2}

¹Department of Microbiology and Immunology, Perm State National Research University, Perm, Russia

²Perm Federal Research Center Ural Branch Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. Understanding the nature of the adaptive reactions of *Rhodococcus cerastii* cells caused by the presence of ibuprofen in the medium makes it possible to determine the main chemical intracellular events that determine the ability of *Rhodococcus* to catabolize drugs. Knowledge of the bacterial degradation mechanisms of NSAIDs will serve as a basis for creating the most suitable conditions *in vitro*, and later *in situ* for highly efficient water purification from pharmaceutical contaminants.

Keywords: fluorescence microscopy, biodegradation, ibuprofen, *Rhodococcus cerastii*.

Проблема медикаментозного загрязнения водных ресурсов чрезвычайно актуальна и требует решения в новых условиях, сложившихся на фоне устранения последствий covid. [1–3]. Одной из основных причин глобального медикаментозного загрязнения является прогресс в медицине и фармакологии. Развитие этих отраслей способствует росту средней продолжительности жизни людей в различных регионах планеты, и пока не изобретены эффективные и экологически чистые препараты нового поколения, улучшение здоровья

населения будет осуществляться за счет всеобщей доступности уже существующих лекарств, посредством наращивания их объемов производства и сбыта населению [4]. Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) – одни из наиболее часто детектируемых в водной среде лекарственных веществ [5–7]. Среди НПВП в контексте водного загрязнения выделяются ибупрофен – третье по популярности безрецептурное лекарство в мире после ацетилсалициловой кислоты и парацетамола, которое назначают в качестве жаропонижающего, анальгезирующего и/или противовоспалительного средства [8].

Ибупрофен повсеместно встречается в поверхностных, грунтовых и очищенных сточных водах в концентрациях от нескольких нг/л до 6000 мкг/л, а также регулярно обнаруживается в образцах питьевой воды [5,9]. Сегодня документально подтверждено токсическое воздействие данного фармполлутанта на позвоночных и беспозвоночных животных, микроводоросли, а также бактериальные консорциумы [6]. Существенную угрозу нормальному развитию и функционированию живых организмов представляет, как ибупрофен, так и продукты его фото-распада [10]. В связи с этим научное сообщество озабочено поисками безопасных путей очистки водных ресурсов от фармполлутантов, в том числе ибупрофена.

В настоящем исследовании в качестве потенциального метода борьбы с лекарственным загрязнением рассматривается бактериальная деструкция. Объектом для исследований выбран штамм *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243, характеризующийся (по результатам предыдущих экспериментов) высокой деструктивной способностью в отношении ибупрофена [11]. Задача данного исследования – выяснить, как адаптируются бактериальные клетки к воздействию экотоксиканта на молекулярном уровне.

Для достижения цели была поставлена серия экспериментов с помощью флуоресцентной микроскопии. В качестве посевного материала использовали штамм *R. cerastii* ИЭГМ 1243 (GenBank # MZ234149) из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (официальный акроним ИЭГМ, номер Уникальной научной установки 73559, номер 285 во Всемирной федерации коллекции культур, <http://www.iegmc.ru>). В качестве инокулята использовали родококки, предварительно выращенные в мясопептонном бульоне (МПБ), которые вносили в среду культивирования до конечной оптической плотности OP_{600} 0,2, что соответствует 1×10^7 КОЕ/мл. В работе использовали модифицированную минеральную среду “К”, в которой вместо KNO_3 применён аммонийный нитрат. Ибупрофен вносили в концентрации 0,1 и 0,2 г/л, смесь ибупрофена и кетопрофена – в концентрации 0,1 г/л каждого, глюкозу – в концентрации 0,1 г/л. Коктейль из ибупрофена и кетопрофена использовали для изучения адаптивной клеточной реакции родококков в среде сразу с двумя токсикантами. Культивирование проводилось в летний период при температуре 28°C без доступа света.

Клетки визуализировали в режиме флуоресцентного микроскопирования с помощью микроскопа Axio Imager m.2 (Zeiss, Германия) с использованием цифровой системы ввода изображения PRO-150ES (Pixera, США). Для окрашивания липидов использовали краситель Нильский красный (Nile Red), белков – SYPRO Ruby, внеклеточных полисахаридов – Calcofluor White Stain. Для оценки изменения формы клеток, а также выявления выделяемых клетками веществ использовали метод фазово-контрастной микроскопии.

Окрашивание проводилось на 0-е, 1-е, 2-е и 3-и сутки. В образцах с повышением концентрации ибупрофена наблюдалось усиление образования макроскопических компактных многоклеточных агрегатов (рис. 1), а также наиболее выраженная продукция полисахаридов (рис. 2).

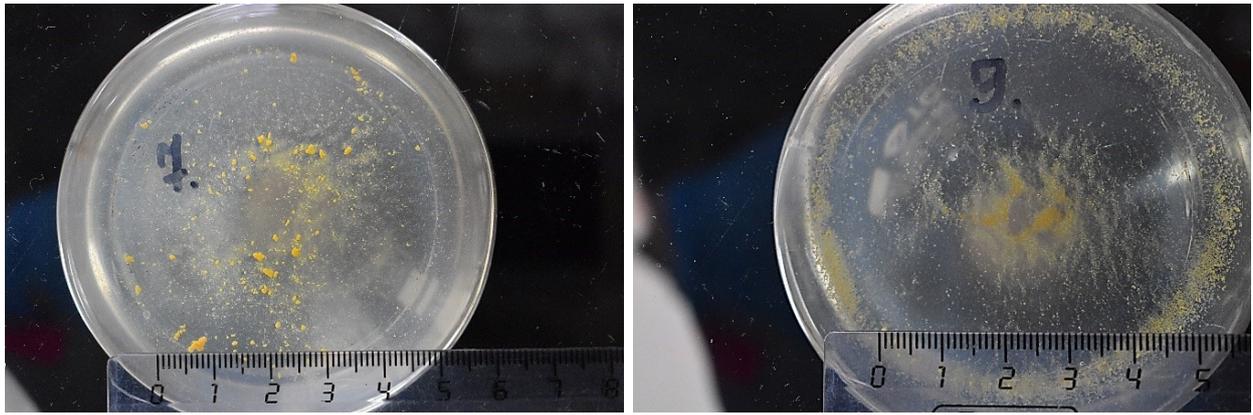


Рисунок 1 – Вид клеточных агрегатов на 3-и сутки культивирования *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в присутствии 0,2 г/л ибупрофена.

Динамику изменений содержания веществ можно отследить на графиках, представленных на рисунке 2. При микроскопии образцов со смесью ибупрофена и кетопрофена после 29 и 48 часов культивирования отмечены плотные клеточные микроагрегаты, покрытые гидрофобной массой (рис. 3). Также во всех образцах с НПВП отмечена тенденция к накоплению липидов и с течением времени к выделению их на поверхность клеточной стенки.

В этих же образцах в первые сутки культивирования родококков зафиксирована интенсивная продукция белковых молекул. Следует особо отметить, что во всех образцах наблюдалось более выраженное производство определяемых соединений в микроагрегатах в сравнении со свободными клетками. На 3-и сутки во всех образцах, в том числе в контролях, присутствовал внеклеточный матрикс в той или иной степени, который не дал окрашивания на липиды и полисахариды, но окрасился красителем для белковых структур.

По нашим данным, увеличение продукции полисахаридов становится причиной усиленной клеточной агрегации, что можно рассматривать как защитный механизм при повышении содержания в среде фармполлутанта [12]. При возрастании стрессовой нагрузки, например, при добавлении кетопрофена и ибупрофена, образуются гидрофобные клеточные микроагрегаты и увеличивается не только содержание полисахаридов, но и липидов.

Стрессовым фактором выступала, по-видимому, и повышенная температура, что могло вызвать активность сигма-фактора σ^{24} экстрацитоплазматического теплового стресса (по данным NCBI, у представителей *R. cerastii* обнаружены гены, кодирующие σ^{24}) и стать причиной гомеовязкостной адаптации за счет усиления продукции липидов и обогащения ими клеточной стенки. В ранних исследованиях при температуре оптимального роста *R. cerastii* ИЭГМ 1243 в среде с ибупрофеном нами так же была выявлена аккумуляция липидных включений [11]. Изменение содержания белковых молекул может быть связано с необходимостью синтеза полисахаридов и/или липидов в стрессовых условиях.

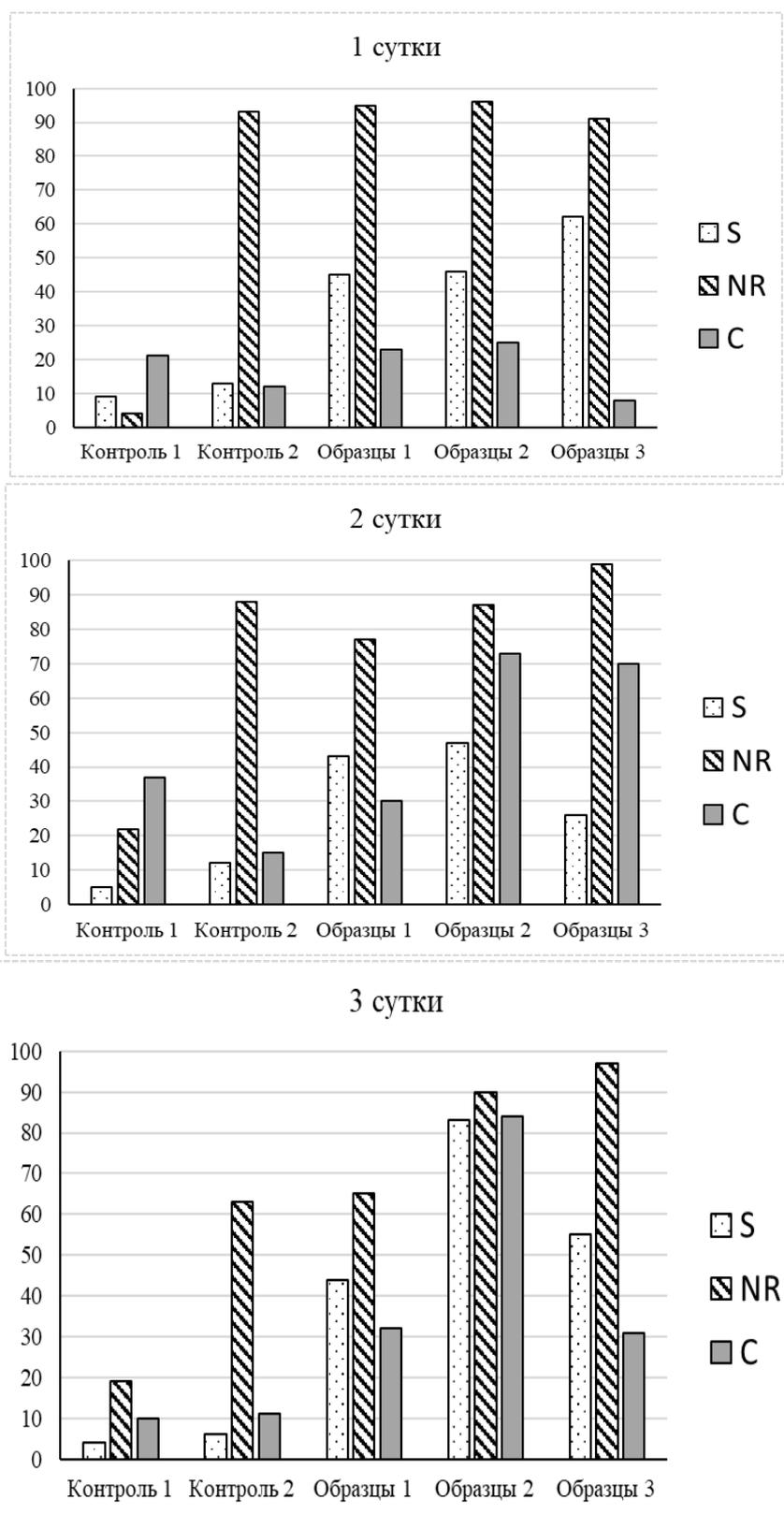


Рисунок 2 – Процент окрашенных клеток на 1-е, 2-е и 3-и сутки культивирования *R. cerastii* ИЭГМ 1243. Сокращенные названия красителей: S – SYPRO Ruby; NR – Nile Red; C – Calcofluor White Stain. Содержание веществ в среде культивирования с глюкозой: Контроль 1 – 0,1 г/л глюкоза; Контроль 2 – 10 мкл *n*-гексадекана; Образцы 1 – 10 мкл *n*-гексадекана и 0,1 г/л ибупрофена; Образцы 2 – 10 мкл *n*-гексадекана и 0,2 г/л ибупрофена; Образцы 3 – 10 мкл *n*-гексадекана, 0,1 г/л ибупрофена и 0,1 г/л кетопрофена.

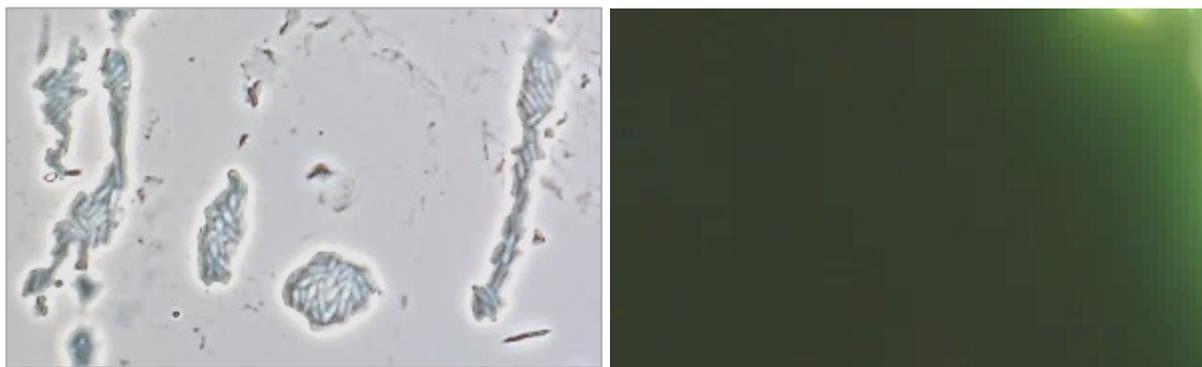


Рисунок 3 – Фазово-контрастная и флюоресцентная (окрашивание Nile Red) микроскопия образцов со смесью кетопрофена и ибупрофена после 48 часов культивирования *R. cerastii* ИЭГМ 1243.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 21-14-00132 «Исследование специфических особенностей взаимодействия «фармполлютант-микроорганизм» и оценка эффективности защитных реакций бактериальной клетки в ответ на воздействие фармполлютантов», <https://rscf.ru/project/21-14-00132>.

Библиографический список

1. Wojcieszynska D., Guzik H., Guzik U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the era of the Covid-19 pandemic in the context of the human and the environment // *Sci. Total Environ.* – 2022. –V. 834.
2. Petrie B., Camacho-Muñoz D. Analysis, fate and toxicity of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters and the environment: a review // *Environ. Chem. Lett.*– 2020.–V. 19.–P. 43–75.
3. Domingo-Echaburu S. et al. Drug pollution & Sustainable Development Goals // *Sci. Total Environ.*–2021.–V. 800.–№149412.
4. Mezzelani M., Gorbi S., Regoli F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms // *Mar. Environ. Res.*– 2018.–V.– 140.–P. 41–60.
5. Тюмина Е.А. и др. Нестероидные противовоспалительные средства как разновидность эмерджентных загрязнителей // *Микробиология.* – 2020–V. 89.–№ 2.–P. 152–168.
6. Parolini M. Toxicity of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) acetylsalicylic acid, paracetamol, diclofenac, ibuprofen and naproxen towards freshwater invertebrates: a review // *Sci. Total Environ.*–2020.–V. 740.
7. Rastogi A., Tiwari M.K., Ghangrekar M.M. A review on environmental occurrence, toxicity and microbial degradation of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) // *J. Environ. Manage.* –2021.–V. 300.–№ 113694.
8. Marchlewicz A., Guzik U., Wojcieszynska D. Over-the-counter monocyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs in environment – sources, risks, biodegradation // *Water Air Soil Pollut.*– 2015.–V. 226.–№ 10.–P. 1–13.
9. aus der Beek T. et al. Pharmaceuticals in the environment – Global occurrences and perspectives // *Environ. Toxicol. Chem.*–2016.–V. 35.–№ 4.–P. 823–835.

10. Ellepola N. et al. A toxicological study on photo-degradation products of environmental ibuprofen: Ecological and human health implications // *Ecotoxicol. Environ. Saf.*–2020.–V. 188.–№ 109892.
11. Субботина М.В., Бажутин Г.А., Ившина И.Б. Особенности биодеструкции ибупрофена клетками *Rhodococcus cerastii* ИЭГМ 1243 // Сб. матер. науч. конф. с междунар. уч. “Фундаментальные и прикладные аспекты биоинформатики, биотехнологии и недропользования”.–Пермь.–18–20 октября 2021.–С. 132–134.
12. Ившина И.Б. и др. Углекислородокисляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов // Атлас-монография.–УрО РАН.–2021. – 140 с.

ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* С ЦЕЛЬЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ КАДАВЕРИНА

Ташкинова П.А.¹, Ахова А.В.^{1,2}, Ткаченко А.Г.²

¹Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

Аннотация. В статье приведены данные по подбору условий культивирования природных изолятов *E. coli* с целью повышения эффективности конверсии лизина в 1,5-диаминопентан, который является сырьем для синтеза биополиамидов, востребованных в различных отраслях промышленности. Оценка способности природных изолятов продуцировать кадаверин в зависимости от состава среды культивирования была дана в сравнении со штаммом *E. coli* K12. В работе исследованы минимальная среда M9, бульон LB, 0,9% раствор NaCl, а также влияние pH среды и добавки глюкозы.

Ключевые слова: кадаверин, лизиндекарбоксилаза, лизин, 1,5-диаминопентан.

SELECTION OF CULTIVATION CONDITIONS TO INCREASE THE CADAVERINE PRODUCTION BY NATURAL ISOLATES OF *ESCHERICHIA COLI*

P.A. Tashkinova¹, A.V. Akhova^{1,2}, A.G. Tkachenko².

¹Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russian Federation

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms UB RAS, Perm, Russian Federation

Abstract. The article provides data on the selection of conditions for the *Escherichia coli* natural isolates cultivation with the view to increase the efficiency of the conversion of lysine to 1,5-diaminopentane, which is applied for the synthesis of polyamides required in various industries. The ability of natural isolates to produce cadaverine depending on the composition of the culture medium was assessed in comparison with the laboratory strain K12. The medium M9, LB, 0.9% NaCl solution, and the effect of the pH of the medium and glucose additives were studied.

Keywords: cadaverine, decarboxylase, lysine, 1,5-diaminopentane.

Кадаверин (1,5-диаминопентан) – органическое соединение, состоящее из 5 атомов углерода, с молекулярной формулой $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$. Кадаверин используется в промышленности в качестве сырья для производства пластика, полиамидов, полиуретанов и нейлона. Также кадаверин предлагается использовать в сельском хозяйстве, поскольку его добавка улучшает рост и развитие растений [1, 2]. Но производство кадаверина путем химического синтеза негативно сказывается на состоянии окружающей среды из-за токсичных отходов и использования невозобновляемых ресурсов [3]. Альтернативным способом

получения кадаверина является его биосинтез клетками бактерий, которые можно использовать в качестве цельноклеточных биокатализаторов, либо как источник ферментов.

Содержание кадаверина в клетках является результатом активности ферментов лизиндекарбоксилаз, которые катализируют реакцию декарбоксилирования лизина. У *Escherichia coli* есть два вида лизиндекарбоксилаз: CadA – индуцибельная (биodeградативная) и LdcC – конститутивная (биосинтетическая). Белок LdcC активен в широком диапазоне pH с оптимумом равным 7,6, тогда как для CadA предпочтительными являются кислые условия среды, а оптимальное значение pH равно 5,5. Индукция CadA происходит при культивировании на средах с низким pH, высокой концентрацией субстрата (лизина) в условиях микроаэрации [4, 5].

Цель данного исследования – изучение влияния состава питательной среды культивирования, кислотности среды и добавления глюкозы на продукцию кадаверина клетками *E. coli*.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использован штамм *E. coli* K12, полученный из Всероссийской коллекции микроорганизмов, и 8 природных изолятов *E. coli*, выделенные из разных источников.

Для получения инокулята микроорганизмы, сохраняемые на скошенном агаре, засеивали в 20 мл жидкой среды LB и культивировали в течение 18-20 ч без перемешивания при 37°C. Полученные бактериальные культуры использовали в качестве инокулята для посева в среды, имеющие разный состав, но содержащие 1 г/л лизина. Культивирование проводили в пробирках без перемешивания при 37°C. В начальный момент времени, а также через 2, 6 и 24 ч отбирали пробы для измерения оптической плотности культуры и количественного анализа кадаверина в среде культивирования.

Количественный анализ 1,5-диаминопентана в среде культивирования осуществляли в несколько этапов. Сначала культуру клеток объемом 200 мкл отбирали в микропробирку и центрифугировали 2 мин (16000g). Затем 100 мкл надосадка помещали в чистую микропробирку, в которой содержалось 10 мкл 4N HClO₄, замораживали. Далее проводили дансилирование проб, для этого в плотно закрывающиеся пробирки вносили 50 мкл пробы или стандарта, 50 мкл Na₂CO₃, 100 мкл дансил хлорида. Реакционную смесь инкубировали в темноте 2-3 часа при 37°C, затем смесь выпаривали. Следующий этап – тонкослойная хроматография дансилпроизводных. Полученные хроматограммы фотографировали при различных выдержках в ультрафиолетовом свете, возбуждающем сине-зеленое свечение пятен дансилпроизводных. Расчет концентрации полиаминов проводили методом внешнего стандарта [6].

Результаты и их обсуждение

Оценка способности природных изолятов продуцировать кадаверин была дана в сравнении со штаммом *E. coli* K12.

Реакцию декарбоксилирования лизина с использованием бактериальных клеток в качестве биокатализаторов проводили в средах различного состава: синтетическая минимальная среда M9, бульон LB и 0,9% водный раствор хлорида натрия (физраствор). В целях обеспечить разнообразие сред и более широко изучить влияние их состава, в некоторые среды была добавлена глюкоза (0,4 %) в качестве источника углерода и энергии. Также для изучения влияния кислотности среды, использовались среды с различными значениями pH.

В ходе работы установлено, что кислотный pH среды и добавка глюкозы к минимальной среде и физраствору способствует повышению продукции кадаверина клетками

лабораторного штамма *E. coli* K12. Наиболее высокая скорость продукции кадаверина и максимальные конечные концентрации наблюдались при культивировании в бульоне LB с pH 5,5. В этом случае максимальное количество кадаверина накапливалось за 6 часов реакции, тогда как при культивировании на минимальных средах сходные концентрации кадаверина наблюдались после 24 ч. Содержание кадаверина через 24 часа культивирования было максимально при использовании в качестве среды физраствора с pH 4,0 и добавлением глюкозы.

Закономерности зависимости продуктивности природных изолятов *E. coli* от состава среды культивирования несколько отклонялись от закономерностей характерных для *E. coli* K12. В частности, богатая среда LB оказалась малоприспособленной для протекания реакции биокаталитической трансформации лизина в кадаверин. Тем не менее, основные условия, способствующие повышению продукции 1,5-диаминопентана – добавка глюкозы и снижение pH среды культивирования, были одинаковы для большинства природных изолятов и лабораторного штамма кишечной палочки.

Стоит отметить, что некоторые изоляты, например, №18 и №24, продуцировали значительные количества кадаверина при культивировании на средах с нейтральным pH.

Кроме того, изоляты №50 и №62 были активны в широком диапазоне pH среды (7,4-4,0).

Активность изолята №16 не зависела от присутствия глюкозы. При культивировании на среде M9 с pH 4,0 на 24 час культивирования концентрация кадаверина составила около 6 мМ.

Другие изоляты проявляли большую активность на средах с физраствором в качестве основы. В частности, изолят №50 продуцировал около 5 мМ кадаверина при культивировании на физрастворе с добавкой глюкозы, а изолят №20 производил такое же количество продукта на физрастворе с добавкой глюкозы и соляной кислоты, смещавшей pH до 4,0.

Заключение

Исследована способность природных изолятов *E. coli* осуществлять декарбокислирование лизина с образованием 1,5-диаминопентана в зависимости от состава среды культивирования в сравнении с лабораторным штаммом *E. coli* K12.

Выявлены микроорганизмы способные осуществлять эффективную конверсию лизина в 1,5-диаминопентан при культивировании на минимальных средах, в том числе, без добавки источника углерода и энергии, в широком диапазоне pH.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (АААА-А19-119112290009-1).

Библиографический список

1. Bhatia S.K., Kim Y.H., Kim H.J., Seo H.M., Kim J.H., Song H.S., et al. Biotransformation of lysine into cadaverine using barium alginate-immobilized *Escherichia coli* overexpressing *cadA* // *Bioprocess Biosyst. Eng.* – 2015. – V. 38. – P. 2315-2322.
2. Li M., Li D., Huang Y., Liu M., Wang H., Tang Q., Lu F. Improving the secretion of cadaverine in *Corynebacterium glutamicum* by cadaverine–lysine antiporter // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 41. – P. 701-709.
3. Chung H., Yang J.E., Ha J.Y., Chae T.U., Shin J.H., Gustavsson M., Lee S.Y. Bio-based production of monomers and polymers by metabolically engineered microorganism // *Current Opinion in Biotechnology.* – 2015. – V. 36. – P. 73–84.

4. Auger E., Bennett G. Regulation of lysine decarboxylase activity in *Escherichia coli* K-12 // Archives of Microbiology. – 1989 – V. 151 – №5 – P.466-468.
5. Pomposiello P., Bennik M., Dimple B. Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate // Journal of Bacteriology. – 2001 – V. 183 – №13 – P. 3890-3902.
6. Ахова А.В., Ткаченко А.Г. Роль биосинтеза кадаверина в адаптации *Escherichia coli* к действию пероксида водорода // Прикладная биохимия и микробиология. – 2022. – Т. 58. – № 5. – С. 467-475.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФЛАВОМИЦИНА НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ БИОФИЛЬТРА

Тервонен В.В., Сидорова Н.А.

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия

Аннотация. В статье предоставлены результаты исследования влияния антибиотика флавомицина на жизнедеятельность микрофлоры биофильтра. Исследования проводили в течение 2 месяцев в условиях аквариального эксперимента и установки замкнутого водоснабжения, используемых для выращивания радужной форели, которая получала с кормом и отдельно флавомицин в концентрациях 250 и 500 мг/кг. В эксперименте оценивали морфологическое разнообразие и физиологическую активность гетеротрофных бактерий, энтеробактерий, нитрификаторов, спорогенных анаэробов рода *Clostridium spp.* и микромицетов. Установлено избирательное действие флавомицина на микрофлору биофильтров, которое заключалось в преобладании грампозитивных бактерий в условиях аквариального эксперимента и грамотрицательных – в условиях УЗВ. Также, в условиях аквариального эксперимента отмечено угнетение жизнедеятельности нитрификаторов по мере увеличения концентрации препарата и степени созревания биопленки.

Ключевые слова: антибиотик, биопленка, биофильтр, гетеротрофы, клостридии, нитрификаторы, флавомицин, энтеробактерии.

ASSESSMENT OF THE EFFECT OF FLAVOMYCIN ON THE MORPHOLOGICAL DIVERSITY AND PHYSIOLOGICAL ACTIVITY OF MICROORGANISMS IN THE BIOFILTER BIOFILM

Tervonen V. V., Sidorova N. A.

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

Abstract. The article presents the results of a study of the effect of the antibiotic flavomycin on the vital activity of the biofilter microflora. The morphological diversity and physiological activity of heterotrophic bacteria, enterobacteria, nitrifiers, sporogenic anaerobes of the genus *Clostridium spp* were evaluated in the experiment. and micromycetes. The selective effect of flavomycin on the microflora of biofilters was established, which consisted in the predominance of gram-positive bacteria in the conditions of the aquarium experiment and gram-negative bacteria in the conditions of ultrasound. Also, in the conditions of the aquarium experiment, the inhibition of the vital activity of nitrifiers was noted as the concentration of the drug and the degree of maturation of the biofilm increased.

Keywords: antibiotic, biofilm, biofilter, heterotrophs, clostridia, nitrifiers, flavomycin, enterobacteria.

В аквариумах и установках замкнутого водоснабжения для улучшения качества воды и снижения затрат на её очистку давно и успешно применяются биофильтры [1]. К функциональной составляющей биофильтров относят определенные физиологические группы микроорганизмов, способные окислять органическое вещество, контролировать процессы нитрификации и денитрификации [2]. На активность микробного сообщества биофильтров большое значение оказывают факторы окружающей среды. В аквариумах и установках замкнутого водоснабжения к ним можно причислить антибиотики, вносимые с кормом или самостоятельно для профилактики и лечения инфекционных заболеваний объектов аквакультуры [3]. Действующим компонентом антибиотика флавомицина является флавофосфолипид 8%, механизм действия которого заключается в нарушении синтеза пептидогликана, необходимого для формирования клеточной стенки прокариот [4]. Как правило, даже в случае передовых технологий обычные системы биологической очистки не обеспечивают полное удаление антибиотиков из системы. Антимикробные соединения могут накапливаться в биофильтрах из-за чего возникает риск их негативного воздействия на морфологическое разнообразие и физиологическую активность микроорганизмов в составе биопленки биофильтра. Для оценки влияния флавомицина на морфологическое разнообразие и физиологическую активность микроорганизмов в составе биопленки биофильтра учитывали, что жизнедеятельность микроорганизмов биопленки протекает в аэробных условиях; компоненты биопленки участвуют в процессах сорбции коллоидных и растворенных органических веществ; рост биопленки биофильтра связан с покрывающей поверхностью грузочного материала; биомасса биопленки зависит от накопления в системе органических форм азота и фосфора.

Оценку морфологического разнообразия и физиологической активности микроорганизмов в составе биопленки выполняли на примере биофильтров аквариума и УЗВ, в которых содержалась радужная форель *Parasalmo mykiss* (Walbaum, 1792) согласно рекомендациям по выращиванию рыбопосадочного материала радужной форели в рыбоводных промышленных комплексах [5]. Лабораторный эксперимент проводили в течение 2 месяцев с 26.03.2022 по 26.05.2022 на базе Научно-исследовательского центра по аквакультуре Петрозаводского госуниверситета. Пробы микрофлоры биопленки отбирали в первые сутки эксперимента и далее через 48 и 60 суток. Разнообразие форм и физиологическую активность бактерий в составе биопленки фильтров оценивали при концентрации флавомицина в продукционном комбикорме для форели в дозах 250 мг/кг и 500 мг/кг и при действии чистого антибактериального препарата в концентрации 250 мг/кг. Морфологическое разнообразие бактериофлоры оценивали по результатам микроскопического исследования. Для этого, окраску микроорганизмов биопленки выполняли по методу Грама [6] с использованием спиртового раствора генцианвиолета, раствора Люголя, фуксина и 96° этилового спирта в составе коммерческого набора «МикроГРАМ-НИЦФ» (Россия). Тинкториальные свойства бактерий описывали в соответствии с химическим составом клеточных стенок прокариотических микроорганизмов. Физиологическую активность микроорганизмов оценивали с использованием величины КОЕ (колониобразующих единиц) – показателя количества жизнеспособных клеток микроорганизмов в единице объема (1 см³) или в жидкости (1 мл). Для этого использовали метод исследования биопленок, предложенный Мардановой А. М. с соавторами (2016) [7]. Фрагменты грузочного материала стерильно изымали и помещали по два образца в 10 мл

стерильного буферного раствора. Путем центрифугирования при 2000 оборотах в течение 5 минут пленки отделяли от поверхности загрузочного материала. Полученную взвесь тщательно встряхивали на шейкере и выполняли серию 5-кратных микроразведений. Из последних двух разведений выполняли посев 1 мл взвеси на поверхность агаризованных сред различного назначения: мясопептонный агар (МПА) – для выделения гетеротрофной группы бактерий, среду Эндо – для выделения и идентификации энтеробактерий, основной перфрингенс-агар (ОПА/пропись фирмы «Дифко») – для выделения и предварительной идентификации спорогенных анаэробов рода *Clostridium spp.*, среду Виноградского – для выделения и идентификации бактерий I и II фаз нитрификации, среду Сабуро – для выделения микромицетов. Посевы инкубировали в течение 48 ч при температуре 37°C. Колонии подсчитывали с учетом выполненных разведений, все посевы выполняли в трех повторностях [8].

Результаты оценки влияния флавомицина на морфологическое разнообразие и физиологическую активность микроорганизмов в составе биопленки фильтров аквариума представлены на фотографиях (рис. 1) и в таблице 1. Наиболее обширные биопленки обнаружены на поверхности загрузочного материала в аквариумах, где бактерии были погружены в слой экзополисахаридного матрикса. На фотографиях (рис. 1) видно присутствие свободных грамположительных бактерий (рис. 1 а) и крупных агрегатов, объединённых в единый экзополисахаридный матрикс (рис. 1 б).

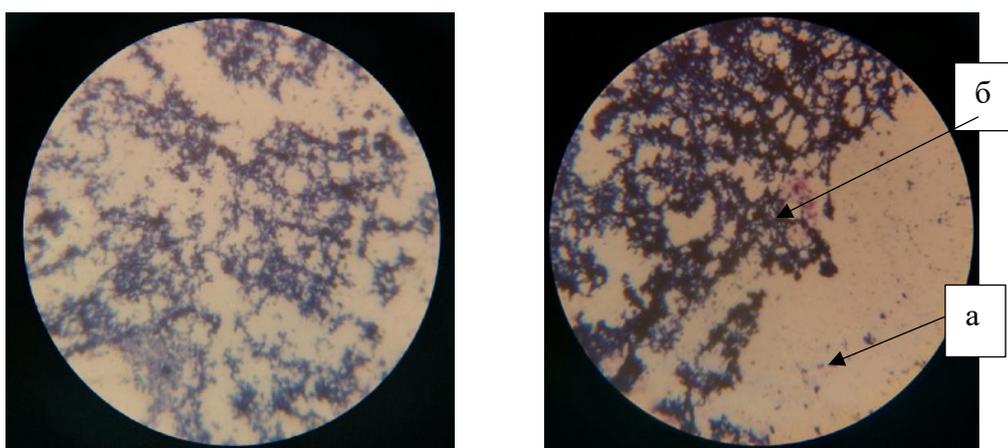


Рисунок 1 – Грамположительные бактерии в составе биопленки биофильтра аквариума: а – свободные клетки; б – слой экзополисахаридного матрикса ($\times 1000$, иммерсионная техника микроскопии).

Доминирующей таксономической группой бактерий в составе биопленки фильтров аквариума оказались представители порядка *Bacillales* семейства *Bacillaceae*. В водной фазе также преобладали бациллы. Развитие бацилл наблюдалось параллельно с накоплением органического фосфора ($PO_4 > 5$ мг/л). К завершению эксперимента содержание фосфатов снизилось до нулевых значений, а количество гетеротрофной составляющей бактериофлоры биопленки сохранилось на уровне $10^2 - 10^7$ КОЕ/мл, что свидетельствует об активных процессах минерализации фосфорсодержащей органики гетеротрофами. При этом, в условиях аквариального эксперимента, в случае добавления в рацион форели комбикорма с флавомицином и чистого флавомицина существенно снизилась выживаемость биоплёночных автотрофов группы нитрификаторов. Так, за 60 суток эксперимента количество жизнеспособных клеток нитрозных бактерий I фазы сократилось в 10 раз, а нитрификаторов

II фазы – в 17 раз (концентрация флавомицина в составе комбикорма – 250 мг/кг). Представители условно-патогенной группы энтеробактерий и микромицеты были обнаружены в составе микрофлоры биопленок в единичных количествах и исключительно в начале эксперимента – 26.03.2022. По мере созревания биопленки и увеличения периода внесения флавомицина с комбикормом и в чистом виде, наблюдалось полное ингибирование нежелательных групп микроорганизмов. Анаэробные спорогенные представители рода *Clostridium spp.* в составе биопленочных микроорганизмов не выявлены.

Таблица 1 – Количество физиологически активных бактерий в составе биопленки биофильтра аквариума, КОЕ/мл

Дата отбора пробы	на МПА	на Эндо	на ОПА	на среде Виноградского	на Сабуро
Концентрация флавомицина в составе комбикорма 250 мг/кг					
26.03.2022	1.6×10^2	0.1×10^2	0	$\frac{1.1 \times 10^3 *}{0.4 \times 10^2 **}$	3
12.05.2022	1.2×10^7	0	0	$\frac{0.7 \times 10^2}{132}$	0
26.05.2022	3.4×10^4	0	0	$\frac{102}{64}$	0
Концентрация флавомицина в составе комбикорма 500 мг/кг					
26.03.2022	1.9×10^3	0	0	$\frac{2.2 \times 10^2}{1.6 \times 10^2}$	1
12.05.2022	0.6×10^3	0	0	$\frac{704}{92}$	0
26.05.2022	2.3×10^4	0	0	$\frac{86}{17}$	0
Концентрация флавомицина 250 мг/кг					
26.03.2022	2.7×10^2	0	0	$\frac{0.1 \times 10^2}{180}$	0
12.05.2022	0.3×10^3	0	0	$\frac{130}{52}$	0
26.05.2022	0.7×10^3	0	0	$\frac{43}{11}$	0

Примечание: * – количество бактерий I фазы нитрификации; ** – количество бактерий II фазы нитрификации;

Результаты оценки влияния флавомицина на морфологическое разнообразие и физиологическую активность микроорганизмов в составе биопленки фильтров установки замкнутого водоснабжения представлены на фотографиях (рис. 2) и в таблице 2.

На поверхностях загрузки фильтров бактерии образовывали крупные агрегаты (рис. 2 б), одиночные клетки (рис. 2 а, с) и присутствовали в достаточном количестве (10^2 - 10^4 КОЕ/мл). Доминировали грамотрицательные бактерии, таксономически представленные *Proteobacteria*. В водной фазе присутствовали *Bacteroidetes*, *Sphingomonadales* и *Methylophilaceae*.

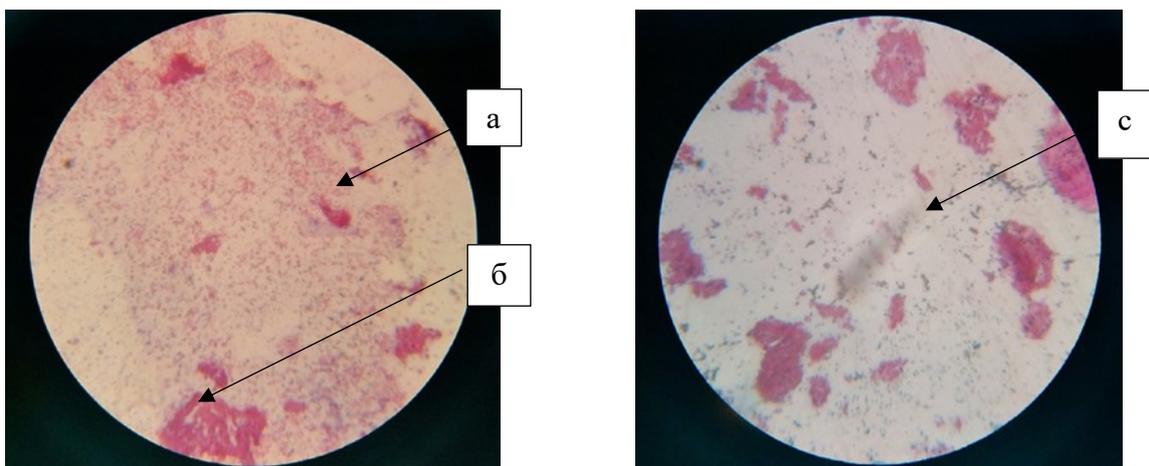


Рисунок 2 – Грамотрицательные бактерии в составе биопленки биофильтра УЗВ: а – свободные клетки; б – слой экзополисахаридного матрикса; с – грамположительные свободные микроорганизмы ($\times 1000$, иммерсионная техника микроскопии)

Таблица 2 – Количество физиологически активных бактерий в составе биопленки биофильтра УЗВ, КОЕ/мл

Дата отбора пробы	на МПА	на Эндо	на ОПА	на среде Виноградского	на Сабуро
	Концентрация флавомицина в составе комбикорма – 250 мг/кг				
26.03.2022	1.2×10^3	12	0	0.7×10^3 0.1×10^3	6
12.05.2022	1.5×10^4	4	0	2.2×10^2 0.4×10^2	1
26.05.2022	0.6×10^4	1	0	2.1×10^3 2.9×10^3	0
Концентрация флавомицина в составе комбикорма – 500 мг/кг					
26.03.2022	0.9×10^3	0	0	1.1×10^2 0.3×10^2	0
12.05.2022	1.1×10^2	0	0	0.6×10^3 1.2×10^2	0
26.05.2022	0.2×10^2	0	0	3.4×10^3 1.1×10^2	0
Концентрация флавомицина – 250 мг/кг					
26.03.2022	0.9×10^3	9	0	0.1×10^2 0.1×10^2	2
12.05.2022	0.4×10^3	2	0	3.4×10^3 2.1×10^2	2
26.05.2022	1.7×10^3	0	0	0.6×10^5 4.1×10^3	1

Примечание: * – количество бактерий I фазы нитрификации; ** – количество бактерий II фазы нитрификации;

Развитие гетеротрофов сопровождалось накоплением органического фосфора ($\text{PO}_4 > 10$ мг/л). К завершению исследования (26.05.2022), аналогично с аквариальным экспериментом,

содержание фосфатов снизилось до 2-3 мг/л, а количество гетеротрофов сохранилось на уровне $10^2 - 10^4$ КОЕ/мл. Однако, в отличие от аквариального эксперимента, в условиях УЗВ при добавлении в рацион форели комбикорма с флавомицином и чистого флавомицина и параллельном созревании биоплёнки, выживаемость нитрификаторов I и II фазы не изменилась и сохранилась в количестве $10^2 - 10^5$ КОЕ/мл. Представители условно-патогенной группы энтеробактерий и микромицеты были обнаружены в единичных количествах. Максимальное количество энтеробактерий (12 КОЕ/мл) и микромицетов (6 КОЕ/мл) было обнаружено в начале эксперимента – 26.03.2022. По мере созревания биопленки и увеличения периода внесения флавомицина, полное ингибирование нежелательных групп микроорганизмов было зафиксировано только в случае внесения флавомицина с комбикормом в дозе 500 мг/кг. Анаэробные спорогенные представители рода *Clostridium spp.* в составе биопленочных микроорганизмов УЗВ не выявлены.

Таким образом, в условиях аквариального лабораторного эксперимента и УЗВ, при оценке влияния флавомицина на морфологическое разнообразие и физиологическую активность биопленочных микроорганизмов обнаружен избирательный эффект исследуемого антибактериального препарата. Присутствие флавомицина в заданных концентрациях, избыточное содержание органического фосфора и аэробные условия выступили элективными факторами в организации и регуляции формирования специфических биопленочных структур на поверхности загрузки исследуемых фильтров. Во всех вариантах эксперимента выявлены планктонные культуры и биопленочные, ассоциированные с внеклеточным экзополисахаридным матриксом. Избирательность флавомицина заключалась в преобладании Гр (+) бактерий в условиях аквариального эксперимента и Гр (-) – в условиях УЗВ. Также, в условиях аквариального эксперимента отмечено угнетение жизнедеятельности нитрификаторов по мере увеличения концентрации препарата и степени созревания биоплёнки. В условиях УЗВ, при тех же параметрах эксперимента – у нитрификаторов сохранились значения численности жизнеспособных клеток на исходном уровне. Необходимо отметить положительное влияние флавомицина на почти полное угнетение жизнедеятельности условно-патогенных энтеробактерий и микромицетов, выявленных в единичном количестве на средах Эндо и Сабуро. Достаточная оксигенация, необходимая для развития биопленочных микроорганизмов в составе биофильтров, выразилась в полном отсутствии культурального роста облигатных анаэробов на перфрингенс-агаре.

Полученные результаты отражают факт присутствия многочисленных физиологических процессов, включая синтез метаболитов и биологически активных веществ у бактерий в составе биопленок, которые существенно отличаются от планктонных вариантов сходных видов. Организация существования автотрофных и гетеротрофных микроорганизмов в составе биопленки обеспечивает им физиологическую и функциональную стабильность, даже в условиях повышенной концентрации такого антибактериального препарата, как флавомицин.

Библиографический список

1. Lananan F., Abdul Hamid S. H., Din W.N.S., Ali N. A., Khatoon H., Jusoh A., Endut A. Symbiotic bioremediation of aquaculture wastewater in reducing ammonia and phosphorus utilizing Effective Microorganism (EM-1) and microalgae (*Chlorella sp.*) // Biodeterior. Biodegrad. – 2014. – № 95. – С. 127-134.

2. Jin X., Zhao Z., Qin Z., Lu D., Liang S.-X. Distribution and degradation of organic matter with different molecular weight in an A2/O treatment system // *Appl. Water Sci.* – 2017. – № 7. – С. 3497-3502.
3. Schar D., Klein E., Laxminarayan R., Gilbert M., Van Boeckel T. P. Global trends in antimicrobial use in aquaculture // *Sci. Rep.* – 2020. – № 10. – С. 218-228.
4. Справочник ветеринарных препаратов и кормовых добавок. Инструкция по применению ветеринарного препарата Флавомицин 80. vetsnab.info 2020 – 2022 – URL: <https://vetsnab.info/vetpreparaty/flavomiczin-80/> (дата обращения: 02.10.2022)
5. Рекомендации по выращиванию рыбопосадочного материала радужной форели в рыбноводных индустриальных комплексах (с временными нормативами) / Н. В. Барулин [и др.]. – Горки: БГСХА. – 2016. – 180 с.
6. Маннапова Р. Т. Практикум для выполнения лабораторно-практических работ. – М. : Проспект, 2021. – 440 с.
7. Марданова А.М., Кабанов Д.А, Рудакова Н.Л., Шарипова М.Р. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. – Казань: К(П)ФУ. – 2016. – 42 с.
8. Мельников В. Д., Жвачкина А. А. Водная микробиология: учебно-методическое руководство для студентов биологического факультета. – Петрозаводск: Петрозаводский государственный университет имени О. В. Куусинена. – 1975. – 99 с.

ДЕГРАДАЦИЯ МОНОЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ *RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS* 5AP

Трушлис Э. В., Мандрик М. И.

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Аннотация. Загрязнение окружающей среды отходами производства является актуальной проблемой на сегодняшний день. Одним из перспективных направлений в биотехнологии является биологическая очистка окружающей среды. В данной работе изучалась способность бактерий *Rhodococcus pyridinivorans* 5Ap утилизировать моноциклические ароматические углеводороды.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, биodeградация, фенол, о-ксилол, толуол

DEGRADATION OF MONOCYCLIC AROMATIC COMPOUNDS BY *RHODOCOCCUS* *PYRIDINIVORANS* STRAIN 5AP

Trushlis E. V., Mandryk M. I.

Belarusian State University, Minsk, Belarus

Abstract. Environmental pollution by industrial waste is one of the biggest problems today. And one of the most promising ways to delete pollutants from the environment is biological treatment. In this work, the ability of *Rhodococcus pyridinivorans* strain 5Ap to utilize monocyclic aromatic hydrocarbons was studied.

Keywords: *Rhodococcus*, biodegradation, phenol, o-xylene, toluene.

Различные виды антропогенной деятельности приводят к распространению моноциклических ароматических углеводородов. Попадая в окружающую среду вместе с отходами нефтяной, химической, деревообрабатывающей промышленности, они способны оказывать канцерогенное и мутагенное воздействие на живые организмы. Бактерии рода *Rhodococcus* способны обитать в загрязненных экосистемах и утилизировать широкий спектр соединений, в том числе арены, которые могут быть недоступны или даже токсичны другим микроорганизмам [1].

Целью работы было исследование способности бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap утилизировать моноциклические ароматические соединения.

Спектр утилизируемых соединений изучали на плотной минеральной среде М9 [2], бензол, толуол, этилбензол, о-ксилол, м-ксилол, п-ксилол, пиридин добавляли в виде паров; фенол – в концентрации 0,01% вносили в среду непосредственно перед заливкой в чашки. Бактерии засеивали штрихом и инкубировали при 28°C в течение 14 сут. Ростовые

концентрации различных субстратов (фенол, о-ксилол, толуол) определяли в жидкой минеральной среде К [3]. Для изучения динамики роста бактерии культивировали при 28°C с аэрацией (140 об/мин) в течение 28 ч в минеральной среде К с добавлением фенола (0,02 %) в качестве единственного источника углерода. Каждые 2 ч отбирали пробы для измерения оптической плотности культуры (при 600 нм) и определения концентрации фенола (клетки осаждали центрифугированием, измеряли спектр поглощения в кварцевой кювете в ультрафиолетовом спектре 190–350 нм). Биоинформационный анализ генетических детерминант, определяющих способность утилизировать моноциклические ароматические углеводороды проводили с помощью программы SnapGene 2.3.2 и интернет-ресурса <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Исследуемые бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap выделены из загрязненной нефтепродуктами почвы (Ливия) и способны утилизировать такие моноциклические соединения, как бензол, фенол, толуол, этилбензол, о-ксилол, м-ксилол, п-ксилол, пиридин [4]. При исследовании роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в среде с различной концентрацией фенола, о-ксилола и толуола было установлено, что рост на среде с фенолом наблюдается при концентрации 0,02%, а концентрация 0,05% оказывает токсическое воздействие и клетки гибнут. Рост в среде с толуолом наблюдается при концентрации 0,001%, 0,005% и 0,01%. При более высоких концентрациях (0,02% и более) толуола можно наблюдать отмирание бактерий, о чем свидетельствует снижение оптической плотности культуры. Что касается о-ксилола, то бактерии *R. pyridinivorans* 5Ap также способны расти в среде с концентрацией этого соединения до 0,01%.

В целом можно отметить, что несмотря на то, что толуол и о-ксилол являются ростовыми субстратами для *R. pyridinivorans* 5Ap, они обладают более выраженным токсическим воздействием на клетки бактерий-деструкторов (максимальная концентрация 0,01 %) по сравнению с фенолом (максимальная концентрация 0,02 %). Изучение динамики роста бактерий *R. pyridinivorans* 5Ap в минеральной среде К с добавлением фенола (0,02 %) в качестве единственного источника углерода позволило установить, что лаг-фаза составляет около 14-16 ч, а стационарная фаза роста достигалась через 22 ч (рис. 1а). Содержание фенола в культуре начинает снижаться через 16 ч, а через 24 ч фенол перестает детектироваться вовсе (рис. 1б).

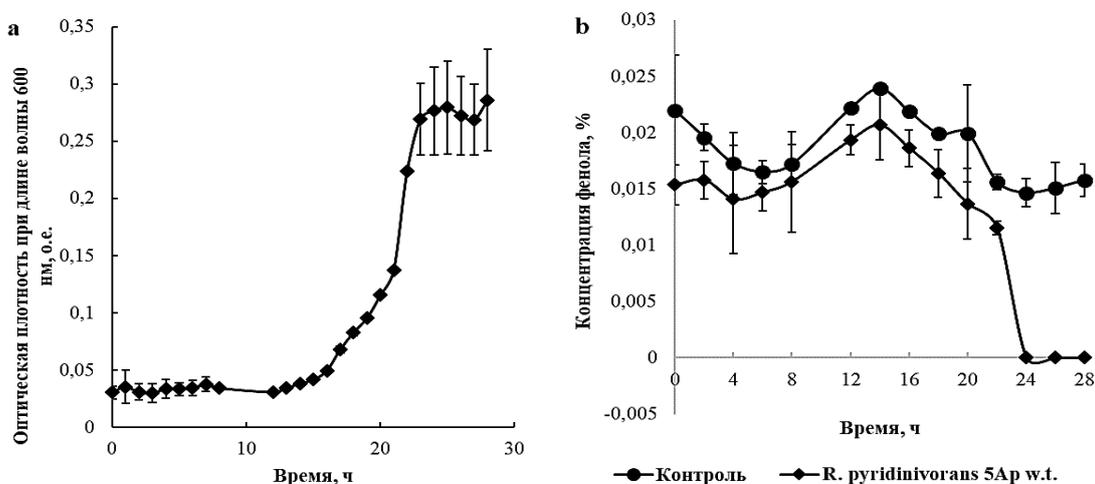


Рисунок – График зависимости оптической плотности исследуемых культур от времени культивирования (а) и динамика изменения концентрации фенола (б).

Способность деградировать фенол у бактерий *R. pyridinivorans* 5Ar детерминируется хромосомными генами. В результате биоинформационного анализа хромосомы было идентифицировано 11 генов, предположительно участвующих в утилизации фенола, при чем выявлено 5 гомологичных детерминант, которые могут определять первую реакцию. По нуклеотидному составу эти гены схожи с генами *R. pyridinivorans* различных штаммов и *Rhodococcus* sp. Выявленные гены кодируют все ферменты утилизации фенола по пути орто-расщепления.

Гены, ответственные за расщепление цикла, объединены в оперон *catABC* и кодируют катехол-1,2-диоксигеназу, муконат/хлормуконат циклоизомеразу и муконолактон дельта-изомеразу соответственно. Дальнейшая деградация моноциклов может происходить с участием генов, отвечающие за деградацию протокатехола. Данные гены составляют один оперон (*pcaBD*). Экспрессия генов двух оперонов находится под контролем транскрипционных факторов семейства IclR, которые обладают достаточно высокой степенью сходства: 44% идентичности и 61% подобия с учетом синонимичных замен.

Таким образом, бактерии *R. pyridinivorans* 5Ar являются эффективными деструкторами ряда моноциклических ароматических соединений. Они способны к росту при концентрациях фенола (0,02%), о-ксилола (0,01%) и толуола (0,01%), превышающих ПДК в 200 000; 2 000 и 200 раз соответственно [5]. Генетические детерминанты, определяющие способность утилизировать фенол, локализованы в хромосоме бактерий.

Библиографический список

1. Kuyukina M.S., Ivshina M.S. Bioremediation of Contaminated Environments Using *Rhodococcus* // Microbiology Monographs. A. Steinbuchel. 2019. Vol. 16. P. 231–270.
2. Lanyi B. Classical and rapid identification methods for medically important bacteria // Methods in Microbiol. 1988. V.19. P. 1–67.
3. Atlas R.M. Handbook of microbiological media / Third edition. Boca Raton.: CRC Press, 2010. 2056 p.
4. Чернявская М.И. Сравнительная характеристика углеводородокисляющих бактерий различных климатических зон: дис. канд. биол. наук: 03.02.03. Минск, 2016. 152 с.
5. Об утверждении Гигиенических нормативов 2.1.5.10-21-2003 “Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования”: постановление Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 12.12.2003 № 163 // Главный государственный врач Республики Беларусь. 2003.

ДИНАМИКА ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ТИОЛОВ, SO_3^{2-} И H_2S В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ И ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ

Ушаков В.Ю.^{1,2}, Чурин Г.Ю.¹, Смирнова Г.В.², Октябрьский О.Н.²

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

²Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. В работе показано, что при остановке синтеза белка на рибосомах, индуцированной действием антибиотиков (эритромицин, тетрациклин) или истощением в среде культивирования источника углерода и энергии, происходит изменение концентраций сульфита, сульфида водорода и общих тиолов в среде культивирования.

Ключевые слова: тиолы, антибиотики, стресс голода, *B. subtilis*

DYNAMICS OF EXOCELLULAR THIOLS AND LOW-MOLECULAR INORGANIC SULFUR COMPOUNDS (SO_3^{2-} , H_2S) IN GROWING *BACILLUS SUBTILIS* CULTURES UNDER THE ACTION OF ANTIBIOTICS AND CARBON AND ENERGY STARVING

Ushakov V.Yu.^{1,2}, Churin G.Yu.¹, Smirnova G.V.², Oktyabrsky O.N.²

¹Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

²Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – branch of the PFRC, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. The work shows that when protein synthesis is stopped (antibiotic stress, hunger stress) in the bacteria *Bacillus subtilis*, the production of hydrogen sulfide is observed and the concentration of extracellular thiols changes

Keywords: thiols, antibiotics, inorganic sulfur metabolites.

Известно, что грамположительные бактерии рода *Bacillus* используют в качестве основного низкомолекулярного тиола бациллитиол (BSH) [1,2], который является функциональным аналогом более изученного глутатиона (GSH), широко распространенного как у грамотрицательных прокариот, так и у эукариот. В состав глутатиона и бациллитиола входит серосодержащая аминокислота цистеин, определяющая высокую редокс-активность этих тиолов. В определенных ситуациях цистеин, взаимодействуя с Fe^{2+} в реакции Фентона, может образовывать высокотоксичные гидроксильные радикалы, поэтому живые клетки строго поддерживают гомеостаз внутриклеточного цистеина [3]. У эукариот и бактерий катаболизм цистеина может являться одним из источников H_2S [4]. Одним из промежуточных продуктов в метаболизме цистеина является сульфит (SO_3^{2-}). Ранее было обнаружено, что у

грамотрицательных бактерий *Escherichia coli*, растущих на глюкозо-минеральной среде, стрессовые воздействия сопровождаются резким увеличением экстраклеточного H_2S и некоторым снижением SO_3^{2-} . Список стрессов включает голодание и обработку различными антибиотиками [5].

Цель настоящей работы: проверить динамику сульфита, H_2S и общих тиолов при обработке растущих клеток *B. subtilis* антибиотиками тетрациклином и эритромицином, а также в условиях голодания по источнику углерода и энергии.

Материалы и методы. В работе использовался штамм *Bacillus subtilis*-428 из коллекции ВКМ. Хранимые на твердой питательной среде клетки переносились в жидкую минеральную среду М9 и культивировались в орбитальном шейкере при 37°C и 110 об/мин. Через 20 часов культура центрифугировалась и ресуспендировалась в свежей среде аналогичного состава при исходной $OD_{600} = 0.1$. По достижении $OD_{600} = 0.4$ вносился исследуемый антибиотик в концентрациях 30, 60 или 120 мкг/мл. В качестве источника углерода и энергии использовали глюкозу в концентрации 1 % в контрольных условиях (нелимитированный рост) и 0,025% (для индукции стресса голода). Истощение глюкозы происходило в середине экспоненциальной фазы роста. Во всех случаях продукция H_2S , SO_3^{2-} и общих тиолов (при обработке клеток эритромицином) измерялась за каждые 15 мин и суммарно за час после добавления антибиотика.

Данные анализировались при помощи пакета программ Excel 2010. Детекцию газообразной формы сульфида водорода (H_2S) проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой бумажными полосками, пропитанными ацетатом свинца. Количественно изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ, интенсивность цвета выражали в процентах. Концентрацию сульфита определяли методикой, описанной в источнике [6].

На рис.1 показана продукция сульфида водорода при обработке растущих *B. subtilis* разными концентрациями тетрациклина в динамике (А) и суммарное выделение H_2S за 60 минут роста в присутствии антибиотика (Б). Статистически достоверное увеличение концентрации экстраклеточного сульфида водорода наблюдалось при экспозиции клеток со всеми исследуемыми концентрациями тетрациклина. но дозозависимого эффекта не регистрировали. Отмечается отсутствие дозозависимого эффекта. В описываемых условиях, при обработке клеток *B. subtilis* 30, 60 и 120 мкг/мл тетрациклина обнаружено повышение экстраклеточного сульфида водорода на 40, 60 и 30 %, соответственно, по сравнению с контролем.

При обработке *B. subtilis* эритромицином обнаружена связь между концентрацией антибиотика и временем максимальной продукции сульфида водорода. Бактерии *B. subtilis* выделяли максимальное количество H_2S на 15, 30 и 60 минуте эксперимента при добавлении 120 мкг/мл, 30 мкг/мл и 60 мкг/мл эритромицина, соответственно (рис. 2).

Сульфит (SO_3^{2-}) является первым продуктом восстановления сульфатов в клетке, предшествующим образованию сульфида водорода. В наших условиях за 90 минут культивирования уровень сульфита в контроле повышался на 20% от исходного уровня, в то время как обработка клеток эритромицином и тетрациклином приводила к статистически достоверному снижению концентрации сульфита на 35% (рис. 3)

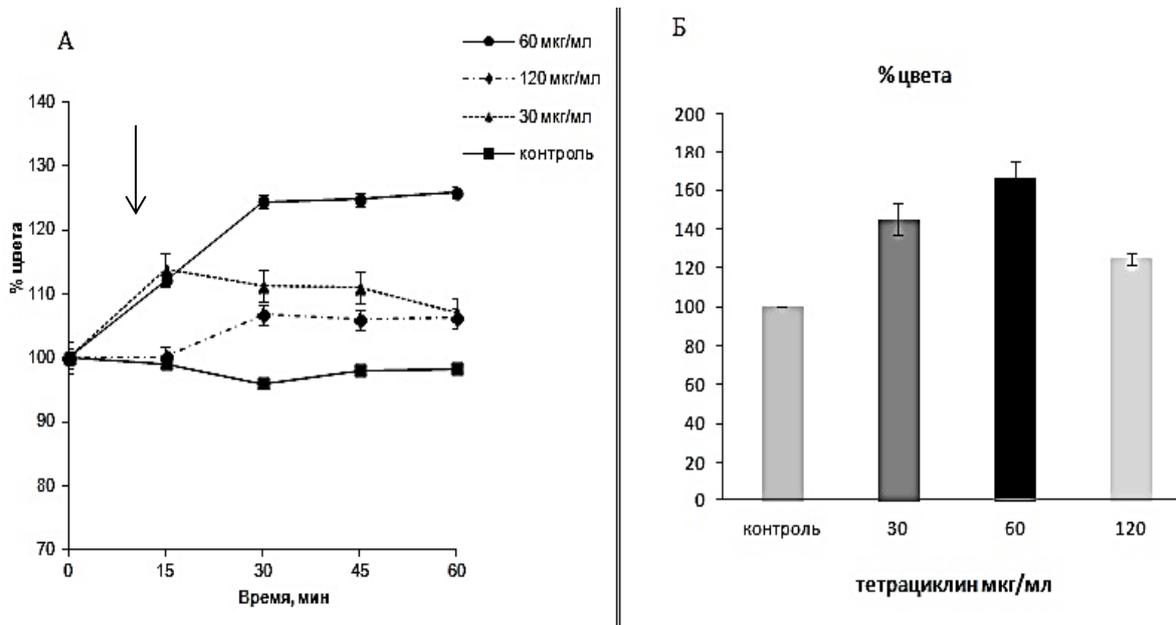


Рисунок 1 – Продукция сульфида водорода в растущих культурах *B. subtilis* при действии тетрациклина. А – изменение продукции H_2S в течение 60 минут. Б – суммарная продукция H_2S за 60 минут. Точки соответствуют количеству экстраклеточного H_2S , выделенного клетками в течение предыдущих 15 мин. Стрелкой указано добавление антибиотика.

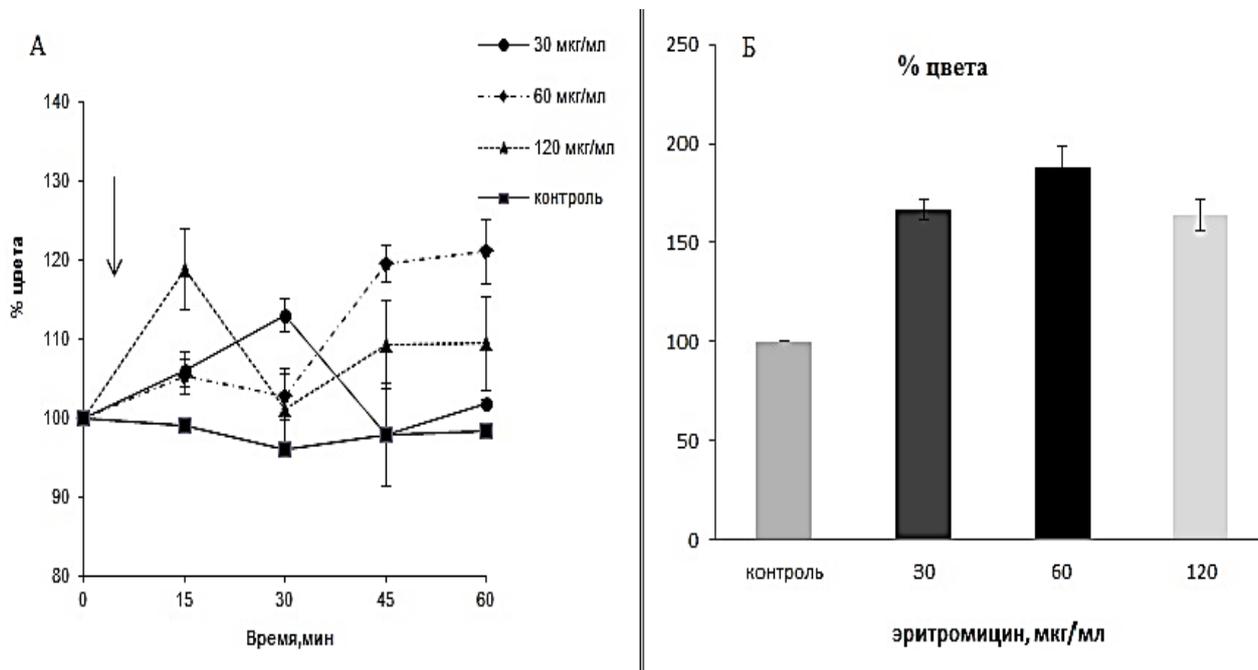


Рисунок 2 – Продукция сульфида водорода в растущих культурах *B. subtilis* при действии эритромицина. А – изменение продукции H_2S в течение 60 минут. Б – суммарная продукция H_2S за 60 минут. Точки соответствуют количеству экстраклеточного H_2S , выделенного клетками в течение предыдущих 15 мин. Стрелкой указано добавление антибиотика.

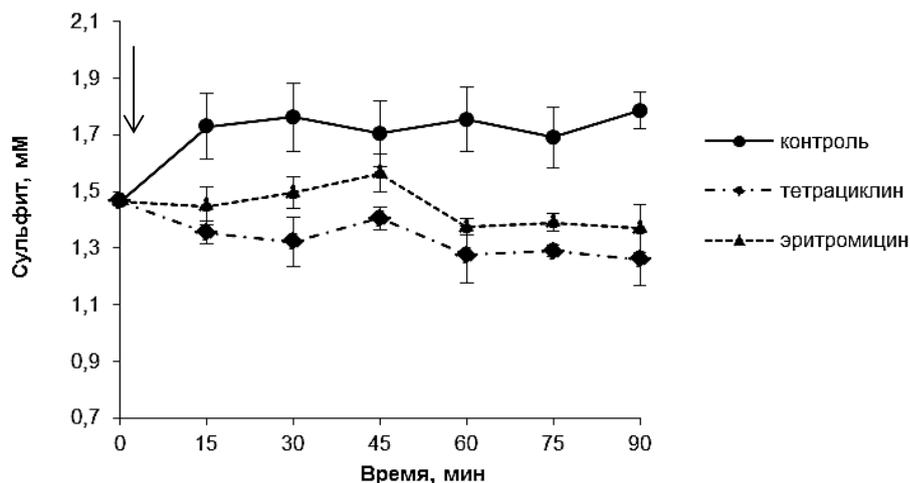


Рисунок 3 – Динамика экстраклеточного сульфита при обработке клеток *B. subtilis* тетрациклином (60 мкг/мл) и эритромицином (60 мкг/мл). Стрелкой указано добавление антибиотика.

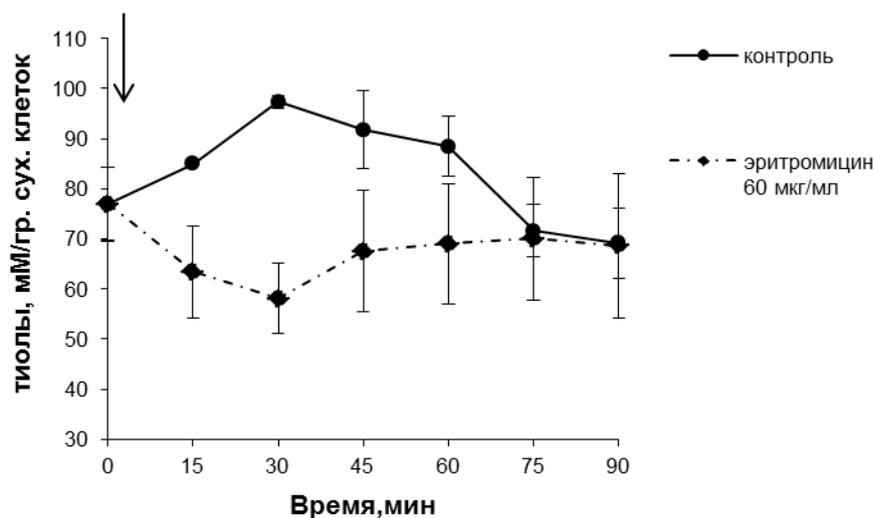


Рисунок 4 – Динамика общих экстраклеточных тиолов при обработке клеток *B. subtilis* эритромицином (60 мкг/мл). Стрелкой указано добавление антибиотика.

Было проведено также измерение концентрации общих экстраклеточных тиолов с реактивом Элмана [7] при обработке бактерий эритромицином (рис.4). Обнаружено снижение уровня общих тиолов в среде культивирования на 60% в течение часа после обработки бактерий исследуемым антибиотиком.

При исчерпании источника углерода и энергии (через 2 часа от начала культивирования), бактерии прекращали рост, с падением удельной скорости роста (μ) с максимального до нулевого значения. Судя по усилению окраски индикаторных бумажных полосок, сульфид водорода в газовой форме активно выделялся в течение 45 минут от начала голодания (рис. 5). Следует отметить, что подобный эффект выброса H_2S в схожей ситуации голодания по глюкозе наблюдался у бактерий *Bacillus megaterium* (не показано).

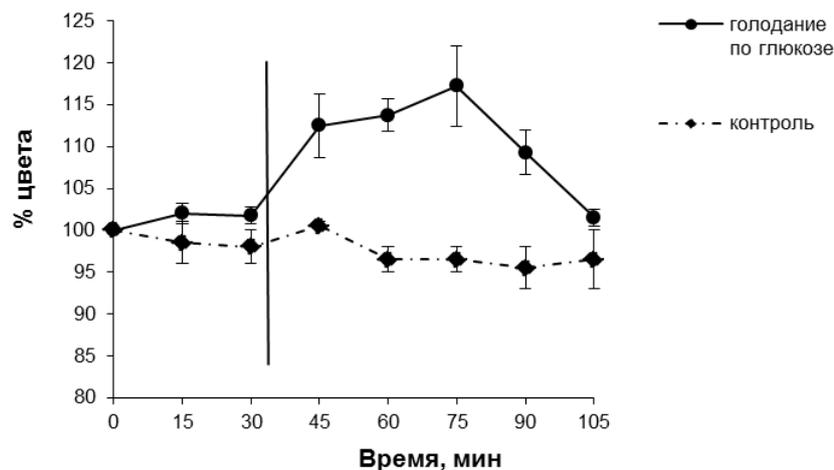


Рисунок 5 – Продукция сульфида водорода в растущих культурах *B. subtilis* при наступлении голодания по глюкозе (обозначено линией).

Наблюдаемое нами в этой работе стресс-индуцируемое выделение сульфида водорода в культурах *B. subtilis* может быть связано с поддержанием гомеостаза цистеина как это наблюдалось ранее у *E. coli* [5].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 22-14-00093.

Библиографический список

1. Newton G.L., Rawat M., Clair J., Jothivasan V., Budiarto T., Hamilton C., I Claiborne A., Helmann J., Fahey R. Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli // Nat. Chem. Biol. – 2009. – V. 5(9). – P.625-627.
2. Gaballa A., Newton G.L., Antelmann H., Parsonage D., Upton H., Rawat M., Claiborne A., Fahey R.C., Helmann J.D. Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – V. 107(14). – P. 6482-6486.
3. Park S., Imlay J.A. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // J. Bacteriol. – 2003. – V. 185(6). – P. 1942–1950.
4. Mustafa A.K., Gadalla M.M., Sen N., Kim S., Mu W., Gazi S.K., Barrow R.K., Yang G., Wang R., Snyder S.H. H₂S signals through protein S-sulfhydration. // Sci. Signal. – 2009. – V.2(96):ra 72.
5. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // Amino Acids. – 2019. – V.51(10-12). – P. 1577-1592.
6. Bastiat B., Sauviac L., Picheraux C., Rossignol M., Bruand C. *Sinorhizobium meliloti* Sigma Factors RpoE1 and RpoE4 Are Activated in Stationary Phase in Response to Sulfite // PLOS ONE. – 2012. – V.7(11). – P. 1 – 15.
7. Sedlak J., Lindsay R.H. Estimation of total protein-bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman reagent // Anal. Biochem. – 1968. – V.25. – P.192 – 205.

**АММИАК-ЛИАЗЫ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ:
ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ
СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПРИМЕНЕНИЕ**

Фролов Д.С.¹, Черных А.М.¹, Коломыцева М.П.²

¹ *Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия*

² *Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН, ФИЦ ПНЦБИ
РАН, Пущино, Россия*

Аннотация. Аммиак-лиазы ароматических аминокислот (АААЛ) имеют высокий потенциал применения для синтеза разнообразных арилакрилатов, неканонических α -аминокислот, новых антибиотиков, а также терапии фенилкетонурии и тирозинемии. Тем не менее, АААЛ остаётся недостаточно изученным семейством ферментов, выделенным из небольшого числа микроорганизмов. В данной работе осуществлён филогенетический анализ АААЛ с подтверждённой активностью и ранее неисследованных АААЛ организмов различных таксономических групп. Проведен сравнительный анализ структурных и биохимических свойств АААЛ.

Ключевые слова: аммиак-лиазы ароматических аминокислот, филогенетический анализ, структурные и биохимические свойства.

**AROMATIC AMINO ACID AMMONIA-LYASES: PHYLOGENETIC ANALYSIS,
STRUCTURAL AND FUNCTIONAL PROPERTIES, BIOLOGICAL ROLE, AND
APPLICATION**

Frolov D.S.¹, Chernykh A.M.¹, Kolomytseva M.P.²

¹ *M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

² *G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Pushchino Center for
Biological Research of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Russia*

Abstract. Aromatic amino acid ammonia-lyases (AAAL) have a high potential for the synthesis of various arylacrylates, non-canonical α -amino acids, new antibiotics, as well as the treatment of phenylketonuria and tyrosinemia. However, AAAL remains an understudied family of enzymes isolated from a small number of microorganisms. In this work, a phylogenetic analysis of AAAL with confirmed activity and previously unexplored AAAL from organisms of various taxonomic groups was carried out. A comparative analysis of the structural and biochemical properties of AAAL was carried out.

Keywords: aromatic amino acid ammonia-lyases, phylogenetic analysis, structural and functional properties.

Общая характеристика АААЛ.

К семейству аммиак-лиаз ароматических аминокислот (АААЛ) относят фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ, КФ 4.3.1.24), тирозин-аммиак-лиазы (ТАЛ, КФ 4.3.1.23), гистидин-аммиак-лиазы (ГАЛ, КФ 4.3.1.3) и фенилаланин/тирозин-аммиак-лиазы (ФТАЛ, КФ 4.3.1.25). Данные ферменты катализируют реакцию отщепления α -аминогруппы от соответствующих аминокислот с образованием двойной связи (Рис. 1) [1]. Многие АААЛ не столь специфичны и могут действовать на схожие соединения, такие как 2,3-диокси-L-фенилаланин (L-ДОФА) [2].

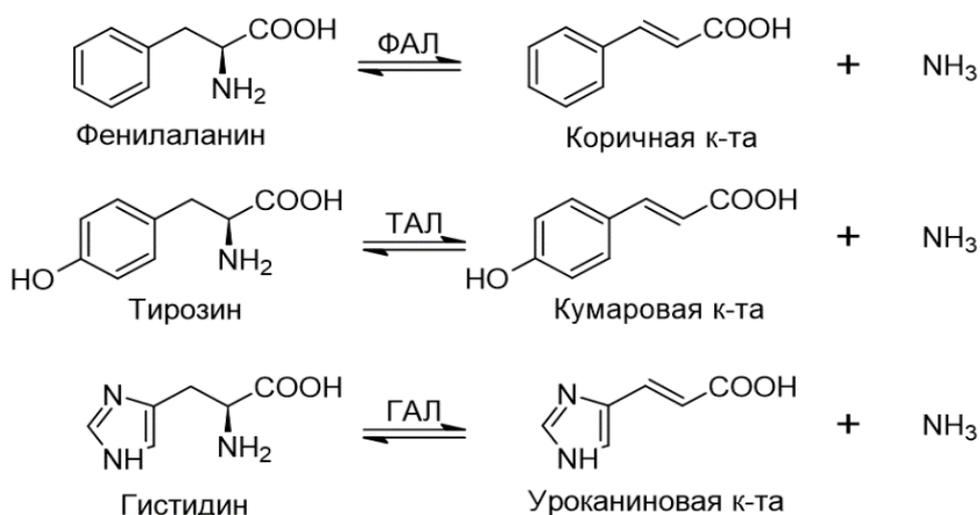


Рисунок 1 – Стандартные реакции, катализируемые АААЛ.

Высоко гомологичны этим белкам оказываются ферменты из семейства аминотуз ароматических аминокислот (АААМ), которые осуществляют перенос аминогруппы в β -положение. Как АААЛ, так и АААМ имеют особую простетическую группу 4-метилендимидазол-5-он (МИО), образующуюся автокаталитически из стоящих последовательно аланина, серина и глицина (Рис. 2) [3].

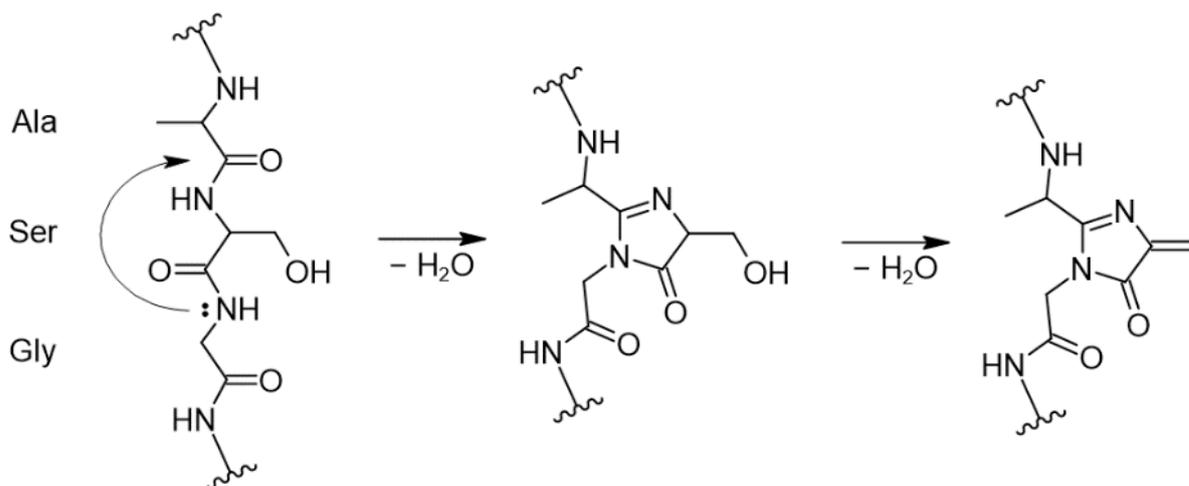


Рисунок 2 – Схема образования МИО в активном центре АААЛ и АААМ.

Строение АААЛ.

На сегодняшний день расшифровано 9 пространственных структур АААЛ: две растительных ФАЛ из *Sorghum bicolor* и *Petroselinum crispum*; одна грибная ФТАЛ из *Rhodospiridium toruloides*, две ФАЛ из цианобактерий *Anabaena variabilis* и *Nostoc punctiforme*, одна ТАЛ из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, а также три ГАЛ (из протеобактерии *Pseudomonas putida*, простейшего эукариота *Trypanosoma cruzi* и археи *Thermoplasma acidophilum*). Таким образом, структура АААЛ изучена у очень небольшого числа организмов. Тем не менее, можно выделить некоторые характерные особенности. Мономер АААЛ сложен в основном α -спиральными участками. Функциональной единицей фермента является гомотетрамер с четырьмя активными центрами, причём полость активного центра формируется сразу тремя субъединицами. В мономере можно выделить N-концевой домен, формирующий простетическую группу МИО, и С-концевой домен, участвующий в образовании активного центра двух соседних субъединиц. Таким образом, четыре активных центра фермента расположены “в шахматном порядке” [2,4,5].

Филогенетический анализ АААЛ.

Как видно из филогенетического древа АААЛ, построенного на основе аминокислотных последовательностей по алгоритму “Neighbor joining” (Рис. 3), растительные и грибные АААЛ образуют хорошо кластеризующиеся монофилетические группы. Бактериальные филумы на основании последовательностей АААЛ достоверно выделить оказывается невозможно (по крайней мере с небольшим набором известных последовательностей). Тем не менее, удаётся выделить группы по субстратной специфичности. Наиболее далеко отстоящей оказывается группа ГАЛ, предполагая их более раннее эволюционное отделение от предков ФАЛ и ТАЛ, что согласуется с опубликованными ранее данными [6]. Исключением является уникальные по последовательности ФАЛ из *Streptomyces maritimus* и предполагаемая ФАЛ из *Rhodococcus opacus*, которые оказываются филогенетически ближе к ГАЛ, чем к остальным ПАЛ или ТАЛ.

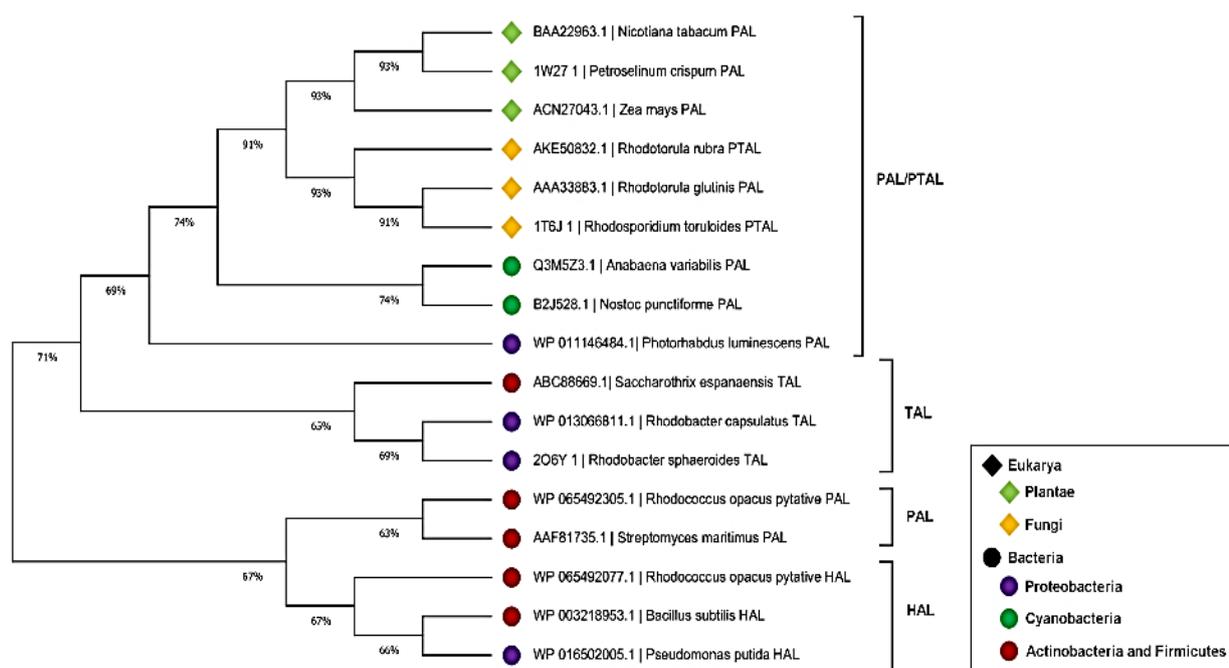
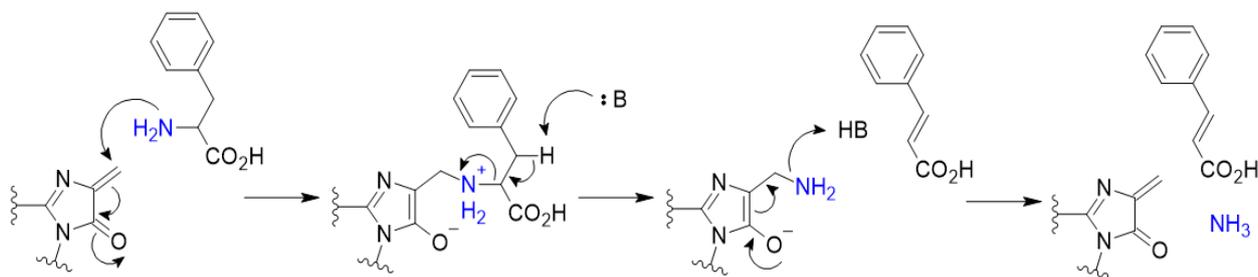


Рисунок 3 – Филогенетическое древо АААЛ.

Механизм катализа.

Для ААЛ предложено два различных механизма катализа [7]. В обоих случаях метиленовый атом углерода МИО-группы действует как электрофил. При amino-МИО-присоединении метиленовый углерод атакует аминогруппу, образуя с азотом ковалентную связь (Рис. 4, а). В подтверждение этого механизма говорят кристаллические структуры молекулярных комплексов ферментов с субстратными миметиками [3]. Однако описанный механизм не объясняет высвобождения в раствор неокисленного бензольного водорода ($pK_a > 40$), ввиду чего был предложен механизм по типу Фриделя-Крафтса, при котором метиленовый углерод совершает атаку по ароматическому кольцу с образованием С-С-связи (Рис. 4, б) [8].

(а) Механизм amino-МИО-присоединения



(б) Механизм по типу Фриделя-Крафтса

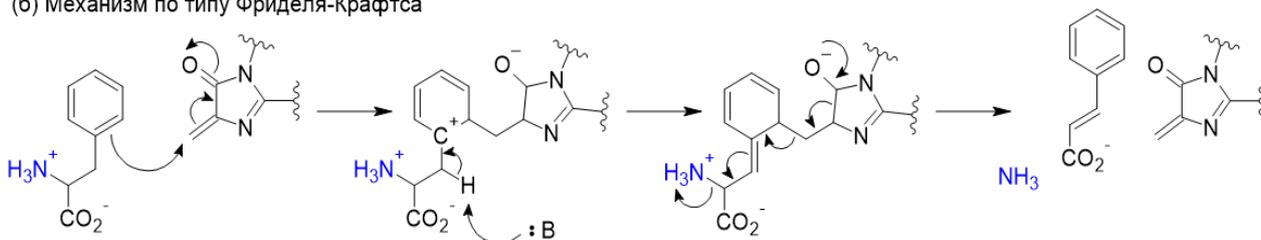


Рисунок 4 – Предполагаемые механизмы катализа ААЛ.

Биологическая роль ААЛ.

Наиболее известным ферментом семейства является ГАЛ, ввиду его участия в катаболизме гистидина у многих организмов, от бактерий до животных [9,10]. Кроме того, продукт действия ГАЛ на гистидин, уроганиновая кислота, играет защитную роль в коже млекопитающих, поглощая избыточный ультрафиолет [11]. Растительные ФАЛ также широко известны, поскольку лежат в начале пути синтеза фенилпропаноидов, являющихся прекурсорами для образования флавоноидов, стильбеноидов, лигнина и других важных метаболитов растений [12].

О роли ФАЛ и ТАЛ в метаболизме микроорганизмов известно же не так много. Кумаровая кислота, образующаяся под действием ТАЛ у фототрофной пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, служит хромофором для особого фоторецепторного белка [13]. ФАЛ обнаружены и у цианобактерий, но их функциональная роль остаётся не ясна [14]. Не так давно было показано, что ФАЛ энтомопатогенной бактерии *Photorhabdus luminescens* задействована в синтезе антибиотика стильбенового ряда [15]. Выделенная из актиномицета *Streptomyces maritimus* ФАЛ также необходима для продукции антибиотика, энтероцина [16]. Для некоторых грибов показано, что ФАЛ участвует в пути катаболизма фенилаланина, альтернативного тому, что наблюдается у животных [17].

Применение АААЛ.

Для промышленного использования могут быть интересны как прямая, так и обратная реакции, катализируемые АААЛ. Сообщалось о селективном синтезе L-фенилаланина, востребованного в пищевой промышленности, из коричной кислоты с помощью ФАЛ-содержащих дрожжей *Rhodotorula glutinis* как при глубинном культивировании, так и при иммобилизации клеток в колоночном реакторе [18,19]. Благодаря широкой субстратной специфичности бактериальных ФАЛ оказывается возможно селективно синтезировать нестандартные L- α -аминокислоты (или очищать D- α -аминокислоты из рацемата), причём не только замещённые фенилаланины, но и аминокислоты с разнообразными гетероциклическими и конденсированными радикалами (Рис. 4) [20,21].

В последнее время активно разрабатываются штаммы-продуценты различных арилакрилатов (фенилпропаноидов) с помощью гетерологической экспрессии ФАЛ или ТАЛ [22–25]. Метаболическая инженерия позволяет сконструировать на основе этих штаммов продуцентов самых разных растительных метаболитов, обладающих терапевтическими свойствами [26]. Были созданы продуценты и таких промышленно-ценных соединений, как бензоат и *n*-гидроксibenзоат (распространённые консерванты) и 4-винилфенол и стирол (прекурсоры для синтеза полимеров) [27–30].

Данные ферменты находят применение и в медицине: введение ФАЛ и ТАЛ потенциально может купировать симптомы фенилкетонурии и тирозинемии соответственно [31,32]. С помощью ФАЛ также возможно создание биосенсоров для детекции не только собственно фенилаланина, но и других ароматических соединений, например, капсаицина [33,34].

Библиографический список

1. Jendresen C.B. et al. Highly Active and Specific Tyrosine Ammonia-Lyases from Diverse Origins Enable Enhanced Production of Aromatic Compounds in Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* // *Appl. Environ. Microbiol.* 2015. Vol. 81, № 13. P. 4458–4476.
2. Louie G.V. et al. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases // *Chem. Biol.* 2006. Vol. 13, № 12. P. 1327–1338.
3. Cooke H.A., Christianson C.V., Bruner S.D. Structure and chemistry of 4-methylideneimidazole-5-one containing enzymes // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2009. Vol. 13, № 4. P. 460–468.
4. Baedeker M., Schulz G.E. Structures of two histidine ammonia-lyase modifications and implications for the catalytic mechanism // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269, № 6. P. 1790–1797.
5. Calabrese J.C. et al. Crystal structure of phenylalanine ammonia lyase: multiple helix dipoles implicated in catalysis // *Biochemistry.* 2004. Vol. 43, № 36. P. 11403–11416.
6. Peng F. et al. Origin and Evolution of Enzymes with MIO Prosthetic Group: Microbial Coevolution After the Mass Extinction Event // *Front. Genet.* 2022. Vol. 13. P. 851738.
7. Turner N.J. Ammonia lyases and aminomutases as biocatalysts for the synthesis of α -amino and β -amino acids // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2011. Vol. 15, № 2. P. 234–240.
8. Poppe L., Rétey J. Friedel-Crafts-type mechanism for the enzymatic elimination of ammonia from histidine and phenylalanine // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2005. Vol. 44, № 24. P. 3668–3688.
9. Brosnan M.E., Brosnan J.T. Histidine Metabolism and Function // *J. Nutr.* 2020. Vol. 150, № Suppl 1. P. 2570S – 2575S.

10. Bender R.A. Regulation of the histidine utilization (hut) system in bacteria // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. Vol. 76, № 3. P. 565–584.
11. Gibbs N.K., Tye J., Norval M. Recent advances in urocanic acid photochemistry, photobiology and photoimmunology // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2008. Vol. 7, № 6. P. 655–667.
12. Vogt T. Phenylpropanoid biosynthesis // *Mol. Plant.* 2010. Vol. 3, № 1. P. 2–20.
13. Xue Z. et al. Identification, characterization and functional expression of a tyrosine ammonia-lyase and its mutants from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2007. Vol. 34, № 9. P. 599–604.
14. Moffitt M.C. et al. Discovery of two cyanobacterial phenylalanine ammonia lyases: kinetic and structural characterization // *Biochemistry.* 2007. Vol. 46, № 4. P. 1004–1012.
15. Williams J.S., Thomas M., Clarke D.J. The gene *stlA* encodes a phenylalanine ammonia-lyase that is involved in the production of a stilbene antibiotic in *Photobacterium luminescens* TT01 // *Microbiology.* 2005. Vol. 151, № Pt 8. P. 2543–2550.
16. Xiang L., Moore B.S. Inactivation, complementation, and heterologous expression of *encP*, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 36. P. 32505–32509.
17. Hyun M.W. et al. Fungal and Plant Phenylalanine Ammonia-lyase // *Mycobiology.* 2011. Vol. 39, № 4. P. 257–265.
18. Yamada S. et al. Production of L-Phenylalanine from trans-Cinnamic Acid with *Rhodotorula glutinis* Containing L-Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity // *Appl. Environ. Microbiol.* 1981. Vol. 42, № 5. P. 773–778.
19. El-Batal A.I. Continuous production of L-phenylalanine by *Rhodotorula glutinis* immobilized cells using a column reactor // *Acta Microbiol. Pol.* 2002. Vol. 51, № 2. P. 153–169.
20. Weise N.J. et al. The Bacterial Ammonia Lyase *EncP*: A Tunable Biocatalyst for the Synthesis of Unnatural Amino Acids // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. Vol. 137, № 40. P. 12977–12983.
21. Poppe L. et al. Preparation of Unnatural Amino Acids with Ammonia-Lyases and 2,3-Aminomutases // *Unnatural Amino Acids: Methods and Protocols* / ed. Pollegioni L., Servi S. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. P. 3–19.
22. Bang H.B. et al. High-level production of trans-cinnamic acid by fed-batch cultivation of *Escherichia coli* // *Process Biochem.* Elsevier BV, 2018. Vol. 68. P. 30–36.
23. Li Y. et al. De Novo Biosynthesis of p-Coumaric Acid in *E. coli* with a trans-Cinnamic Acid 4-Hydroxylase from the Amaryllidaceae Plant *Lycoris aurea* // *Molecules.* 2018. Vol. 23, № 12.
24. Aschenbrenner J. et al. Microbial Production of Natural and Unnatural Monolignols with *Escherichia coli* // *Chembiochem.* 2019. Vol. 20, № 7. P. 949–954.
25. Son J. et al. Production of trans-cinnamic acid by whole-cell bioconversion from L-phenylalanine in engineered *Corynebacterium glutamicum* // *Microb. Cell Fact.* 2021. Vol. 20, № 1. P. 145.
26. Marienhagen J., Bott M. Metabolic engineering of microorganisms for the synthesis of plant natural products // *J. Biotechnol.* 2013. Vol. 163, № 2. P. 166–178.
27. Luo Z.W., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of benzoic acid from glucose // *Metab. Eng.* 2020. Vol. 62. P. 298–311.
28. Kallscheuer N., Marienhagen J. *Corynebacterium glutamicum* as platform for the production of hydroxybenzoic acids // *Microb. Cell Fact.* 2018. Vol. 17, № 1. P. 70.
29. Fujiwara R. et al. 4-Vinylphenol production from glucose using recombinant *Streptomyces mobaraense* expressing a tyrosine ammonia lyase from *Rhodobacter sphaeroides* // *Biotechnol. Lett.* 2016. Vol. 38, № 9. P. 1543–1549.

30. Liang L. et al. Genome engineering of E. coli for improved styrene production // *Metab. Eng.* 2020. Vol. 57. P. 74–84.
31. Dyshlyuk L. et al. Study of the l-Phenylalanine Ammonia-Lyase Penetration Kinetics and the Efficacy of Phenylalanine Catabolism Correction Using In Vitro Model Systems // *Pharmaceutics*. 2021. Vol. 13, № 3.
32. Hendrikse N.M. et al. Exploring the therapeutic potential of modern and ancestral phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases as supplementary treatment of hereditary tyrosinemia // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 1315.
33. Wang Z. et al. Investigation of a Phenylalanine-Biosensor System for Phenylketonuria Detection // *2005 IEEE Engineering in Medicine and Biology 27th Annual Conference*. 2005. P. 1913–1916.
34. Sabela M.I. et al. Electrochemical sensing platform amplified with a nanobiocomposite of L-phenylalanine ammonia-lyase enzyme for the detection of capsaicin // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 83. P. 45–53.

ТЕРМОФИЛЬНЫЙ ШТАММ *STREPTOMYCES* КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Имидоева Н.А.,
Тельнова Т.Ю., Власова А.А., Рулёва А.Ю., Дмитриев И.А., Емшанова В.А., Коновалов А.С.,
Аксёнов-Грибанов Д.В.

Иркутский Государственный Университет, Иркутск, Россия

Аннотация. В последнее время уделяется особое внимание микроорганизмам, которые обитают в экстремальных условиях среды. Это объясняется тем, что такие микроорганизмы имеют ряд адаптаций к неблагоприятным условиям, благодаря чему растет их биотехнологический потенциал [2]. Это приобретает особую значимость ввиду того, что одной из важных проблем современного здравоохранения является рост смертности населения от различных заболеваний, а также поиск новых продуцентов биологически активных веществ [3, 4].

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, биологически активные соединения, термофилы, *Streptomyces* sp., экстремофилы.

THERMOPHILIC STRAIN *STREPTOMYCES* AS A PRODUCER OF NATURAL BIOLOGICAL ACTIVE COMPOUNDS

Shelkovnikova V.N., Dmitrieva M.E., Malygina E.V., Belyshenko A.Y., Imidoeva N.A.,
Telnova T.Y., Vlasova A.A., Ruleva A.Y., Dmitriev I.A., Emshanova V.A., Konovalov A.S.,
Axenov-Gribanov D.V.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. Recently, special attention has been paid to microorganisms that live in extreme environmental conditions. This is due to the fact that such microorganisms have a number of adaptations to adverse conditions, which increases their biotechnological potential [2]. This is of particular importance due to the fact that one of the important problems of modern healthcare is the increase in mortality from various diseases, as well as the search for new producers of biologically active substances [3, 4].

Keywords: antibiotic resistance, biological active compounds, thermophiles, *Streptomyces* sp., extremophiles.

Устойчивость к антибиотикам представляет собой глобальную проблему современного здравоохранения. Существует ряд причин развития антибиотикорезистентности микроорганизмов, которые зачастую сводятся к адаптациям генетического аппарата микроорганизмов, происходящим вследствие бесконтрольного применения антибиотиков и

лекарственных препаратов [4]. Поиск новых биологически активных соединений является одним из возможных решений данной проблемы, особенно в экстремальных экосистемах [5]. Экстремофильными называют организмы, которые способны существовать и размножаться в экстремальных условиях среды, например, при высоком давлении, низкой и высокой температуре, различном значении рН. Термофильными считаются микроорганизмы, которые способны существовать при постоянно высоких температурах.

Ранее считалось, что экстремофилы не способны продуцировать вторичные метаболиты, однако неоднократно было доказано, что бактерии, выделенные из экстремальных экосистем, могут синтезировать новые вторичные метаболиты даже в обычных условиях. Использование экстремофильных штаммов актинобактерий является одной из наиболее многообещающих стратегий, так как актинобактерии синтезируют разнообразные соединения и широко распространены в окружающей среде. Благодаря им разработаны антибактериальные препараты для лечения инфекционных заболеваний [5].

Озеро Байкал – это уникальная экосистема, которая характеризуется низкой температурой воды, низким содержанием минеральных и органических элементов, высоким содержанием растворённого кислорода во всей толще воды и высочайшим биоразнообразием флоры и фауны [1]. Вследствие этого организмы озера Байкал можно называть экстремофильными.

Целью данного исследования являлась оценка антимикробной активности и синтеза природных соединений термофильного штамма *Streptomyces* sp. Штамм выделен из байкальской губки *Lubomirskia baikalensis* в результате нагрева при температуре 110°C в течение 2 часов. Далее выделенный штамм *Streptomyces* sp. был культивирован при шести температурах (13°C, 28°C, 37°C, 45°C, 55°C и 65°C) в одиннадцати жидких питательных средах, различных по составу. С использованием подходов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии была проведена оценка состава природных соединений, синтезируемых штаммом *Streptomyces* при температурах 13°C, 28°C и 37°C. Антимикробная активность была оценена с помощью диско-диффузионного метода для всех температурных условий.

В ходе культивирования при 13°C было обнаружено 279 соединений, при 28°C – 386, а при 37°C – 375. При всех температурных условиях штаммом были синтезированы 87 природных соединений, в т.ч. противоопухолевые соединения Usabamycin A (ММ – 272,15192 Да), JBIR 120 (ММ – 310,13099 Да), Nivelactam (ММ – 439,2688 Да) и Anguinomycin C (ММ – 452,26242 Да), антибактериальные агенты 5-Zizaen-4-one (ММ – 218,16651 Да) и N-Methylisoleucylamiclenomucylglutamic acid (ММ – 452,26242 Да).

Исключительно при температуре 13°C штамм синтезировал 111 соединений, большинство которых представлено антибиотиками – Penicillin N (ММ – 359,11496 Да), Megacidin (ММ – 486,2468 Да), Antibiotic OA 6129E (ММ – 489,21347 Да) и Lugdunin (ММ – 782,44449 Да). Также были обнаружены соединения Cyclo(leucylprolyl); (3S,8aS)-form (ММ – 210,13611 Да) с противоопухолевыми и противогрибковыми эффектами, гербицид Herbimycin B (ММ – 294,18259 Да).

Исключительно при температуре 28°C штамм *Streptomyces* синтезировал 158 соединений. Идентифицированные вещества представлены противогрибковыми N-Acetylquestiomycin A (ММ – 254,06853 Да) и Butyrolactol A (ММ – 526,31815 Да), гербицидом Herboxidiene (ММ – 438,29712 Да), ингибиторами эстеразы Ebelactone B (ММ – 352,26062 Да) и желудочной АТФазы A 88696F (ММ – 362,24265 Да), а также нематоцид и митицид

Milbemycin β 5 (ММ – 528,33982 Да), цитотоксичным агентом Furaquinocin E (ММ – 384.15915).

Особенно стоит отметить, что при температуре 37°C термофильный штамм *Streptomyces* синтезировал 194 соединения, которые не были обнаружены при 13°C и 28°C. Большинство идентифицированных соединений являются антибиотиками – Antibiotic FL 120B (ММ – 422,11222 Да), Antibiotic JI 20B (ММ – 495,29502 Да) и Antibiotic GEX 1Q3 (ММ – 614,32651 Да). Также присутствовали фитотоксины Thaxtomin C (ММ – 392,14618 Да) и Thaxtomin A; 3,3"-Dideoxy (ММ – 406,16214 Да), противогрибковый агент Venturicidin X (ММ – 576,4015 Да), альгицид Vaccenic acid (ММ – 282,25528 Да), антиоксидант Carbazomycin B (ММ – 241,10959 Да), ингибиторы гликозидазы Palatinol C (ММ – 278,15137 Да), деформилазы Antibiotic Sch 382583 (ММ – 411,27628 Да) и панкреатической липазы Lipstatin (ММ – 491,35999 Да).

Антимикробная активность была отмечена против роста *Bacillus subtilis* при 28°C на средах SM17 и SM27, при 37°C на средах SM1, SM12, SM17, SM20, SM25 и NL19, при 45°C на средах SM17 и NL19.

Активность против роста *Mycobacterium smegmatis* была при 28°C, 37°C, 45°C и 55°C на средах SM17 и NL19, против роста *Staphylococcus carnosus* при 28°C на среде NL19. Также, при температуре 37°C антимикробная активность была зафиксирована против роста *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida* и *Candida glabrata* на среде SM17.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал), Гранта Президента РФМК-1245.2021.1.4. и Грантов Иркутского государственного университета, направленных на поддержку молодых ученых.

Библиографический список

1. Тимошкин О. А. Озеро Байкал: разнообразие фауны, проблемы ее не смешиваемости и происхождения, экология и «экзотические» сообщества // Аннотированный список фауны озера Байкал и его водосборного бассейна. – 2001. – Т. 1. – №. 1. – С. 16.
2. Chen G. Q., Jiang X. R. Next generation industrial biotechnology based on extremophilic bacteria // Current opinion in biotechnology. – 2018. – V. 50. – P. 94-100.
3. Katz L., Baltz R. H. Natural product discovery: past, present, and future // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2016. – V. 43. – №. 2-3. – P. 155-176.
4. Larsson D. G., Flach C. F. Antibiotic resistance in the environment // Nature Reviews Microbiology. – 2022. – V. 20. – №. 5. – P. 257-269.
5. Mohammadipanah F., Wink J. Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity // Frontiers in microbiology. – 2016. – V. 6. – P. 1541.

ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ГЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Баданина Д.М.¹, Конторщикова К.Н.^{1,2}

¹ *Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

² *Приволжский исследовательский медицинский университет Минздрава России, Нижний Новгород, Россия*

Аннотация. Высокая метаболическая активность головного мозга приводит к непрерывному образованию активных форм кислорода, которые в избытке могут вызывать онкогенную трансформацию ткани. Данное исследование ставит целью анализ окислительной и антиоксидантной активности в тканях глиальных новообразований головного мозга различной степени злокачественности. Использовали послеоперационный материал 20 пациентов с глиомами разной степени анаплазии до терапии и ткань мозга 6 лиц, погибших в результате травмы, в качестве контроля. В работе использовали методы: индуцированной биохемилюминесценции, оценки активности супероксиддисмутазы, продуктов перекисного окисления липидов. Установлено возрастание свободнорадикальной активности по мере трансформации ткани. Установлено возрастание содержания продуктов перекисного окисления липидов при всех степенях анаплазии. Показано увеличение активности супероксиддисмутазы в перитуморальной зоне при Grade IV в 2 раза по сравнению с опухолевой тканью.

Ключевые слова: свободнорадикальное окисление; перекисное окисление липидов; супероксиддисмутазы; глиома; канцерогенез.

THE MAIN CHARACTERISTICS OF THE FREE RADICAL PROCESSES IN BRAIN GLIAL NEOPLASMS

Badanina D. M.¹, Kontorshhikova K. N.^{1,2}

¹ *N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia*

² *Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russia*

Abstract. The brain has an extremely high metabolism that leads to the infinite production of the reactive oxygen species that in abundance cause an oncogenic transformation in tissue. The aim of the research was to analyze the free radical and antioxidant system activity in the different grade gliomas in the brain tissues. We used the postoperative material of twenty patients with different grade glioma before therapy and the brain tissue from six died persons as a control. The major used methods were the methods of the induced biochemiluminescence, the superoxide dismutase activity

assessment and the assessment of the lipid peroxidation products. The free radical activity intensifies through the transformation process. The products of the lipid peroxidation have the increase in the tumor tissue in all grades. The superoxide dismutase activity doubles in the peritumoral zone in Grade IV glioma.

Keywords: free radical oxidation; lipid peroxidation; superoxide dismutase; glioma; carcinogenesis.

Головной мозг имеет чрезвычайно высокий метаболизм, и около одной пятой потребляемого кислорода расходуется на его жизнедеятельность. Такой сценарий приводит к непрерывному производству активных форм кислорода, которые в норме, в небольших количествах, участвуют в сигналинге и экспрессии генов нейронов, обеспечивают синаптическую пластичность гиппокампа. Избыток же является нейротоксичным и индуцирует генетические изменения, приводящие к онкогенезу [1].

Результаты исследований в экономически развитых странах свидетельствуют о росте заболеваемости первичными злокачественными новообразованиями головного мозга, а глиобластомы составляют около 57% всех глиом и примерно 48% всех первичных злокачественных опухолей. Заболеваемость четко коррелирует с возрастом пациента, сдвигая эти рамки в сторону омоложения, а прогноз остается неблагоприятным, несмотря на достижения и разработки различных методик последнего десятилетия [2].

В течение многих лет активные формы кислорода (АФК) рассматривались как важные факторы канцерогенеза, особенно на этапах инициации и развития опухоли. Эти высокореактивные молекулы, вырабатываемые митохондриями, пероксисомами и эндоплазматическим ретикулумом, обладают довольно необычным спектром действия: АФК вызывают как проонкогенные, так и противоопухолевые эффекты. Небольшое смещение окислительного баланса в сторону окислительного стресса активирует сигнальные пути пролиферации, вызывает повреждения ДНК и способствует метаболическому перепрограммированию клеток, что характерно при малигнизации ткани. В то же время чрезмерное накопление АФК ускоряет и противоопухолевые эффекты, в частности остановку клеточного цикла и гибель клеток [3].

Целью настоящей работы явился анализ окислительной и антиоксидантной активности в тканях новообразований головного мозга различной степени злокачественности.

В исследовании использовали послеоперационный материал 20 пациентов (39-61 лет) с глиомами разной степени анаплазии: Grade II – 7 пациентов; Grade III – 4 пациента, Grade IV – 9 пациентов до проведения противоопухолевой терапии. Контроль – ткань мозга лиц, погибших в результате травмы – 6 человек: 4 мужчины, 2 женщины (31-56 лет). Гистологический диагноз установлен по классификации ВОЗ опухолей ЦНС [4]. Гомогенат тканей для биохимических исследований готовили при температуре 0°C, после отмывки в 0,32 М растворе сахарозы, рН = 7,4, в 10-кратном объеме среды выделения, содержащей 0,32 М сахарозу, 10 мМ трис-НСl и 1 мМ ЭДТА, рН=7,4. Интенсивность свободнорадикального окисления измеряли с помощью программно-методического комплекса биохемилюминесцентного анализа БХЛ-07 («Медозонс», Нижний Новгород, Россия) методом Fe-индуцированной биохемилюминесценции по интенсивности максимальной вспышки (I_{max}) и общей антиоксидантной активности (Z) [5]. Оценку продуктов перекисного окисления липидов проводили по Волчегорскому И.А. с соавт. (1989) и Mihara M. с соавт. (1980), основанную на поглощении липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовом и зелёном спектре [6,7]. Активность супероксиддисмутазы

устанавливали по скорости торможения ферментом восстановления бесцветных тетразолиевых солей в окрашенные формазаны [8]. Количество фермента пересчитывали на 1 г белка, который определяли методом Лоури с использованием набора реактивов ООО «Фирма Синтакон», Россия. Исследование одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава РФ (№6 от 17.04.2019 г.). Пациенты были проинформированы и подписали согласие на включение в исследование.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием компьютерной программы StatTech v. 2.4.8 (ООО «Статтех», Россия). Количественные показатели оценивались на предмет соответствия нормальному распределению с помощью критерия Шапиро-Уилка. В случае отсутствия нормального распределения количественные данные описывались с помощью медианы (Me) и нижнего и верхнего квартилей (Q1 – Q3). Сравнение двух групп выполнялось с помощью U-критерия МаннаУитни. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

Свободнорадикальная активность во всех исследованных зонах опухоли при всех степенях анаплазии была значимо выше, чем в контрольной группе (табл.1).

Таблица 1 – Показатели биохимилюминесценции в тканях глиом различной степени анаплазии (Me (Q1-Q3), n=20)

Показатель	Степень анаплазии			Контроль (n=6)
	Grade II (n=7)	Grade III (n=4)	Grade IV (n=9)	
I _{max} здоровой ткани, мВ	253,0 (236,0-282,5)*	129,5 (127,8-133,8)*	269,0 (156,0-287,0)*	113,0 (102,5-122,0)
I _{max} перитуморальной зоны, мВ	198,0 (184,5-260,0)*	196,0 (165,0-224,3)**	292,0 (217,0-313,0)*	
I _{max} опухолевой ткани, мВ	424,0 (227,5-455,5)*	193,0 (169,3-230,3)**	366 (330,0-412,0)**	
Z здоровой ткани, усл.ед.	3,4 (3,3-3,8)	3,4 (3,2-4,0)	3,7 (3,6-3,9)	3,1 (2,8-3,5)
Z перитуморальной зоны, усл.ед.	3,2 (2,9-3,4)	3,8 (3,6-4,2)	3,9 (3,8-4,0)*	
Z опухолевой ткани, усл.ед.	3,5 (3,1-3,7)	3,8 (3,3-4,0)	4,1 (3,9-5,8)*	

* – статистически значимые различия по сравнению с тканью головного мозга практически здоровых людей (контрольная группа) ($p < 0,05$)

** – статистически значимые различия по сравнению с тканью головного мозга контрольной группы и со здоровой тканью ($p < 0,05$)

Однако, при сравнении в отдельных зонах опухолевой ткани выявлены отличия при разных степенях анаплазии глиом. При Grade II, когда метастазирование опухоли не наблюдалось, исследуемый показатель ткани перитуморальной зоны значимо не отличался от такового в непоражённой ткани (табл. 1). При Grade IV, когда происходил процесс активной инвазии и метастазирования, свободнорадикальная активность в перитуморальной зоне имела тенденцию к повышению по сравнению со здоровой тканью, а в опухолевой зоне значимо увеличивалась. При Grade III отмечается усиление свободнорадикальных процессов в перитуморальной зоне по сравнению с интактной.

При анализе показателя Z отмечается тенденция к усилению антиоксидантной защитной системы по мере трансформации здоровой ткани в опухолевую, причём значимые отличия были выявлены при сравнении с контрольной группой Grade III и Grade IV опухолевой ткани (табл. 1). Вероятно, повышение активности антиоксидантной системы при всех степенях анаплазии связано с увеличением пула активных форм кислорода, которые особенно представлены в низкодифференцированных новообразованиях.

Таким образом, по мере трансформации ткани в опухолевую происходит усиление свободнорадикальной активности, что повышает восприимчивость клеток к перестройкам генома. Также вероятно, что такое событие необходимо для усиленной пролиферации глиом Grade II и активной инвазии, и метастазирования глиом Grade III и IV [9].

Оценка продуктов перекисного окисления липидов показала, что статистически значимые различия наблюдались для всех исследуемых продуктов перекисного окисления липидов в опухолевой ткани: диеновых и триеновых конъюгатов, оснований Шиффа и малонового диальдегида по сравнению с таковыми в ткани головного мозга практически здоровых людей при всех степенях анаплазии (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание продуктов перекисного окисления липидов в ткани глиом различной степени анаплазии ((Me (Q1-Q3), n=20)

Степень анаплазии	Диеновые конъюгаты, усл.ед.	Триеновые конъюгаты, усл.ед.	Основания Шиффа, усл.ед.	Малоновый диальдегид, мкМ/л
Grade II (n=7)	10,57 (10,12-11,07)*	7,45 (6,93-7,97)*	1603,14 (1495,48-1905,12)*	32,41 (18,52-46,27)*
Grade III (n=4)	9,14 (4,93-9,55)*	7,88 (4,21-9,58)*	1035,68 (509,57-1684,53)*	65,84 (30,13-72,39)*
Grade IV (n=9)	10,44 (10,07-10,95)*	7,99 (6,93-9,00)*	1671,54 (1601,16-1715,44)*	50,78 (48,49-53,99)*
Контроль (n=6)	0,17 (0,13-0,23)	0,15 (0,10-0,21)	3,23 (2,97-3,36)	8,60 (7,94-9,38)

* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p<0,05)

Наблюдается увеличение содержания диеновых и триеновых конъюгатов в опухолевой ткани различной степени злокачественности почти в 55 и 47 раз соответственно по сравнению с тканью головного мозга практически здоровых людей. Основания Шиффа наиболее представлены при Grade IV, что является следствием повышенного количества реактивных молекул в таком типе опухоли, способных инициировать перекисное окисление липидов. Концентрация малонового диальдегида повышается в 3,7 раз при Grade II, в 7,6 раз при Grade III и в 5,9 раз при Grade IV (табл. 2). Таким образом, повышенное содержание продуктов реакции пероксидации липидов коррелирует со степенью малигнизации ткани и исходно связано с высоким уровнем полиненасыщенных жирных кислот, которые являются мишенями для свободнорадикального перекисного окисления липидов, в тканях головного мозга.

Анализ активности супероксиддисмутазы (СОД) по Nishikimi M. в модификации Е.Е. Дубининой свидетельствует о тенденции к увеличению активности, но усиление работы фермента в непоражённой ткани головного мозга и перитуморальной зоне при Grade II значимо не отличалось от таковой в контрольной группе (табл. 3).

Таблица 3 – Активность супероксиддисмутазы (А) в ткани глиом различной степени анаплазии (Ме (Q1-Q3), n=20)

Степень анаплазии	А в здоровой ткани, усл.ед./мг. белка	А в перитуморальной зоне, усл.ед./мг. белка	А в опухолевой ткани, усл.ед./мг. белка	Контроль (n=6)
Grade II (n=7)	5,50 (2,81-7,50)	3,03 (2,26-4,90)	19,06 (15,48-26,13)* °°	5,52 (4,90-6,29)
Grade III (n=4)	19,61 (16,60-22,43)*	9,98 (9,48-10,76)°°	62,26 (43,09-83,54)* °°	
Grade IV (n=9)	34,62 (33,08-38,18)*	61,12 (48,49-71,94)*°°	31,13 (19,30-37,05)*	

* – статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой (p<0,05);

°° – статистически значимые различия по сравнению со здоровой тканью (p<0,05)

Однако, в опухолевой ткани и при Grade II значимо наблюдалось усиление активности по сравнению с интактной и перитуморальной зоной в 6 раз. При Grade III активность СОД в перитуморальной зоне значимо не отличалась от значений контрольной группы и была ниже, чем в неповреждённой ткани мозга, но при Grade IV, которой характерны высокая агрессивность и активная инвазия в окружающие ткани, активность фермента была приблизительно в 2 раза выше в перитуморальной зоне по сравнению с опухолевой и интактной тканью. Считается, что перитуморальная зона является своеобразным плацдармом, с которого начинается опухолевый рост и инвазия клеток [10]. Следует отметить, что значимые различия при Grade IV были выявлены во всех типах ткани по сравнению с контрольной группой (табл. 3).

Таким образом, выявлено, что свободнорадикальные процессы усиливаются по мере трансформации ткани при всех степенях анаплазии. Это увеличивает и количество продуктов перекисного окисления липидов в опухолевой ткани. Также отмечается возрастание активности супероксиддисмутазы в опухолевой ткани при всех степенях анаплазии, но при Grade IV показано усиление работы фермента в 2 раза в перитуморальной зоне по сравнению с опухолевой тканью, что делает возможным ассоциацию перитуморальной зоны с инфильтративной активности глиомы.

Библиографический список

1. Jaganjac M., Cindrić M., Jakovčević A., Žarković K., Žarković N. Lipid peroxidation in brain tumors // *Neurochem. Int.*–2021.–V.149.–№105118.–P. 1-12.
2. Arvanitis C.D., Ferraro G.B., Jain R.K. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases // *Nat. Rev. Cancer.*–2020.–V.20.–№28.–P. 26-41.
3. Slika H., Mansour H., Wehbe N., Nasser S.A., Iratni R., Nasrallah G., Shaito A., Ghaddar T., Kobeissy F., Eid A.H. Therapeutic potential of flavonoids in cancer: ROS-mediated mechanisms // *Biomed. Pharmacother.*–2022.–V.146.–№5.–P. 1-12.
4. Louis D.N. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Central nervous system tumours. 5th ed. // Agency for Research on Cancer: Lyon, France.–2021.–V.6.

5. 5. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V. Free radicals and cell chemiluminescence // *Succ. Biol. Chem.*–2009.–V.49–P. 341–388.
6. 6. Taïb B., Aboussalah A.M., Moniruzzaman M., Chen S., Haughey N.J., Kim S.F., Ahima R.S. Lipid accumulation and oxidation in glioblastoma multiforme // *Sci. Rep.*–2019.–V.9.–№12.–P. 1-14.
7. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication and vitamin E deficiency // *Biochem. Med.*–1980.–V. 23.–№3.–P. 302–311.
8. Nishikimi M., Appa N., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenacine methosulfate and molecular // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–1972.–V.46.–№3.–P. 849-854.
9. 9. Ramalingam V., Rajaram R. A paradoxical role of reactive oxygen species in cancer signaling pathway: Physiology and pathology // *Process Biochem.*–2021.–V.100.–№1.–P. 69-81.
10. Brown J.M. Radiation damage to tumor vasculature initiates a program that promotes tumor recurrences // *Int. J. Radiat. Oncol.*–2020.–V.108.–P.734-744.

ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ОЖИРЕНИЯ У СТУДЕНТОВ

Берсенева А.А.¹, Комарова Л.Н.¹, Выпова Е.Р. Купцова П.С.^{1,2}

¹ *Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия*

² *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), Обнинск, Россия*

Аннотация. Проведен ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа респондентов по генам FTO, PPARG, ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению.

Ключевые слова: ген, полиморфизм, ожирение, индекс массы тела.

STUDIES OF GENETIC VARIANTS OF OBESITY GENES IN STUDENTS

Berseneva A.A.¹, Komarova L.N.¹, Vypova E.R. Kuptsova P.S.^{1,2}

¹ *Obninsk Institute of Atomic Energy – branch National Nuclear Research University «MEPhI», Obninsk, Russia*

² *Medical Radiological Research Center. A.F. Tsyba – branch of the federal state budgetary institution «National Medical Research Center for Radiology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (MRC named after A.F. Tsyba – branch of the Federal State Budgetary Institution «National Medical Research Center for Radiology» of the Ministry of Health of Russia), Obninsk, Russia*

Abstract. A real-time PCR analysis was carried out to determine the genotype of the respondents for the FTO, PPARG, ADRB2, ADRB3 genes responsible for the genetic predisposition to obesity.

Keywords: gene, polymorphism, obesity, body mass index.

По данным Всемирной Организации Здравоохранения в 2016 году около 41 миллиона детей в возрасте до 5 лет имели избыточный вес или ожирение. Избыточный вес и ожирение, ранее считавшиеся характерными для стран с высоким уровнем дохода, теперь становятся все более распространенными в странах с низким и средним уровнем дохода, особенно в городах [1]. Ожирение и связанные с ним заболевания сокращают продолжительность жизни на 0,9–4,2 года (параметры варьируются по странам). У людей с повышенной массой тела часто

наблюдаются нарушения опорно-двигательной системы (в особенности остеоартрит – крайне инвалидизирующее дегенеративное заболевание суставов); некоторые онкологические заболевания (в т. ч. рак эндометрия, молочной железы, яичника, предстательной железы, печени, желчного пузыря, почки и толстой кишки). Растущая заболеваемость населения увеличивает расходы на медицинскую помощь, приводит к сокращению продолжительности и ухудшению качества жизни людей. Ожирение все больше обозначается как социально значимое заболевание [2]. Поэтому раннее выявление ожирения и наследственной предрасположенности к нему является важным для здоровья каждого человека [3].

Сегодня, в некоторых странах проблема состоит в том, чтобы избежать неумеренного потребления чрезмерно калорийной пищи [2]. Однако ожирение не всегда связано с излишним потреблением продуктов питания. Следует учитывать генетическую предрасположенность к ожирению. Всем известно, что при употреблении пищи, одинаковой по энергоценности, одни люди прибавляют в весе, а другие нет.

Проблема генетического полиморфизма ДНК является одной из актуальнейших проблем в современной медицинской генетике. В связи с этим, количество исследований, связанных с анализом генетической предрасположенности, интенсивно увеличивается [3]. На основании аллельного профиля генов-кандидатов возможно выявлять наследственные особенности у конкретного человека, а, следовательно, определить предрасположенности человека к определенным болезням. В настоящее время проводится множество исследований для определения генов предрасположенности к ожирению, анализируются взаимосвязи полиморфизмов генов с различными компонентами метаболического синдрома [4]. Известны десятки полиморфизмов (вариабельных участков) генов, ассоциированных с предрасположенностью к ожирению [5]. Для анализа на полиморфность генов ассоциированного с жировой массой было обследовано 95 студентов ИАТЭ НИЯУ МИФИ. Перед проведением анализа у всех обследуемых лиц провели антропометрические измерения – измеряли рост вес и, исходя из этих данных, для каждого рассчитывали индекс массы тела (ИМТ). По результатам обследования большая часть обследуемых лиц – это 72,3% студентов имеют нормальную массу тела, избыточную массу тела имеет 15,6% от всех обследуемых лиц, 14,1% студентов имеют дефицит массы тела, ожирение 1 степени имеет 4,3% от всех обследуемых лиц. Для уточнения значения ИМТ у всех обследуемых лиц определили тип распределения жира в организме человека. Из полученных результатов выявлено, что 87,5% обследуемых лиц имеет гиноидный тип распределения жира в организме, что может свидетельствовать о нарушении липидного обмена в организме человека. 12,5% студентов имеют промежуточный тип распределения жира в организме, что также может свидетельствовать о нарушении липидного обмена.

Для всех обследуемых лиц мы провели ПЦР-анализ в режиме реального времени для определения генотипа по генам FTO, PPARG, ADRB2, ADRB3, ответственных за генетическую предрасположенность к ожирению. Для выделения ДНК из соскобов со слизистой оболочки щеки использовали коммерческий набор «S-Corb» (Синтол). Диагностические наборы для выявления полиморфизмов в геноме человека методом ПЦР «SNP-Скрин» в режиме реального времени были получены в фирме «Синтол». Система «SNP-Скрин» представляет собой комплект реагентов для выявления мутаций (полиморфизмов) в геноме человека. Анализу подвергается геномная ДНК человека, выделенная из букального эпителия.

По результатам ПЦР-анализа можно было определить: нормальный вариант полиморфизма генов (мутация отсутствует), мутация в гетерозиготной форме (в одном из

парных генов), мутация в гомозиготной форме (в обоих парных генах). Результаты представлены в таблице.

Таблица – Распределение генетических вариантов

	FTO (rs9939609)	PPARG (rs1801282)	ADRB2 (rs1042713)	ADRB3 (rs4994)
Гомозигота по аллели 1 (мутация отсутствует)	33%	69%	8%	92%
Гетерозигота	49%	28%	44%	8%
Гомозигота по аллели 2	18%	3%	48%	0%

По результатам анализа 33% студентов имеют нормальный вариант гена FTO, что говорит о том, что у них низкий риск развития ожирения и сахарного диабета 2 типа. Распространенным вариантом было отсутствие полиморфизма rs1801282 в гене PPARG, что говорит о нормальном жировом обмене у этих студентов. Как видно из таблицы 1., у 92% студентов присутствует мутация в гене ADRB2 (44% в гетерозигот, 48% гомозигот) и у них есть генетическая предрасположенность к ожирению. Это может говорить о том, что при несбалансированном питании, низкой физической активности и других факторах у них есть риск развития ожирения и других заболеваний, связанных с ожирением. 8% студентов, имеют мутацию в гене ADRB3 в гетерозиготной форме, что говорит о генетической предрасположенности к ожирению, данный вариант гена указывает на понижение показателей энергетического метаболизма.

Результаты исследования свидетельствуют о перспективности выбранного направления. Так как, раннее выявление генетической предрасположенности, в данном случае к ожирению, а также и к другим видам заболеваний, позволит своевременно принимать меры по недопущению развития патологических состояний, вовремя корректировать изменение состояния, что позволит вести здоровый образ жизни на протяжении многих лет. Ранняя диагностика генетической предрасположенности к ожирению, поможет людям внимательнее относиться к своему здоровью, не допустить развитие некоторых заболеваний и избежать изнуряющих диет.

Библиографический список

1. Информационный бюллетень ВОЗ «Ожирение и избыточный вес». Июнь 2021.
2. Дедов И. И. Проблема ожирения: от синдрома к заболеванию //Ожирение и метаболизм. – 2006. – №. 1. – С. 2-4.
3. Маркова Т. Н. и др. Популяционно-генетический анализ распространенности ожирения в Чувашской Республике //Проблемы эндокринологии. – 2010. – Т. 56. – №. 4. – С. 16-19.
4. Бородин, С.В., и др. Генетические предикторы развития ожирения. // Ожирение и метаболизм. – 2016. –Т.13. – №2. – С.7-13.
5. Насибулина Э. С. и др. Ассоциация полиморфизма гена FTO с избыточной массой тела в российской популяции //Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. 93. – №. 5. – С. 823-826.

СОВРЕМЕННЫЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ГИПОТЕЗЫ СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ

Благодурова А.С., Сафаралиева С.А.

Смоленский государственный медицинский университет, Смоленск, Россия

Аннотация. На сегодняшний день нет единого мнения об этиологии и патогенезе синдрома хронической усталости, ведь его симптомы сходны с многими заболеваниями, что вызывает большие трудности при диагностике. Ранняя диагностика и быстрое лечение имеют решающее значение для предотвращения высокой заболеваемости и ее подавляющего влияния на качество жизни. Поэтому выявление механизмов развития болезни может помочь в постановке диагноза, а также при составлении плана лечения. В работе представлен обзор современных исследований об этиологии и патогенезе СХУ.

Ключевые слова: синдром хронической усталости, нарушения, вирусная гипотеза, психоэмоциональное расстройство, иммунная дисфункция, нейроэндокринные расстройства.

MODERN ETIOLOGICAL HYPOTHESES OF CHRONIC FATIGUE SYNDROME

Blagodurova A.S., Safaraliev S.A.

Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

Abstract. To date, there is no consensus on the etiology and pathogenesis of chronic fatigue syndrome, because its symptoms are similar to many diseases, which causes great difficulties in diagnosis. Early diagnosis and prompt treatment are critical to prevent high morbidity and its overwhelming impact on quality of life. Therefore, the identification of the mechanisms of the development of the disease can help in the diagnosis, as well as in the preparation of a treatment plan. The paper presents an overview of current research on the etiology and pathogenesis of CFS.

Keywords: chronic fatigue syndrome, disorders, viral hypothesis, psycho-emotional disorder, immune dysfunction, neuroendocrine disorders.

Синдром хронической усталости (СХУ) представляет собой сложное мультисистемное заболевание, обычно характеризующееся сильной утомляемостью, когнитивной дисфункцией, проблемами со сном, вегетативной дисфункцией, а также недомоганием после физической нагрузки, серьезно ухудшающим повседневную деятельность. С синдромом хронической усталости все чаще встречаются пациенты независимо от их местожительства. Так в Великобритании зафиксировано около 0,2% заболевших СХУ среди лиц в возрасте от 18 до 64 лет [15], в Южной Корее – около 0,6% [11], в штате Чикаго (США) – около 0,42% [9].

Распространенность СХУ сегодня очень велика и является одной из наиболее актуальных проблем мировой практики. Клиническо-практикующие врачи не придают должного значения актуальности проблемы, тяжести патологии, а между тем, болезнь продолжает развиваться, человеку становится трудно выполнять необходимый объем работы, что приводит к снижению производительности труда. Однако разные авторы исследуют и дают результаты по различным направлениям этиологии и патогенезу, а единой стройной системы патогенеза синдрома хронической усталости на данный момент нет, что и послужило целью нашей работы. Цель нашей работы, на основании анализа литературных данных – выявить основные современные подходы к этиологии и патогенезу СХУ.

Вряд ли какой-либо другой диагноз в медицине обсуждался так бурно, как СХУ за последние 25 лет. Текущая компиляция, основанная на информации о пациентах, содержит список из более 67 названий болезней (Институт медицины (США), 2015 г.). В англоязычных странах широко распространен термин «миалгический энцефаломиелит», в свою очередь ВОЗ классифицировала СХУ – МКБ-10 как заболевание нервной системы в соответствии, включая синдром поствирусной усталости и иммунной дисфункции.

Но, несмотря на многочисленные различия, большинство определений содержат следующие общие симптомы:

- усталость или утомление продолжается в течение длительного времени (обычно > 6 месяцев);
- можно определить протяжение утомляемости (начало и конец), т.е. она продолжается не всю жизнь;
- утомляемость настолько выражена, что приводит к значительному нарушению физических, эмоциональных и социальных функций, снижая качество жизни.
- стрессовая ситуация (физическая, а также умственная или эмоциональная) усугубляет утомляемость;
- нет альтернативного объяснения (физического или психического расстройства).

В качестве дополнительных симптомов названы ортостатические жалобы, а также скелетно-мышечные боли, невозстанавливающий сон, нейрокогнитивные расстройства, иммунологические отклонения. Но диагностического эталона все-таки не существует, поэтому необходимо тщательно рассматривать сочетания симптомов и тестов (лабораторных исследований, психологических и др.). Но на основании одних симптомов нельзя описать этиологию и патогенез болезни. Необходимо найти причины возникновения болезни, факторы воздействия, механизмы развития и исхода болезни.

Современные исследователи предлагают различные этиологические гипотезы возникновения СХУ (психологическая, иммунная, инфекционная, эндокринная, обменная, неврологическая, дисфункция мозга), объясняя их механизмы, но сих пор идет спор о причинах и причинно-следственных связях СХУ.

Психологические расстройства

Общим механизмом развития СХУ является нарушение деятельности многих систем организма, обеспечивающих адаптацию организма к сложным жизненным ситуациям. У человека появляется неадекватное поведение, нервная напряженность, стресс с эндокринными, вегетативными и другими проявлениями.

Частота смены настроения, нарушения сна и др., наблюдаемые у пациентов СХУ, привели исследователей к мысли о том, что СХУ является первичным аффективным расстройством. От 50% до 75% пациентов СХУ страдают психическими расстройствами [1].

Существуют три основных фактора, которые определяют этиологию и патогенез психологических расстройств: психотравмирующее переживание, особенности личности и наследственность. Остановимся на некоторых психологических расстройствах.

Одним из таких расстройств является *депрессия* – психическое расстройство, с устойчивым упадком настроения, сопровождающееся двигательной заторможенностью и нарушениями мышления. Причинами, как правило, являются психотравмирующие ситуации, соматические заболевания, злоупотребление алкоголем, наркотиками, нарушение обменных процессов в головном мозге, а также недостаток солнечного света.

В современных исследованиях есть предположение, что аномальная активность цитокинов, генерируемая иммунной системой, действует внутри центральной нервной системы, напрямую или через другие системы, и является основой в симптоматике пациентов СХУ. Так автор E. Ur и др. выдвинули гипотезу, что активация цитокинов в головном мозге ответственна за гиперактивность кортикотропин-рилизинг-гормона, обнаруженного при депрессии [20].

Другое состояние психологического расстройства – *стресс* – это неспецифическая стандартная реакция организма на действие разнообразных раздражителей. Если действие раздражителя не чрезмерно сильно и длительно, гормоны гипофиза помогают организму адаптироваться, если действие чрезмерно – наступает болезнь или смерть.

В подтверждение прямого отношения психологических расстройств к этиологии и патогенезу СХУ проведено много исследований. Авторы M. Irwin и др., показали в своих работах, что иммунная функция может быть подавлена различными стрессовыми факторами. У людей, страдающих СХУ отмечается влияние стресса на скорость снижения активности НК-лимфоцитов. Степень тяжести депрессии также коррелирует со степенью нарушения активности НК-клеток [8].

Какова бы ни была психиатрическая причина, такие симптомы, как нарушение памяти и внимания указывают на то, что у пациентов СХУ есть нарушения в центральной нервной системе. Поэтому оценка функционирования ЦНС является приоритетной задачей исследований. Так, исследование с использованием однофотонной эмиссии компьютерной томографии (ОФЭКТ) и позитронной эмиссии томографии (ПЭТ) выявило изменения различной степени тяжести у 80% пациентов СХУ: снижение церебрального кровотока, вовлекающее лобные, височные, теменные и затылочные доли и базальные ганглии. Но такие симптомы могут также встречаться при серьезных аффективных расстройствах [10].

Автор Costa et al. сообщает об изменениях ОФЭКТ у пациентов СХУ, которое свидетельствует о значительном снижении перфузии в гипоталамусе [Costa D.C., 1992]. Доказательства того, что нейроиммуномодуляции могут влиять на понимание СХУ приведено и на гистологическом уровне, например, показаны микроскопические связи между нервными и иммунными клетками в присутствии пептида, связанного с геном кальцитонина (иммуномодулирующий нервный продукт), который явно свидетельствует о нейрорегуляции иммунной функции [2]. И дальнейшие исследования нейроиммунологии могут указать на природу, степень взаимодействия нервной и иммунной систем при СХУ.

Вирусная гипотеза

На сегодняшний день существуют много подтверждений развития СХУ у пациентов с вирусной инфекцией, например, хронической вирусной инфекцией Эпштейна-Барра [17], при хроническом энтеровирусе (вирус Коксаки) [19], вирусе герпеса человека 6 типа (HHV-6) [3], также при человеческом Т-лимфотропном вирусе типа II (HTLV-II) при этой инфекции последовательности ДНК HTLV-II гена были обнаружены у 78% пациентов СХУ в сравнении со здоровыми [5].

По мнению авторов, большая часть патогенов, обнаруженных у пациентов СХУ, представляют собой не начальную острую инфекцию, а скорее реактивацию различных видов герпесвирусов хронических микоплазменных инфекций. Вот они-то и связаны с ухудшением состояния иммунной системы, и, как следствие, с самочувствием пациента, а сами вирусы инфекции не столь серьезно влияют на здоровье.

Таким образом, главная идея вирусной гипотезы СХУ заключается в том, что патогенез заболевания непосредственно связан с процессом выброса цитокинов, продуцируемых иммунным ответом на патогены, которые вызывают вторичную дисфункцию головного мозга.

Хроническая иммунная дисфункция

Синдром хронической усталости, безусловно, является стрессовым фактором воздействия на организм. Результатом его воздействия является повышенная выработка АКТГ, постоянное выделение большого количества глюкокортикоидов и катехоламинов, что ведет к деградации лимфоидной ткани тимуса, формируется вторичный иммунодефицит – одно из осложнений, длительных истощающих стресс, опасный в отношении формирования заболеваний или обострения хронической патологии, в том числе и СХУ.

Существует большое число пусковых механизмов, вызывающих иммунологические реакции, которые вовлекают различные типы клеток крови и малых молекул.

В подтверждении иммунологической гипотезы D.C. Klonoff предполагает, что какой-либо антиген вызывает иммунный ответ, в следствие действия которого, происходят сбои в работе организма, СХУ связан с аллергией, так как около 65% больных имеют в анамнезе преморбидную ингаляционную, пищевую или лекарственную аллергию [13].

Исследования показывают, что у пациентов с СХУ уровни антител к вирусным антигенам выше нормы, а количество и цитотоксичность естественных киллеров (NK) клетки уменьшена. [4].

Можно сказать, о снижении уровня в сыворотке некоторых IgG (при нормальном уровне общего IgG), ограничении клеточной пролиферации в ответ на митогены-2, замедление чувствительности на кожу, аномалии цитокинов (например, интерлейкин -1, интерлейкин -2, фактор некроза опухоли альфа и интерферон), повышенной продуктивности активированных Т-клеток и макрофагов [12].

Авторами A. Landay и др. было обнаружено значительное сокращение популяции супрессорных клеток CD8 и увеличение маркеров активации (CD38, HLA-DR) на клетках CD8 и предположено, что гиперактивная иммунная система при СХУ дает аутоиммунный ответ [14]. Исследователь A. Loyd обращает внимание на нарушение ответа лимфоцитов на фитогемагглютининовую стимуляцию и снижение (отсутствие) реакций на кожу у пациентов с СХУ [15].

У пациентов с СХУ также были отмечены повышенная дифференциация периферийных Т-лимфоцитов и снижение пролиферативного ответа на антигены [17].

Обобщая сказанное, представим основные иммунологические показатели при СХУ (см. таблица).

Таблица – Основные иммунологические показатели при СХУ

Параметры	Снижены	Норма	Повышены
1. Т-хелперы			+
2. Т-супрессоры		+	
3. ТХ/ТС			+
4. HLADR/CD8 (активированные ТС)			+
5. CD38/CD8 (активированные ТС)			+
6. CD3/CD56 (NK-клетки)	+		
7. CD56 (NK-клетки)	+		
8. Интерлейкин-2 рецептор			+
9. Активность NK-клеток	+		
10. Митогенный ответ лимфоцитов	+		
11. Гуморальный иммунитет	+		
12. Секреторный IgA в слюне	+		
13. Иммунные комплексы			+
14. Тканевые и белковые антитела			+
15. Вирусные антитела			+
16. Грибковые антитела			+

Нейроэндокринные расстройства

Такие клинические проявления СХУ, как усталость и недомогание, имеют сходство с глюкокортикоидным дефицитом. Поэтому возникло предположение что у пациентов СХУ имеется функциональная аномалия гипоталамо-гипофизарной системы, вызывающая вторичное нарушение функции надпочечников. Аномальный уровень кортикостероидов приводит к нарушению функций иммунной системы. Эта теория имеет некоторые подтверждения при наблюдении за пациентами с симптомами СХУ, у которых имелись физиологические изменения. В исследованиях Demitrack отмечен пониженный уровень кортикостерона в плазме и пониженная чувствительность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси у пациентов СХУ. При введении низких доз АКТГ приводило к повышению высвобождения кортизола, а введение КРГ приводило к притуплению АКТГ-ответа, исключающего возможность первичной недостаточности надпочечников, также авторы отметили повышение базального уровня АКТГ в плазме, исключая первичную проблему гипофиза. Эти данные позволяют предположить, что КРГ гипоталамуса может быть центральным локусом дисфункции при СХУ. При этом пациенты не имеют такого нейрогормонального профиля, как пациенты с первичной депрессией (высокий уровень кортизола, нормальный АКТГ) [6].

Современные обсуждения патогенеза СХУ рассматривают также такие факторы, как:

- высокий индекс массы тела;
- злоупотребление табаком, алкоголем и др.;
- стресс, тяжелый физический труд (переутомление, сменная работа, конфликты на рабочем месте) [11].;
- повышенное образование молочной кислоты в ответ на физическую нагрузку;

- нарушение транспорта кислорода к тканям;
- снижение числа митохондрий и их дисфункция у больных СХУ;
- изменение баланса бактерий в кишечнике;
- недостаток магния и других минеральных веществ и витаминов;
- генетическая предрасположенность и др.

Обобщая сказанное, можно представить современное определение этиологии и патогенеза СХУ, в виде схематической модели (рисунок).



Рисунок – Общая схема патогенеза синдрома хронической усталости.

Патология СХУ, начинается с нарушений метаболизма, структуры и функции нервных клеток и проводящих путей. Расстройство деятельности систем организма при СХУ возникает под влиянием различных факторов: стресса; вирусов; воздействия на нервную систему; алкоголь; травмы и пр. Патогенность факторов зависит от интенсивности, длительности, частоты и периодичности воздействия, а также состояние организма в момент действия патогенного агента. Механизмы повреждения организма при СХУ развиваются по-разному.

Отличительными чертами СХУ являются: вторичная дисфункция головного мозга, обусловленная аномальным выбросом цитокинов; аутоантитела к нейротрансмиттеру, рецепторы также могут быть вовлечены в патогенез СХУ в некоторых случаях; формируется вторичный иммунодефицит.

Таким образом, основой патогенеза СХУ можно считать гетерогенное состояние с многофакторной этиологией, основанной на нарушениях в психо-нейро-эндокрино-иммунной системе.

Библиографический список

1. Abbey S.E., Garfinkel P.E. Chronic fatigue syndrome and depression: Cause, effect, or covariate. Rev Infect Dis. 1991.
2. Ader R., Cohen N., Felten D. Psychoneuroimmunology: Interactions between the nervous system and the immune system. Lancet. 1995.
3. Brurberg K.G., Fonhus M.S., Larun L., Flottorp S., Malterud K. Case definitions for chronic fatigue syndrome/ myalgic encephalomyelitis (CFS/ME): a systematic review. BMJ Open. 2014;4(2):e003973.

4. Caligiuri M., Murray C., Buchwald D. et al. Phenotypic and functional deficiency of natural killer cells in patients with chronic fatigue syndrome. *J. Immunol.* 1987.
5. De Freitas E., Hilliard B., Cheney P.R. et al. Retroviral sequences related to human T-lymphotropic virus type II in patients with chronic fatigue immune dysfunction syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991.
6. Demitrack M.A., Dale J.K., Straus S.E. et al. Evidence for impaired activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome. *J. Clin Endocrinol Metab.* 1991.
7. Hapke U., Maste U., Busch M., Schlack R., Scheid-Nave C. Stress, Schlafstörungen, Depressionen und Burn-out. Wie belastet sind wir? [Internet]. DEGS, Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz; 2012. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Studien/Degs/degs_w1/Symposium/degs_stress_depressionen_burnout.pdf?blob=publicationFile.
8. Irwin M., Daniels M., Bloom E.T., Smith T.L., Weiner H. Life events, depressive symptoms, and immune function. *Am J Psychiatry* 1987.
9. Jason L.A., Richman J.A., Rademaker A.W. et al. A community-based study of chronic fatigue syndrome. *Arch Intern Med.* 1999 Oktober;159(18):2129–37.
10. Khansari D.N., Murgu A.J., Faith R.E. Effects of stress on the immune system. *Immun Today.* 1990.
11. Kim C.H., Shin H.C., Won C.W. Prevalence of Chronic Fatigue and Chronic Fatigue Syndrome in Korea: Community-Based Primary Care Study. *J. Korean Med Sci.* 2005 Aug;20(4):529–34.
12. Klimas N.G., Salvato F.R., Morgan R., Fletcher M.A. Immunologic abnormalities in chronic fatigue syndrome. *J Clin Microbiol.* 1990.
13. Klonoff D.C. Chronic fatigue syndrome. *Clin Inf Dis.* 60. Levy JA. Viral studies of chronic fatigue syndrome: Introduction. *Clin Inf Dis.* 1994.
14. Landay A.L., Jessop C., Lennette E.T., Levy J.A. Chronic fatigue syndrome: Clinical condition associated with immune activation. *Lancet.* 1991.
15. Lloyd A.R., Hickie I., Brockman A., Dwyer J., Wakefield D. Serum and cerebrospinal fluid cytokine levels in patients with chronic fatigue syndrome and control subjects. *J Infect Dis.* 1991.
16. Stadje R. Müdigkeit als Symptom in der Primärversorgung: eine systematische Übersichtsarbeit [Internet]. [Allgemeinmedizin, Präventive und Rehabilitative Medizin des Fachbereichs Medizin der Philipps – Universität Marburg]: Philipps-Universität Marburg; 2015. Available from: <http://archiv.ub.uni-marburg.de/diss/z2015/0154/pdf/drs.pdf>.
17. Straus S.E., Fritz S., Dale J.K., Gould B., Strober W. Lymphocyte phenotype and function in the chronic fatigue syndrome. *J Clin Immunol.* 1993.
18. Straus S.E., Tosato G., Armstrong G. et al. Persisting illness and fatigue in adults with evidence of Epstein-Barr virus infection. *Ann Intern Med.* 1985.
19. Ur E., White P.D., Grossman A. Hypothesis: Cytokines may be activated to cause depressive illness and chronic fatigue syndrome. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 1992.
20. Yousef G.E., Bell E.J., Mann G.F. et al. Chronic enterovirus infection in patients with chronic postviral fatigue syndrome. *Lancet.* 1988.

ЭКСПРЕССИЯ *IL10* и *TNF α* В СЛЮНЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА

Воробьева А.В., Дробот А.А., Диденко Я.В.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия*

Аннотация. В статье представлено исследование экспрессии генов цитокинов в слюне в зависимости от количества микроорганизмов в полости рта человека. В ходе исследования было выявлено, что содержание *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* в слюне в 90% случаев выше 10^4 геномных эквивалентов в мл. В результате исследования показано, что повышение концентрации микроорганизмов в ротовой полости может сопровождаться повышением уровня транскрипции гена *IL10*.

Ключевые слова: Цитокины, микрофлора полости рта, воспаление, *IL10*, *TNF α* .

EXPRESSION OF *IL10* AND *TNF α* IN SALIVA DEPENDING ON MOUTH MICROFLORA

Vorobieva A.V., Drobot A.A., Didenko Y.V.

*Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology named after
Dmitry Iosifovich Ivanovsky, Rostov-on-Don, Russia*

Abstract. The article presents a study of the expression of cytokine genes in saliva depending on the number of microorganisms in the human oral cavity. The study revealed that the content of *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* in saliva in 90% of cases above 10^4 genomic equivalents per ml. As a result of the study, it was shown that an increase in the concentration of microorganisms in the oral cavity may be accompanied by an increase in the level of transcription of the *IL10* gene.

Keywords: Cytokines, oral microflora, inflammation, *IL10*, *TNF α* .

Ротовая полость является уникальной экологической системой для самых разнообразных микроорганизмов. Постоянная микрофлора полости рта образовалась из-за взаимной адаптации организма человека и микробов. Адаптированная к организму человека микробная флора и её взаимодействие с организмом играет важную роль в физиологических процессах. Например, в геноме *Bifidobacterium longum spp. infantis*, обитающего в желудочно-кишечном тракте младенцев, обнаружен участок, обеспечивающий расщепление любых структур олигосахаридов грудного молока, что является результатом большого репертуара бактериальных генов, кодирующих ряд гликозидаз и переносчиков олигосахаридов, не встречающихся у других бактерий [1]. Основными типами бактерий кишечника здорового

человека в порядке численной значимости являются Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia и Fusobacteria, играющие важную роль в здоровье человека, которые осуществляют анаэробное пищеварение, а также являются своеобразной иммунной защитой, предотвращающей рост вредоносных бактерий [2]. Гликозидазы и протеазы сахаролитических бактерий, относящихся к Streptococcus, Actinomyces и Lactobacillus и обнаруженных в наддесневых зубных бляшках, своей ферментативной активностью обеспечивают непрерывное образование кислот и аммония, что позволяет поддерживать практически нейтральную рН среды в области обитания микроорганизмов в ротовой полости [3].

Staphylococcus spp. является одним из ярчайших представителей микрофлоры полости рта человека, объединяя в себе как патогенные, так и типичные для ротовой полости микроорганизмы. Данный род оказывает огромное влияние на состояние ротовой полости. В норме стафилококки обязательно должны присутствовать в ротовой полости (от 10^3 до 10^4 КОЕ/мл – количество колониеобразующих единиц в 1 мл исследуемого биологического материала), так как обладая ферментативной активностью, участвуют в расщеплении остатков пищи [4]. Увеличение этого показателя является патологическим состоянием, при котором происходит выделение стафилококка в окружающую среду, даже при спокойном дыхании.

Изменение нормальной микрофлоры полости рта может вызывать воспалительные процессы. Естественным ответом иммунной системы организма будет выработка особой группы белков – цитокинов. На сегодняшний день довольно актуальны исследования цитокинового профиля ротовой полости при различных патологиях [5,6,7]. Взаимосвязь микрофлоры слюны человека и активности цитокиновой системы представляет особый интерес для поиска возможных маркеров различных заболеваний.

В связи с этим, целью нашего исследования было изучение изменения уровня мРНК генов цитокинов в слюне в зависимости от состояния микрофлоры полости рта человека.

В работе исследовали следующие цитокины:

Интерлейкин 10 – наиболее важный противовоспалительный цитокин, оказывающий, главным образом, противовоспалительное действие. Главной функцией ИЛ-10 является ограничение и купирование воспалительного процесса [8].

Фактор некроза опухоли- α (TNF α) является одним из ключевых провоспалительных цитокинов иммунной системы, в норме выполняющий гомеостатическую функцию и регулирующий множество биологических процессов, таких как: апоптоз различных клеток, формирование структуры различных органов и тканей, ремиелинизацию нейронов, ремоделирование сердца, регенерацию хрящевой ткани, и ингибирование онкогенеза [9].

Материалом послужили образцы слюны, полученные от 41 добровольца в возрасте от 18 до 25 лет, без хронических заболеваний, без ран в ротовой полости, без воспалительных процессов в течение двух предшествующих сдаче биоматериала недель. Сбор слюны проводили утром, до приёма пищи и чистки зубов.

Выделение ДНК и РНК проводили при помощи комплектов реагентов «ДНК-сорб-АМ» и «РИБОпреп» (АмплиСенс®) соответственно. Мультиплексную полимеразную цепную реакцию проводили при помощи набора реагентов АмплиСенс® Флороценоз / Аэробы-FL. Определяли ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков. Для проведения обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции для исследования уровня транскрипции генов *IL10*, *TNF α* и *GAPDH* использовали реагенты Синтол (Россия). Микробиологический посев *Staphylococcus spp.* проводили на среде Байрд-Паркер, культивировали чашки Петри при 37°C 72 часа.

Результаты микробиологического посева показали, что у всех добровольцев, участвовавших в исследовании, в ротовой полости присутствует *Staphylococcus spp.* Микроорганизмы данного рода обнаружены и при проведении мультиплексной ПЦР на выявление аэробных бактерий (Таблица 1). Однако количество выявленного *Staphylococcus spp.* значительно колеблется в зависимости от образца слюны. Минимальное значение для бактериального посева составило 226,67 КОЕ/мл, а максимальное 13286,67 КОЕ/мл, среднее же равняется 9366 КОЕ/мл. Значения минимума и максимума в выборке для ПЦР составили $3 \cdot 10^3$ Гэ/мл и $3 \cdot 10^6$ Гэ/мл соответственно. Среднее для ПЦР – 262636,6 Гэ/мл.

Таблица 1 – Сравнительная частота выявления *Staphylococcus spp.* методом бактериального посева и полимеразной цепной реакции

Всего проб	Частота обнаружения при бактериальном посеве, %	Частота обнаружение при ПЦР исследовании, %
41	100	100

Анализ данных микробиологического исследования показал, что частота образцов слюны с содержанием *Staphylococcus spp.* выше, чем 10^3 КОЕ/мл составила более 84% (Таблица 2).

Таблица 2 – Распределение исследуемых образцов слюны в зависимости от количества КОЕ *Staphylococcus spp.*

КОЕ, шт/мл	Кол-во проб, абс.(% ±m)
Менее $1 \cdot 10^3$	6 (14,28±5,4)
$1 \cdot 10^3 - 1 \cdot 10^4$	5 (11,9± 4,9)
Более $1 \cdot 10^4$	30 (72,8±6,8)

Эти данные соответствуют результатам ПЦР исследования: частота образцов, в которых выявлено ДНК *Staphylococcus spp.* в концентрации выше 10^4 геномных эквивалентов в мл составило более 90%.

Помимо *Staphylococcus spp.* в мультиплексной ПЦР определяли наличие и количественное содержание *Streptococcus spp.* и *Enterobacteriaceae spp.* Данные микроорганизмы также были обнаружены во всех исследуемых образцах. Стоит отметить, что содержание стрептококков в слюне было выше, чем стафилококков и энтеробактерий, а последних наоборот было выявлено меньше всего.

При суммарном вычислении количественного содержания представителей трех исследуемых родов микроорганизмов для каждого образца было установлено, что только в 23% образцов оно находилось в пределах нормальных значений. Для вычисления нормы содержания *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* было взято суммарное значение нормы для каждого микроорганизма [4]. Пороговое значение содержания данных микроорганизмов в норме составило $1,1 \cdot 10^8$ Гэ/мл. На основе этих данных мы разделили нашу выборку на две группы: содержание микроорганизмов «выше нормы» и «норма».

Был проведен анализ уровня транскрипции гена *IL10* и *TNFα* для каждого образца из двух сформированных групп. Ни в одном из образцов мРНК гена *TNFα* обнаружено не было.

По результатам ПЦР-РВ на выявление кДНК гена *IL10* вычислили для каждого образца ΔCt, а также среднее значение данного показателя для группы. На основе полученных ΔCt установлено, что уровень экспрессии гена *IL10* в образцах с повышенным суммарным

содержанием микроорганизмов значительно отличается, поэтому данная группа была разделена на две подгруппы (Таблица 3). Таким образом, получили 3 выборки:

1 группа – содержание микроорганизмов по результатам мультиплексной ПЦР соответствует норме – группа контроля.

2 группа – содержание микроорганизмов повышено; экспрессия гена *GAPDH* выше, чем экспрессия гена *IL10*.

3 группа – содержание микроорганизмов повышено; экспрессия гена *IL10* выше, чем экспрессия гена *GAPDH*.

Сравнение средних значений ΔCt позволяет увидеть разницу в экспрессии *IL10* в полученных выборках: уровень транскрипции гена *IL10* среди лиц третьей группы значительно выше по сравнению с двумя другими группами (Таблица 3, рисунок 1).

Таблица 3 – Средние значения ΔCt , отражающие уровень мРНК гена *IL10* относительно гена *GAPDH*

	Группа 1	Группа 2	Группа 3
ΔCt , ср.знач	-1,93	-3,43	2,13

Для определения величины различия использовали $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Метод. По результатам вычислений уровень экспрессии гена *IL10* в третьей группе выше, чем в первой группе в 16,68 раз ($p=0,0371$), и выше, чем во второй в 47,18 раз ($p=0,0212$).

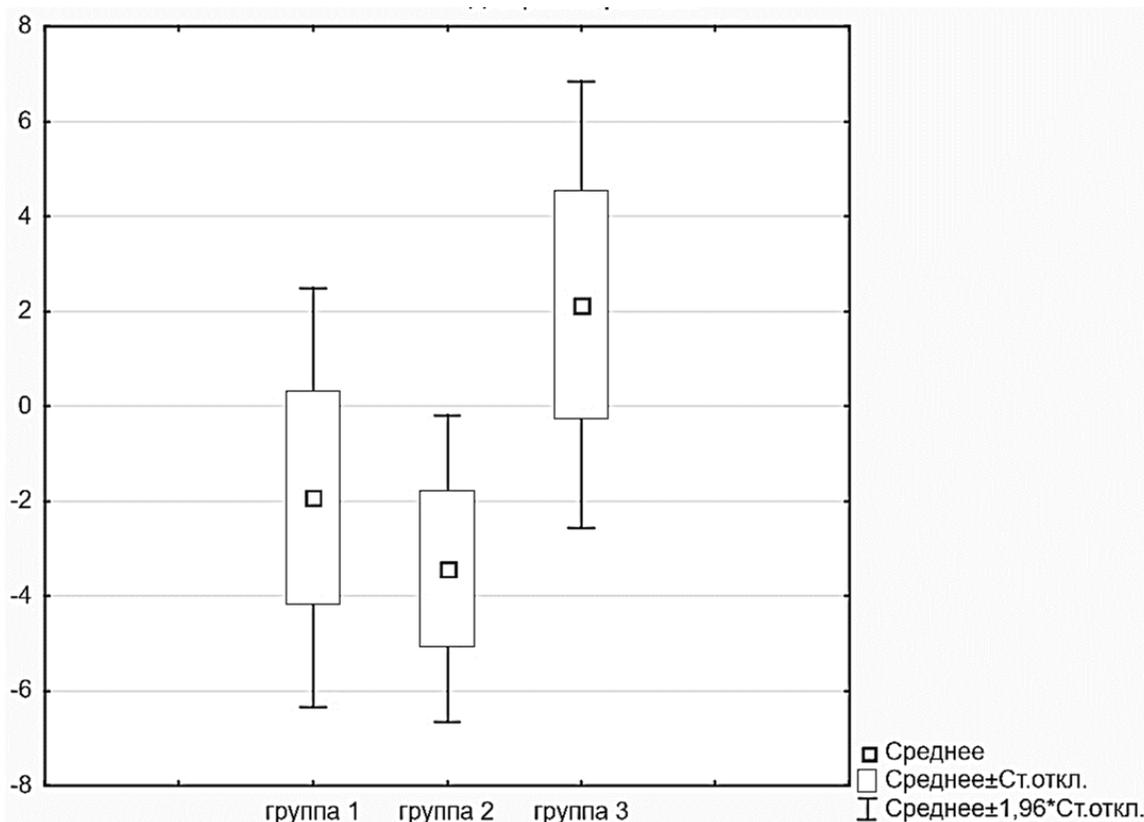


Рисунок 1 – Уровень транскрипции гена *IL10* (ΔCt) в культуре клеток слюны человека относительно транскрипции гена *GAPDH*

Таким образом, в результате исследования показано, что повышение концентрации микроорганизмов в ротовой полости может сопровождаться повышением уровня

транскрипции гена *IL10*. IL-10, являясь противовоспалительным интерлейкином, реализует подавление развития воспаления, что становится следующим этапом иммунного ответа после работы провоспалительных цитокинов [10]. Таким образом, повышенный уровень мРНК гена *IL10* может указывать на реакцию иммунной системы человека на повышенный уровень микроорганизмов в полости рта. Эта реакция может включать и изменение других звеньев цитокиновой системы, что требует дальнейших исследований.

Согласно проведенному исследованию можно сделать следующие выводы: содержание *Staphylococcus spp.* в слюне в 80% случаев превышает показатель 10^3 КОЕ/мл., суммарное содержание *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* в слюне в 90% случаев выше 10^4 геномных эквивалентов в мл., в 16% образцов с содержанием микроорганизмов выше нормы уровень экспрессии *IL10* статистически значимо выше по сравнению с контролем.

Библиографический список

1. Underwood M. A. et al. Bifidobacterium longum subspecies infantis: champion colonizer of the infant gut //Pediatric research. – 2015. – Т. 77. – №. 1. – С. 229-235.
2. Zhang Y. J. et al. Impacts of gut bacteria on human health and diseases //International journal of molecular sciences. – 2015. – Т. 16. – №. 4. – С. 7493-7519.
3. Степанова Т. Ю., Тимофеева А. В. Микробиом ротовой полости человека //Современные проблемы науки и образования. – 2016. – №. 5. – С. 308-308.
4. Зеленова Е. Г. и др. Микрофлора полости рта: норма и патология //Н. Новгород: НГМА. – 2004.
5. Shakeeb N. et al. Saliva as a Potential Specimen to Monitor IL-6, TNF- α and IL-10 in COVID-19 Patients //Inflammation. – 2022. – С. 1-7.
6. Roi A. et al. The challenges of OSCC diagnosis: Salivary Cytokines as potential biomarkers //Journal of Clinical Medicine. – 2020. – Т. 9. – №. 9. – С. 2866.
7. Chiamulera M. M. A. et al. Salivary cytokines as biomarkers of oral cancer: a systematic review and meta-analysis //BMC cancer. – 2021. – Т. 21. – №. 1. – С. 1-16.
8. Кольман Я., Рем К. Г. Наглядная биохимия. – мир, 2000. – Т. 469. – С. 469.
9. Барановский А. Ю. и др. Роль фактора некроза опухоли альфа в развитии аутоиммунной патологии печени: нерешенная проблема //Практическая медицина. – 2014. – №. 1 (77). – С. 15-19.
10. Никулина Б.А. Иммунологический статус и методы его оценки /Б.А. Никулина. – М.: Геостар-Медицина, 2008. – 457 с.

ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФУМАРАТА 3-ОКСИПИРИДИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗНОГО КАЧЕСТВА НА НОРМАЛЬНЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Выпова Е.Р.,¹ Комарова Л.Н.,¹ Купцова П.С.,^{1,2} Берсенева А.А.¹

¹ *Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ», Обнинск, Россия*

² *Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России), Обнинск, Россия*

Аннотация. Радиопротекторы имеют важное значение в лучевой терапии, поскольку нормальные ткани, окружающие опухоль, должны быть защищены от лучевого поражения ионизирующим излучением. Проведено исследование радиозащитных свойств фумарата 3-оксипиридина на нормальных и опухолевых клетках человека при действии гамма-излучения и излучения ионов ¹²C. Радиозащитный эффект исследуемого соединения оценен по показателю клоногенной активности и времени удвоения.

Ключевые слова: радиопротекторы, фумарат 3-оксипиридин, фибробласты, нейробластома, ионизирующее излучение.

STUDY OF RADIOPROTECTIVE PROPERTIES OF 3-OXYPYRIDINE FUMARATE UNDER THE ACTION OF IONIZING RADIATION OF DIFFERENT QUALITY ON NORMAL AND HUMAN TUMOR CELLS

Vypova E.R.¹, Komarova L.N.¹, Kuptsova P.S.^{1,2}, Berseneva A.A.¹

¹ *Obninsk Institute for Nuclear Power Engineering*

² *A. Tsyba Medical Radiological Research Center – branch of the National Medical Research Radiological Center of the Ministry of Health of the Russian Federation*

Abstract. Radioprotectors are important in radiation therapy, because the normal tissues surrounding the tumor must be protected from radiation damage by ionizing radiation. A study of the radioprotective properties of 3-oxypyridine fumarate on normal and human tumor cells under the action of gamma radiation and radiation of ¹²C ions was carried out. The radioprotective effect of the studied compound was estimated by the indicator of clonogenic activity and doubling time.

Keywords: radioprotectors, fumarate 3-oxypyridine, fibroblasts, neuroblastoma, ionizing radiation.

В Российской Федерации в 2021 году выявлено 580 415 случаев онкологических заболеваний. Прирост данного показателя, по сравнению с 2020 годом составил 4,4%. [1] При

этом специалисты диагностируют увеличение случаев заболеваемости злокачественными новообразованиями в последующие годы. В современной онкологии основными методами лечения является лучевая терапия [2], хирургическое вмешательство [3] и лекарственная терапия, которая включает химиотерапию [4], иммунотерапию, гормональную, таргетную, и фотодинамическую терапии. Лучевая терапия почти всегда применяется для лечения онкологических заболеваний. К сожалению, довольно часто, после применения лучевой терапии негативным результатом является развитие лучевых поражений нормальных тканей, окружающих опухоль, так как источник излучения невозможно подвести к очагу поражения достаточно локально. [5] Адронная терапия (в т. ч. протонами и углеродными пучками) является на сегодняшний день наиболее эффективной формой лучевой терапии глубоко расположенных опухолей, в том числе радиорезистентных. Значительным недостатком использования тяжелых заряженных частиц в лечении онкологии является их деление на осколки, которые имеют большой пробег по отношению к первичным ионам, из-за чего растет дозовая нагрузка на здоровые ткани.

Радиозащитные соединения имеют важное значение в клинической лучевой терапии, поскольку нормальные ткани должны быть защищены от действия ионизирующего излучения разного качества. [6] Одним из основных направлений в радиобиологии является поиск новых соединений, которые могут проявлять радиозащитные свойства. Например, представляет интерес изучение радиопротекторных свойств соединений, обладающих антиокислительными, антиоксидантными и антирадикальными свойствами. К таким препаратам относится фумарат 3-оксипиридина. Вещество является солью 2-метил-6-этил-3-гидроксипиридина с фумаровой кислотой, получаемое при взаимодействии 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и фумаровой кислоты в среде растворителя. Поэтому целью работы является изучение возможности применения фумарата 3-оксипиридина в качестве радиозащитного средства при действии ионизирующего излучения на фибробласты и нейробластому человека.

В качестве объекта исследования были выбраны клеточные культуры фибробластов (hTERT) – нормальные клетки соединительной ткани и нейробластомы (SK-N-BE) – эмбриональная опухоль стволовых нервных клеток – нейробластов. Культивирование клеток проводилось по стандартной методике [7]. Клетки инкубировали с фумаратом 3-оксипиридином в концентрации 0,05 мг/мл в течение 24-х часов, основываясь на работе. [8]

Источником гамма-излучения служила гамма-установка «ГУР-120» (источник ионизирующего излучения ^{60}Co , $E_{\text{ср}} = 1,25 \text{ МэВ}$). Мощность дозы составила 0,9 Гр/мин. Дозы облучения: 1, 4, 6, 10 Гр. Облучение ионами ^{12}C проводили на каскаде ускорителя «У-70» Института физики высоких энергий (ИФВЭ) ФГБУ ГНЦ РФ «Курчатовский институт» (г. Протвино). Облучение осуществлялось в водном фантоме со средней энергией 455,8 МэВ/нуклон. Дозы облучения: 1, 2, 4, 6 Гр. Контролем служили интактные клетки. Радиозащитный эффект исследуемого соединения оценен по показателю клоногенной активности и времени удвоения.

В данной работе было проведено исследование действия ионизирующего излучения разного качества, фумарата 2-оксипиридина и совместного действия облучения и соединения на две линии клеток человека.

Показано, что фумарат 3-оксипиридин проявляет радиозащитные свойства при облучении гамма-квантами в дозах 1, 4, 6 и 10 Гр не только нормальных клеток, но и опухолевых клеток человека. Проявление радиозащитных свойств фумарата 3-оксипиридина при гамма-облучении по отношению к опухолевым клеткам можно объяснить тем, что

исследуемое соединение не обладает селективностью к нормальным клеткам человека, и защищает все клетки от действия гамма-излучения.

При исследовании радиопротекторных свойств фумарата 3-оксипиридина при действии ионов ^{12}C было выявлено, что препарат особо не оказывает радиозащитного действия по отношению к фибробластам человека и клеткам нейробластомы. Полученные результаты можно объяснить высокой ОБЭ ионного излучения. Однако, это представляет интерес, так как нормальные ткани, находящиеся за пиком Брэгга, могут быть защищены от вторичных продуктов ионно-углеродной терапии (например, гамма-квантов), в то время как на опухолевые клетки радиозащитное действие препарата распространяться не будет.

Сравнительный анализ результатов действия препаратов с гамма-квантами и ионами ^{12}C показал существенную зависимость проявления модифицирующих свойств от качества излучения.

На следующем этапе работы оценивалось влияние облучения, препарата и их комбинированного действия на исследуемые клеточные линии по показателю – время удвоения. Присутствие в контроле исследуемого соединения не увеличивало время удвоения клеток, что подтверждает проведенные ранее исследования об отсутствии токсичности фумарата 3-оксипиридина в исследуемой концентрации. С другой стороны, при действии гамма-излучения фумарат 3-оксипиридин существенно снижал время удвоения фибробластов более, чем в два раза при дозе 10 Гр и время удвоения клеток нейробластомы почти в 1,5 раза. Также время удвоения клеток нейробластомы снижалось в 1,3 раза при действии ионов ^{12}C в дозе 6 Гр.

При проведении сравнительного анализа результатов действия препаратов с гамма-квантами и ионами ^{12}C была выявлена существенная зависимость проявления модифицирующих свойств от качества излучения.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что антиоксидантные свойства исследуемого соединения открывают новые возможности модификации действия ионизирующего излучения при терапии онкологических заболеваний. Полученные данные свидетельствуют о наличии радиопротекторных свойств у фумарата 3-оксипиридина, в дальнейшем эти свойства будут исследованы на других видах ионизирующего излучения и на других клеточных линиях. Применение фумарата 3-оксипиридина может позволить снизить лучевую нагрузку на здоровые ткани человека, в том числе уменьшить поражающее действие вторичных продуктов на здоровые клетки за пиком Брэгга при действии ионно-углеродной терапии.

Библиографический список

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Шахзадова А.О. Состояние онкологической помощи населению России в 2021 году // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. – 2022. – 239 с.
- Abshire D., Lang, M. K. The Evolution of Radiation Therapy in Treating Cancer // Seminars in oncology nursing.– 2018. – V. 34.– №2. – P. 151–157.
- Ben Barak A., Golan H., Waldman D., Arkovitz M. S. Surgical Treatment of Neuroblastoma // The Israel Medical Association journal. – 2017. – V. 19. – №11. – P. 691–695.
- Kamiimabeppu D., Shinozaki E., Osumi H. Gan to kagaku ryoho // Cancer & chemotherapy.– 2021. – V. 48. – №11. – P. 1349–1353.

10. Абдылдаев Т.А., Найзабекова С.Ш. Использование фторафура с радиомодифицирующей целью при лечении больных раком шейки матки // J. Medicine. – 2015. – №10. – С.61–64.
11. Nair, C.K, Salvi, V., Kagiya, T.V., Rajagopalan, R. Relevance of radioprotectors in radiotherapy: studies with tocopherol monoglucoside // Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology. – 2004. – V. 23. – №2. – P. 53-60.
12. Прилепский А.Ю., Дроздов А.С., Богатырев В.А., Староверов С.А. Методы работы с клеточными культурами и определение токсичности наноматериалов: учебно-методическое пособие. Санкт-Петербург: университет ИТМО. – 2019. – 43 с.
13. Уланова Т.В., Инчина В.И., Русейкин Н.С. и др. Исследование влияния новых производных 3-гидроксипиридина и препаратов сравнения на выживаемость и некоторые биохимические показатели крови белых крыс при экспериментальном диабете // Вестник Мордовского университета. – 2016. – Т. 26. – № 2. – С. 180-191.

РАЗРАБОТКА РЕКОМЕНДАЦИЙ ДЛЯ ТРЕНИРОВОК ПРИ СКОЛИОТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ ПОЗВОНОЧНИКА I И II СТЕПЕНИ

Гаврин А.А., Терёхина М.Э.

*Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,
Санкт-Петербург, Россия*

Аннотация: Сколиоз – распространенная проблема искривления позвоночника. Тренировки по-разному влияют на позвоночник. В работе был проведен анализ и систематизация упражнений, моделирование ухудшения осанки при неправильных упражнениях. Были выявлены факторы, влияющие на осанку, подобраны упражнения, составлены рекомендации для тренировок с разрешенными и запрещенными упражнениями. Рекомендации можно использовать как методическое пособие с техникой выполнения упражнений, так и для составления тренировок.

Ключевые слова: сколиоз I и II степени, лечебная физкультура, тренировки, реабилитация.

DEVELOPMENT OF RECOMMENDATIONS FOR TRAINING WITH SCOLIOTOIC DEFORMATION OF THE SPINE OF I AND II DEGREE

Gavrin A.A., Terekhina M.E.

Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint-Petersburg, Russia

Abstract: Scoliosis is a common problem of curvature of the spine. Training affects the spine in different ways. In the work, an analysis and systematization of exercises was carried out, modeling of the deterioration of posture with incorrect exercises. Factors influencing posture were identified, exercises were selected, recommendations were made for training with permitted and prohibited exercises. The recommendations can be used both as a methodological guide with the technique of performing exercises, and for compiling workouts.

Keywords: scoliosis I and II degree, exercise therapy, training, rehabilitation.

Сколиотическая деформация позвоночника или сколиоз – это наиболее распространенная проблема, связанная с позвоночником, у людей 21 века. Так более 40% населения всей Земли страдают от сколиоза [1]. Большинство пациентов с умеренным искривлением позвоночника – сколиоз I и II – не нуждаются в хирургическом вмешательстве, им достаточна лишь грамотно составленная программа тренировок, которая в свою очередь является совокупностью специальных упражнений, подобранных для определенных степеней и видов сколиоза [2]. Усугублению осанки человека способствуют нарушения требований тренировок при сколиозе [3].

Для снижения травматизма при неправильной технике, неправильно подобранной тренировки или нарушениях необходимо разработать конкретные рекомендации, содержащие полные инструкции техники упражнений, противопоказания и теоретические аспекты тренировок.

К основным причинам возникновения сколиоза относят: травмы, в том числе врожденные, деформации, возникшие в детстве, неподходящие позы в повседневной жизни деформации, связанные с ослабеванием мышц и старением организма [4, 5]. Сколиоз у взрослых – это запущенные процессы, происходящие в детстве, следовательно, вовремя начатое лечение в детском или подростковом возрасте может уменьшить негативные влияния и снизить риск возникновения сколиоза с возрастом. Самым эффективным методом улучшения состояния осанки является ЛФК [5]. Однако при уже имеющихся деформациях, определяющихся углом Кобба, превышающим 10 градусов, к физической активности необходимо подходить осознанно [6].

Форма применяемых технологий тренировок и варианты лечебной физкультуры зависят от типа сколиоза. Так различают основные 4 вида сколиоза [7]. В данной работе особое внимание было уделено сколиозу первой и второй степени. Присвоение той или иной категории происходит по углу Кобба. Первой степени сколиоза соответствует угол Кобба менее 10 градусов, а второй степени – от 10 до 30 [8, 9].

Цель данной работы – изучение основных противопоказаний и последствий нарушения требований тренировок, которые будут положены в основу общих рекомендаций для тренировок при сколиотической деформации позвоночника.

Методы и материалы. Для определения основной информации, которая была включена в теоретическую часть рекомендации, были использованы следующие методы научного исследования:

- анализ статей, содержащих информацию о причинах возникновения сколиоза, различных видах и их различиях. Особое внимание было уделено статьям, раскрывающим особенности сколиоза I и II степени;
- сравнение и обобщение полученной в результате анализа информации.

Основной частью рекомендации является выявление упражнений, подходящих для тренировок при сколиотической деформации позвоночника I и II степени. При определении основных упражнений были использованы медицинские и анатомические справочники, содержащие подробную информацию о строении и функциях мышц и скелета человека, а также различные научные исследования в области медицины, биомеханики, лечебной физкультуры и фитнеса.

Для определения запрещенных упражнений на тренировках при сколиозе I и II степени были использованы моделирование и анализ полученных в результате моделирования данных.

Результаты. На положение позвоночника влияют мышцы спины и шеи, мышцы живота и груди, мышцы пояса верхних конечностей и, согласно теории миофасциального релиза и концепции анатомических поездов, мышцы задней поверхности бедра и голени.

Были выбраны основные мышцы, оказывающие влияние на позвоночник, выявлены определенные действия мышцами, необходимые для улучшения осанки.

Выбранные упражнения были разделены на категории по задействованным мышцам:

- упражнение на мышцы живота;
- упражнения на мышцы спины;

- упражнения на растяжку мышц груди;
- упражнения на растяжение мышц задней поверхности бедра и голени.

Рекомендуется начинать тренировку с разогрева и активной растяжки, а после выполнять базовые многосуставные упражнения. После выполняются изолирующие упражнения на те же группы мышц. Следующие выполняются упражнения на мышцы живота, а рекомендуется заканчивать тренировку упражнениями на растяжку и расслабление мышц.

Основную часть силовой тренировки для корректирования осанки должны составлять упражнения на проработку мышц спины и пояса верхних конечностей. Упражнения на укрепление мышц живота являются изолирующими и подходят для финальной проработки разогретого организма.

Основными запрещенными упражнениями при сколиозе являются: становая тяга, тяга сумо, румынская тяга, присед классический со штангой, фронтальный присед и армейский жим. Основным фактором, по которому данные упражнения необходимо отнести к запрещенным, является последствия, возникающие при сильной вертикальной нагрузке на позвоночник. Все эти упражнения оказывают сильную компрессионную нагрузку на позвоночник. Может наблюдать сдвиги и торсия позвонков, зажимы нервов и нарушение функций близлежащих мышц.

Обсуждения и заключение.

К основным рекомендациям относят необходимость включать в тренировку следующие упражнения:

- упражнения на укрепление мышц пресса и спины, для создания крепкого мышечного корсета, который будет поддерживать положение позвоночника как во время тренировок, так и в повседневной жизни;
- упражнение на развитие гибкость мышц задней поверхности бедра и голени, а также мышц груди, что позволит корректировать нормальное положение тела и минимизировать нагрузку на позвоночник не только во время тренировок;
- упражнения на мышцы верхнего пояса конечностей, учитывая то, что данные мышцы следует не только укреплять, но и растягивать, для поддержания баланса между мышцами правой и левой сторон туловища.

Данное исследование раскрывает особенности сколиотической деформации позвоночника, а также нюансы тренировок и влияния разных групп мышц на его положение, что дает информацию о возможности изменения состояния позвоночника и уменьшения его последствий на организм путем физических нагрузок, а не с помощью хирургического вмешательства или корсета.

Библиографический список

1. Zhou, Z., Liu, F., Li, R., & Chen, X. (2021). The effects of exercise therapy on adolescent idiopathic scoliosis: An overview of systematic reviews and meta-analyses. *Complementary Therapies in Medicine*, 58 doi: 10.1016/j.ctim.2021.102697
2. Diebo BG, Shah NV, Boachie-Adjei O et al (2019) Adult spinal deformity. *The Lancet* 394:160–172. doi:10. 1016/S0140-6736(19)31125-0
3. Sheikhi, B., Letafatkar, A., Hogg, J., & Naseri-Mobaraki, E. (2021). The influence of kinesio taping on trunk and lower extremity motions during different landing tasks: Implications for

anterior cruciate ligament injury. *Journal of Experimental Orthopaedics*, 8(1)
doi:10.1186/s40634-021-00339-w

4. David, R., Cassouduesalle, H., Chhun, H., Compagnat, M., Amaghnouj, K., Leclère, F. M., De Seze, M. (2021). Informative booklet enhances adherence to brace in young people with idiopathic scoliosis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 64(4)
doi:10.1016/j.rehab.2020.06.005
5. Батуева С. В. (2017) Лечебная физкультура при сколиозе. Актуальные вопросы профилактики, ранней диагностики, лечения и медицинской реабилитации больных с неинфекционными заболеваниями
6. Ширинова В.Р., Зазулина Е.В. (2021) Сколиоз: причины возникновения, виды, методы профилактики и лечения с использованием различных физкультурных видов деятельности. Цифровизация как новая парадигма развития: вызовы, возможности и перспективы.
7. Майерс Томас. Анатомические поездки [пер. с англ. Скворцовой, А.А., Зимина А.А.]. – Москва: Эксмо, 2021. – 320 с
8. Gou, Y., Lei, H., Zeng, Y., Tao, J., Kong, W., & Wu, J. (2021). The effect of pilates exercise training for scoliosis on improving spinal deformity and quality of life: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine*, 100(39), e27254. doi:10.1097/MD.00000000000027254
9. Berdishevsky, H., Lebel, V. A., Bettany-Saltikov, J., Rigo, M., Lebel, A., Hennes, A., Durmala, J. (2016). Physiotherapy scoliosis-specific exercises – a comprehensive review of seven major schools. *Scoliosis and Spinal Disorders*, 11(1) doi:10.1186/s13013-016-0076-9.

СОЦИО-ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА, НАРУШАЮЩИЕ ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА

Дедушенко А.В., Гончарова Ю.С.

Медицинский колледж Медицинского института НИУ «БелГУ», Белгород, Россия

Аннотация. В данной статье рассматриваются основные факторы, оказывающие негативное влияние на здоровье человека. Также любое заболевание в настоящее время можно рассматривать с точки зрения психосоматики.

Ключевые слова: здоровье, психические факторы, психосоматика, заболевания.

SOCIO-PSYCHOLOGICAL RISK FACTORS THAT VIOLATE HUMAN HEALTH.

Dedushenko A.V., Goncharova Y.S.

Medical College of the Medical Institute of the National Research University «BelSU», Belgorod, Russia

Abstract. This article discusses the main factors that have a negative impact on human health. Also, any disease can now be considered from the point of view of psychosomatics.

Keywords: health, mental factors, psychosomatics, diseases.

Одним из основных факторов, провоцирующих повышенную смертность, сокращение продолжительности жизни населения России являются психические расстройства. Возрастание числа лиц с психическими нарушениями наблюдается, прежде всего, в развитых странах, что, по мнению ряда специалистов, объясняется не только улучшением выявляемости нарушений психической деятельности, но и комплексом факторов, способствующих их истинному росту. Психические заболевания, как правило, поражают лиц трудоспособного возраста и зачастую оказываются причинами значительного снижения качества жизни больных, а также длительной и рецидивирующей нетрудоспособности.

Заболевания и проблемы со здоровьем появляются из-за совокупности множества факторов: окружающей среды, пищи, образа жизни, режима. Нельзя забывать, что внутреннее состояние человека также играет большую, а может и более весомую роль. Наверное, многие замечали, что под воздействием стресса или напряженной ситуации, организм выдает определённые физические реакции. Может подняться температура, возникнуть головная боль, обостриться аллергия – это признаки психосоматического заболевания.

Недавно, в медицине разделили все заболевания на физические и психические, пока в середине девятнадцатого века Франц Александр не выделил еще один тип – психосоматический. После этого, психосоматика стала подробно изучать заболевания, спровоцированные психическими факторами.

В настоящее время ситуация немного изменилась, теперь любое заболевание можно рассматривать с точки зрения психосоматики. Эмоции человека включают в себя не только

психологический, но и биологический компонент, поэтому, когда мы их никак их не проявляем, активизируется биологический компонент. Это приводит к различным сбоям в организме и работе нервной системы.

Коротко говоря, болезнь возникает из-за того, что эмоции не получили выхода и психика их не обработала. Возникает психологическое напряжение, оно воздействует на органы и системы, приводит к нарушениям. При постоянных повторениях могут возникнуть необратимые изменения в органах и тканях, а заболевания приобрести хроническую форму. Реакции у людей проявляются по-разному, речь идёт об отрицательных эмоциях, которые не все способны правильно проявлять. Необходимо поддерживать уравновешенное психоэмоциональное состояние, уметь контролировать негативные эмоции и правильно их проживать.

Исходя из природы возникновения психосоматических расстройств, их лечение требует комплексного подхода. Терапия включает в себя как психо-, так и фармакотерапию. Лечение должно быть направлено на саму личность пациента и на стабилизацию его эмоционального ощущения. Поэтому, каждый отдельный случай требует индивидуального подхода. Человека в современном мире стресс преследует везде: на работе, в личной жизни. Мы постоянно спешим, волнуемся, и негативные эмоции захлёстывают одна за другой. Нашей основной задачей является – забота о своём психическом здоровье.

Для достижения этой цели необходимо не допускать отрицательным переживаниям оказывать воздействие на нашу личность. И тогда жизнь намного станет легче, а здоровье крепче. Нами было проведено анкетирование, целью которого явилось выявление социально-психологического климата группы Медицинского колледжа медицинского института «БелГУ».

Наш анкетный лист состоял из 5 вопросов, с помощью которых мы установили социально-психологический климат среди 25 студентов группы.

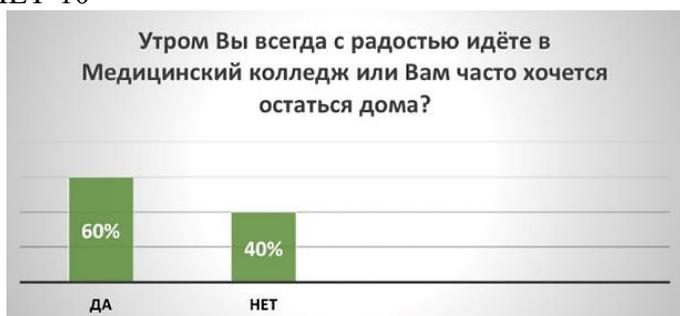
Вопрос 1

Нравится ли Вам учёба в Медицинском колледже? ДА-20, НЕТ-15



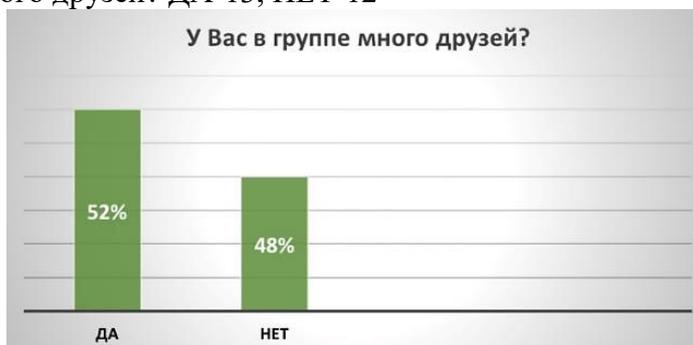
Вопрос 2

Утром Вы всегда с радостью идёте в Медицинский колледж или Вам часто хочется остаться дома? ДА-15, НЕТ-10



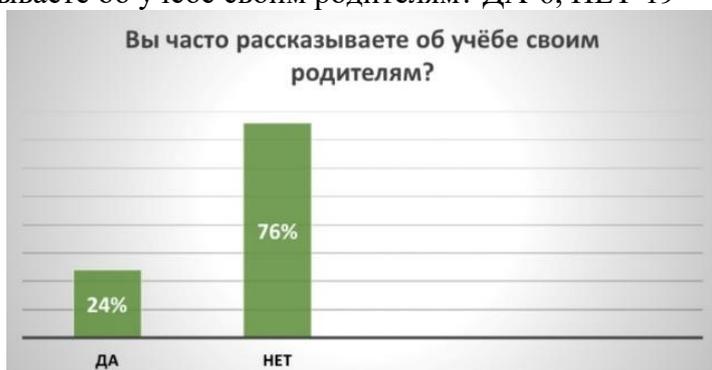
Вопрос 3

У Вас в группе много друзей? ДА-13, НЕТ-12



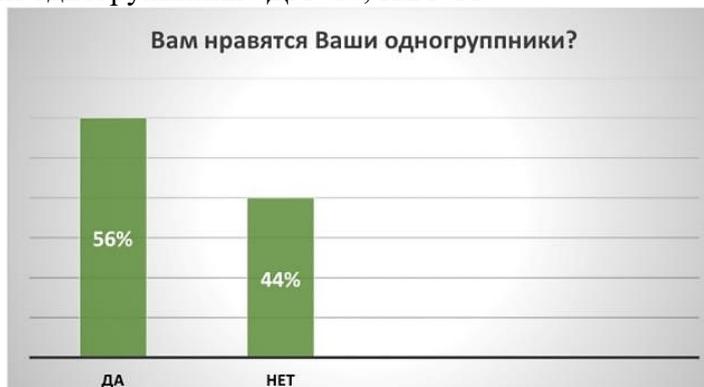
Вопрос 4

Вы часто рассказываете об учёбе своим родителям? ДА-6, НЕТ-19



Вопрос 5

Вам нравятся Ваши одногруппники? ДА- 14, НЕТ-11



Исходя из ответов, мы сделали следующие выводы:

- На первый вопрос «Нравится ли Вам учёба в Медицинском колледже?» ДА ответили 80% респондентов, НЕТ-20%.

-На второй вопрос «Утром Вы всегда с радостью идёте в Медицинский колледж или Вам часто хочется остаться дома?» ДА ответили-60% опрошенных и 40%-НЕТ.

-На следующий вопрос «У Вас в группе много друзей?» ДА ответили-52% студентов и 48% выбрали НЕТ

-На четвёртый вопрос «Вы часто рассказываете об учёбе своим родителям и друзьям?» ДА ответили-24% и НЕТ-76%.

-На последний вопрос «Вам нравятся ваши одногруппники?» ДА ответили 56% и 44%-НЕТ.

Проведенное исследование показало немаловажное значение социально-психологического климата группы для жизни и здоровья обучающихся.

Выявлено, что благоприятная атмосфера в группе не только продуктивно влияет на результаты ее, но и перестраивает человека, формирует его новые возможности и проявляет потенциальные. В связи с этим возникает необходимость в оптимизации стиля межличностного взаимодействия.

1. Межличностные отношения характеризуют особенности восприятия и понимания людьми друг друга, степень межличностной привлекательности, взаимовлияния и поведения.

2. Коллектив, обучающихся студентов, определяется как группа людей, объединенных общей работой, интересами и целями. Это сложная система отношений, в которой выделяются формальные и неформальные взаимоотношения. Характер межличностных отношений в коллективе определяется личностными особенностями членов коллектива и социальными условиями, и условиями для продуктивной учёбы.

Библиографический список

1. Берн, Эрик Игры, в которые играют люди. Психология человеческих взаимоотношений. Люди, которые играют в игры. Психология человеческой судьбы / Эрик Берн. – М.: Лениздат, 2018. – 400 с.
2. Здоровый мозг на долгую жизнь. – М.: Издательский Дом Ридерз Дайджест, 2017. – 320 с.
3. Леви, Владимир Не только депрессия. Охота за настроением / Владимир Леви. – М.: Торобоан, 2019. – 352 с.
4. Удивительная сила эмоций. Исцеление от эмоциональных травм. 10 шагов на пути к управлению. – Москва: Мир, 2017. – 812 с.
5. Шишков, Валерий Если нет сил? Астенические и депрессивные состояния / Валерий Шишков. – М.: Речь, 2020. – 224 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ УКОРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ БОМБЕЗИНА К ГАСТРИН-РЕЛИЗИНГ ПЕПТИДНОМУ РЕЦЕПТОРУ

Горислав А.А., Мащенко П.С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В настоящем исследовании проводится сравнение двух молекул (AU-RM26-M1 и DOTAGA-P2-RM26 с последовательностями соответственно DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Sta-Leu-NH₂ и DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂), таргетированных на гастрин-релизинг пептидный рецептор (ГРПР) и являющихся его антагонистами и укороченными аналогами бомбесина. В исследовании рассчитывается константа их диссоциаций в ГРПР, что необходимо для оценки аффинности.

Ключевые слова. Рак предстательной железы, укороченные аналоги бомбесина, гастрин-релизинг пептидный рецептор, исследование аффинности при помощи LigandTracer Yellow.

GASTRIN-RELEASING PEPTIDE RECEPTOR AFFINITY STUDY OF SHORT BOMBESIN-LIKE PEPTIDES

Gorislav A.A., Mashchenko P.S.

Perm State University, Perm, Russia

Abstract. The present study compares two molecules (AU-RM26-M1 and DOTAGA-P2-RM26 which have formulas DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Sta-Leu-NH₂ and DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂ respectively) targeting the gastrin-releasing peptide receptor (GRPR) and which are its antagonists and short bombesin analogues. In this study their dissociation constants with GRPR were measured, which is necessary to calculate the affinity.

Keywords: Prostate cancer, short bombesin-like peptides, gastrin-releasing peptide receptor, affinity, Ligand tracer Yellow

На сегодняшний день рак предстательной железы (РПЖ) является наиболее часто диагностируемым онкологическим заболеванием и вторым по распространённости видом рака среди мужчин [1]. Основными методами диагностики РПЖ являются определение уровня простатспецифического антигена (ПСА), ректальное исследование, мультипараметрическая магнитно-резонансная томография (МРТ) и биопсия предстательной железы (БПЖ) под контролем трансректального ультразвукового исследования (ТРУЗИ) [2]. В случаях с повышенным уровнем простатспецифического антигена (ПСА) и увеличенной предстательной железой за процедурой скрининга последует гистопатологическое исследование образцов биопсии с множественной трансректальной ультрасонографией для

подтверждения РПЖ [3]. Однако ни один из вышеупомянутых методов не является достаточно надёжным, чтобы исключить наличие рака наверняка [4].

В связи с этим существует неудовлетворённая клиническая потребность в разработке и исследовании новых препаратов, которые можно использовать для диагностики, в частности, визуализации и терапии рака предстательной железы. Сочетанием этих задач занимается тераностика – перспективный и многообещающий подход к созданию фармацевтических композиций, заключающийся в комплексном решении терапевтических и диагностических проблем путём создания препаратов, которые являются одновременно и средством диагностики, и терапевтическим агентом [5]. Концептуально тераностика приближена к таргетной терапии, поскольку обязательным компонентом тераностического препарата является модуль направленной доставки, обеспечивающий прицельную доставку агента к поражённым клеткам.

Таргетная терапия – одно из наиболее перспективных и многообещающих направлений терапии раковых заболеваний. Её особенность заключается в том, что таргетный препарат убивает напрямую раковые клетки или блокирует их рост с помощью вмешательства в механизм действия конкретных целевых молекул, необходимых для канцерогенеза и роста опухоли [6].

Также важно отметить, что на сегодняшний момент активно развиваются методы ядерной медицины, делящиеся на два принципиальных направления: радионуклидная терапия и радионуклидная диагностика. Сейчас область разработки радиофармацевтических препаратов активно развивается. Так, в период с 2020 по 2022 год FDA одобрила три радиофармацевтических препарата для терапии рака предстательной железы: ^{68}Ga -PSMA-11, ^{18}F -DCFPr1 и ^{177}Lu -PSMA-617.

В настоящее время радионуклидная терапия используется не только для терапии раковых заболеваний. В числе методов радионуклидной диагностики заслуживает отдельного упоминания молекулярная визуализация для неинвазивного выявления специфических опухолевых мишеней с применением радиоизотопов. Для этого в том числе активно применяются тераностические препараты с радиоизотопной меткой [7].

Одной из таких таргетных мишеней для рака предстательной железы может служить гастрин-релизинг пептидный рецептор [4] (ГРПР, также известен как рецептор бомбезина подтипа 2 или РБП2) – рецептор, связанный с G-белком и состоящий из 384 аминокислот, эндогенным лигандом которого является пептид, высвобождающий гастрин [8]. ГРПР избыточно экспрессируется в опухолевых клетках большинства видов рака предстательной железы и в некоторых почечно-клеточных раках [9]. Так, при первичном раке предстательной железы сверхэкспрессия ГРПР наблюдалась в 63-100% случаев [10], что делает этот рецептор крайне интересной мишенью.

Открытие сверхэкспрессии ГРПР при некоторых видах рака открыло возможность использования аналогов бомбезина для визуализации и лечения этих видов рака. Радиофармацевтические препараты на основе бомбезина имеют большие перспективы для выявления рака предстательной железы на начальных стадиях заболевания и для оценки олигометастазирования [4], то есть наличия наряду с первичной опухолью лёгкого солитарного метастатического очага в другом органе.

Бомбезин (БМ) – пептид из 14 аминокислот, первоначально извлечённый из кожи европейской огнебрюхой жабы [11]. В последние десятилетия было разработано множество синтетических аналогов бомбезина. Например, RM26, антагонист-аналог бомбезина. В его

случае было выполнено несколько модификаций исходной укороченной последовательности [Leu^{13}]БМ для увеличения стабильности и аффинности связывания с ГРПР [4].

Радиофармацевтические препараты на основе бомбезина имеют большие перспективы для выявления рака предстательной железы на начальных стадиях заболевания. Эта задача требует от радиофармацевтических препаратов очень высоких чувствительности и специфичности.

Разберём структуру радиофармацевтических препаратов, изучаемых в настоящем исследовании. На схеме (рисунок 1) ниже представлена общая конструкция:

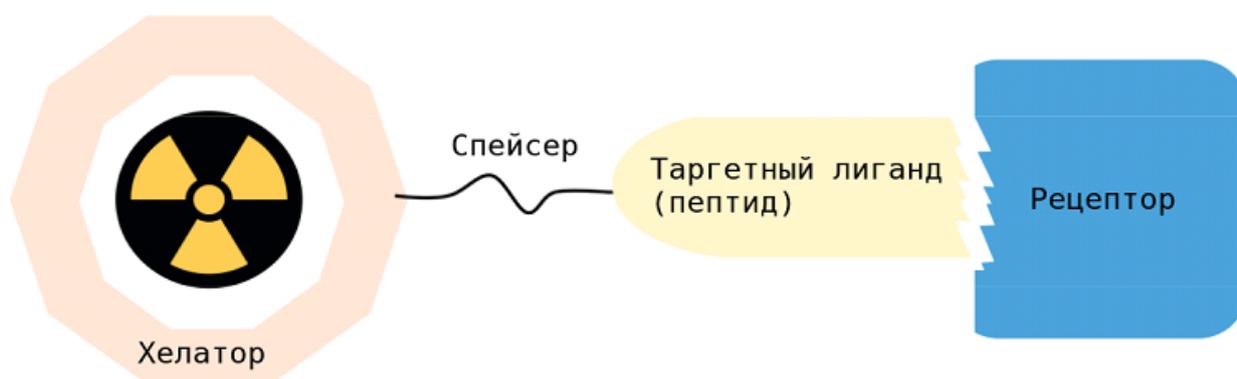


Рисунок 1 – Схема строения радиофармацевтического препарата.

Во-первых, хелатор, в роли которого в настоящем исследовании используется DOTAGA. Хелатор необходим для того, чтобы можно было пометить таргетированную молекулу радиоактивным металлом. Выделяют два класса хелаторов: макроциклические и ациклические (алифатические). Обычно используемые макроциклические хелаторы для радиоактивных лантанидов являются различными производными DOTA. Высокая кинетическая инертность комплекса обеспечивает стабильность связи с радионуклидом, однако из-за медленной скорости ассоциации для введения метки требуется повышенная температура. DOTA-производные зачастую используются для мечения коротких пептидов, которые довольно устойчивы при температурах 60-90°C. Большинство ациклических полиаминополикарбоксилатных хелаторов являются различными производными ДТПА (диэтилентриаминопентауксусная кислота). Комплексы различных производных ДТПА с металлами обладают требуемой стабильностью. Хотя ациклические хелаторы менее инертны, и, следовательно, менее устойчивы, чем макроциклические, введение метки проходит быстро даже при комнатной температуре. По этой причине их используют для мечения моноклональных антител, которые нельзя нагревать. DOTAGA как макроциклический хелатор в комплексе с определёнными металлами кинетически инертен и менее склонен к диссоциации *in vivo* по сравнению с ациклическими хелаторами [4].

Во-вторых, спейсер, которым является полиэтиленгликоль-2 (ПЭГ). Роль спейсера заключается в повышении аффинности связывания с рецептором [12], хотя в некоторых случаях он может снижать аффинность, а также изменять фармакокинетические свойства конъюгата. Установлено, что прямое связывание хелатирующего фрагмента с N-концом укороченного лиганда бомбезина снижает аффинность. По имеющимся данным, отсутствие спейсера между хелатором DOTA и аналогом бомбезина приводит к стократному снижению аффинности связывания с ГРПР по сравнению с той же конструкцией, содержащей 8-углеродный алифатический спейсер [13]. Спейсер влияет на биораспределение и

таргетирование. Предпочтительно использовать более гидрофильный спейсер, поскольку вывод гидрофобных молекул осуществляется через печень, что приводит к нежелательному повышенному фону в брюшной области [13].

В-третьих, пептид, в роли которого выступает RM26, антагонист-аналог бомбезина. В его случае было выполнено несколько модификаций исходной укороченной последовательности [Leu¹³]БМ для увеличения стабильности и повышения аффинности связывания с ГРПР. Наличие гидроксильной группы в положении 13 важно для взаимодействия с ГРПР. Кроме того, легко окисляемый Met14 был заменен остатком Leu14 [4, 14].

В настоящем исследовании проводится сравнение двух молекул (AU-RM26-M1 и DOTAGA-P2-RM26 с последовательностями соответственно DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Sar-His-Sta-Leu-NH₂ и DOTAGA-PEG2-DPhe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Sta-Leu-NH₂), таргетированных на гастрин-рилизинг пептидный рецептор (ГРПР) и являющихся его антагонистами и укороченными аналогами бомбезина. Они отличаются только одной аминокислотной заменой (на 11 позиции вместо глицина у AU-RM26-M1 стоит саркозин):

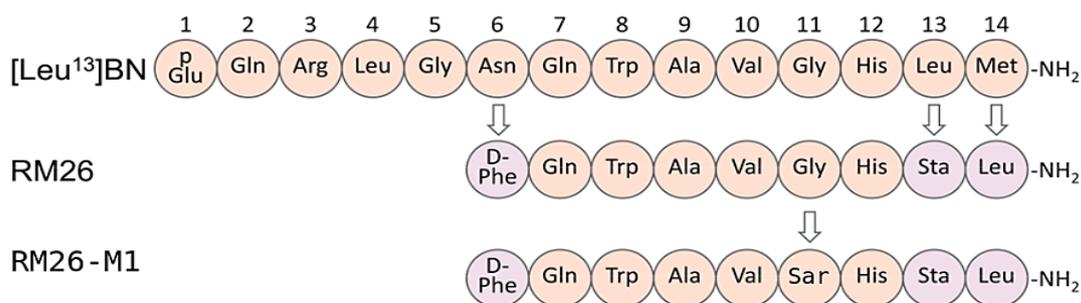


Рисунок 2 – Сравнительное строение пептидов.

DOTAGA-P2-RM26 уже ранее исследовалось. Так, согласно предыдущим исследованиям, DOTAGA-PEG2-RM26 имеет достаточно высокие значения IC₅₀ на клеточной линии PC3, равные 4,8±0,5 нМ, а также отличается сравнительно низким уровнем накопления в органах, экспрессирующих ГРПР, в моделях самок мышей линии BALB/c nu/nu с привитыми PC3 ксенографтами. Более того, показано, что поглощение печенью DOTAGA-RM26-M1, образующего отрицательно заряженный комплекс с индием-111, было в 6 раз ниже, чем у положительно заряженного конъюгата NOTA-RM26-M1 [15].

Для радиомечения индием-111 в реакционную смесь добавили 3 наномоля пептида, 40 мкл буферного раствора 0.2 М NH₄Ac (ацетат аммония), pH 5.5, и 40 мкл ¹¹¹InCl₃ (хлорид индия-111 (III)), ~10 МБк активности на 1 наномоль пептида. Смесь инкубировали при температуре 85°C в течение 30 минут. Радиохимический выход полученных радиомеченых соединений изучили при помощи ТСХ на Cyclone Plus Phosphor Imager (PerkinElmer, Inc.). В качестве элюента используют 0.2 М лимонную кислоту.

Для работы на LigandTracer Yellow, используемого для определения аффинности, за сутки до эксперимента засеяли чашки Петри клетками линии PC3 по 3 млн в 3 мл. Чашки под наклоном оставили в инкубаторе на сутки, чтобы клетки находились только на нижней половине чашки и прикрепились к ней.

На следующий день клеточную среду удалили вакуумным насосом, промыли 8 мл свежей среды, удалили вакуумным насосом, добавили 3 мл свежей среды так, чтобы она покрыла только клетки. Чашку поставили в LigandTracer Yellow и оставили замеряться фон на

40-60 минут. Затем последовательно добавляли концентрации 1 нМ, 3 нМ и 9 нМ приблизительно каждые полтора часа (до выравнивания кривой), после чего удаляли радиоактивную среду. Добавляли свежую среду (концентрация стала 0 нМ), чтобы посчитать диссоциацию.

Сущность работы LigandTracer Yellow [17] в том, что после установления базового сигнала (фона) добавляют жидкость, содержащую меченый лиганд, в нашем случае – радиоактивный. Детектор, установленный над приподнятой частью чашки, измеряет интенсивность сигнала как от области клеток, так и от эталонной области (в нашем случае бесклеточной), что позволяет вычитать фоновый сигнал из сигнала, получаемого от области засеянной клетками каждый оборот. По мере того как лиганд взаимодействует с клетками с течением времени, генерируется ответ, представляющий скорость ассоциации и диссоциации лиганда с рецептором.

Данные обрабатываются в программе TraceDrawer для получения значения аффинностей для каждого соединения (КД). Для обработки используются две основные модели [85]. OneToOne описывает связывание одного моновалентного лиганда с одной мишенью. Это простейшая модель взаимодействия, во многих случаях близкая к реальности. OneToTwo – это модель взаимодействия, предназначенная для измерений, в которых лиганд в растворе связывается с двумя независимыми мишенями. OneToTwo часто обеспечивает “лучшее” соответствие лиганда к мишени, чем модель OneToOne, поскольку обладает большей гибкостью. В нашем проекте при обработке данных, производилось сравнение значений аффинности полученных с использованием OneToOne и OneToTwo моделей.

OneToOne описывает связывание одного моновалентного лиганда с одной мишенью. Это простейшая модель взаимодействия, но во многих случаях близкая к реальности. OneToTwo – это модель взаимодействия, предназначенная для измерений, в которых лиганд в растворе связывается с двумя независимыми мишенями. OneToTwo зачастую обеспечивает “лучшее” соответствие, чем модель OneToOne, поскольку обладает большей гибкостью.

Данные по аффинности исследуемых соединений к ГРПР представлены в таблице. Также ниже представлены графики, из которых можно сделать вывод, что с большой долей вероятности оба соединения имеют больше одного сайта связывания, так как наилучшее соответствие экспериментально полученных данных к теоретической кривой показала модель OneToTwo.

Таблица – Значения констант диссоциации

Соединение	OneToOne, КД (М)	OneToTwo, КД1 (М)	OneToTwo, КД2 (М)
[¹¹¹ In]In-AU-RM26-M1	9.54*10 ⁻¹¹	8.50*10 ⁻¹⁰	1.75*10 ⁻⁹
[¹¹¹ In]In-DOTAGA-P2-RM26	2.78*10 ⁻¹⁰	1.33*10 ⁻¹⁰	4.21*10 ⁻⁹

Библиографический список

1. Копыльцов Е. И., Новиков А. И., Косенок В. К., Леонов О. В., Голубь Н. Н., Акулинин В. А., Jacqmin D., Massard G. Онкологические заболевания органов мочеполовой системы. – Омск: Изд-во Центра МО и ИТ Омской гос. мед. академии, 2008. – 197 с.

2. Коссов Ф.А. Комплексная магнитно-резонансная томография в оценке стадии рака предстательной железы: дис. канд. мед. наук: 14.01.13. – М., 2018. – 137 с.
3. Скрининг рака предстательной железы: методические рекомендации / А.В. Сивков, И.В. Чернышев, Т.С. Перепанова, В.Н. Ощепков, Н.Г. Кешишев. – 2006. – №543-ПД/623.
4. Mitran B. Prostate cancer theranostics using GRPR antagonist RM26. – Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy, 2019. – 82 с.
5. Бабаев А.Б. Отечественная флуоресцентная видеосистема в фотодинамической тераностике немышечно-инвазивного рака мочевого пузыря: дис. д-р. мед. наук: 14.01.12. – М., 2020. – 110 с.
6. Definition of targeted therapy // NCI Dictionary of Cancer Terms URL: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/targeted-therapy> (дата обращения: 5.04.2022).
7. Чернов В.И., Брагина О.Д., Синилкин И.Г., Медведева А.А., Зельчан Р.В. Радионуклидная тераностика злокачественных образований // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2016. – №97(5). – С. 306-313.
8. Benya R.V., Kusui T., Pradhan T.K., Battey J.F., Jensen R.T. Expression and characterization of cloned human bombesin receptors // Molecular Pharmacology. – 1995. – №47(1). – С. 10-20.
9. Cornelio D.B., Roesler R., Schwartzmann G. Gastrin-releasing peptide receptor as a molecular target in experimental anticancer therapy // Annals of Oncology. – 2007. – №18. – С. 1457-1466.
10. Markwalder R., Reubi J.C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation // Cancer research. – 1999. – №59. – С. 1152–1159.
11. Anastasi A., Erspamer V., Bucci M. Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the European amphibians Bombesina and Alytes // Experientia. – 1971. – №27. – С. 166-169.
12. Varasteh Z., Rosenström U., Velikyan I., Mitran B., Altai M., Honarvar H., Rosestedt M., Lindeberg G., Sörensen J., Larhed M., Tolmachev V., Orlova A. The Effect of Mini-PEG-Based Spacer Length on Binding and Pharmacokinetic Properties of a 68Ga-Labeled NOTA-Conjugated Antagonistic Analog of Bombesin // Molecules. – 2014. – №19. – С. 10455-10472.
13. Hoffman T.J., Gali H., Smith J.C., Sieckman G.L., Hayes D.L., Owen N.K., Volkert W.A. Novel Series of 111In-Labeled Bombesin Analogs as Potential Radiopharmaceuticals for Specific Targeting of Gastrin-Releasing Peptide Receptors Expressed on Human Prostate Cancer Cells // Journal of Nuclear Medicine. – 2003. – №44. – С. 823–831.
14. Schottelius M., Wester H.-J. Molecular imaging targeting peptide receptors // Methods. – 2009. – №48. – С. 161–177.
15. Mitran B., Varasteh Z., Selvaraju R.K., Lindeberg G., Sörensen J., Larhed M., Tolmachev V., Rosenström U., Orlova A. Selection of optimal chelator improves the contrast of GRPR imaging using bombesin analogue RM26 // International Journal of Oncology. – 2016. – №48(5). – С. 2124-2134.
16. Seeding cells for LigandTracer® // LigandTracer® URL: <https://www.ligandtracer.com/download/protocol-ligandtracer-seeding-cells-for-ligandtracer/> (дата обращения: 10.06.2022).
17. Product Specification LigandTracer® Yellow // LigandTracer® URL: <https://www.ligandtracer.com/download/product-specification-ligandtracer-yellow/> (дата обращения: 10.06.2022).

ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β -1 ГЛИКОПРОТЕИНА НА МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ КРЫС ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА

Гутина Е.В. Бочкова М.С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты эксперимента по изучению влияния коротких пептидных фрагментов (YQCE, YECE и YACS) трофобластического β -1-гликопротеина (ТБГ) на маркеры воспаления крыс Wistar на фоне аллогенной трансплантации костного мозга. Оценивалась динамика концентраций двух белков острой фазы воспаления: α -1-кислотного гликопротеина (AGP, орозомукоид) и α -2-макроглобулина (α 2M). Установлено, что аллотрансплантация костного мозга вызывала повышение концентраций исследуемых маркеров воспаления, но иммунофармакологического эффекта введения пептидных фрагментов не наблюдалось. Таким образом, короткие пептидные фрагменты ТБГ не оказали значимого эффекта на уровень орозомукоида и α 2M на фоне аллогенной трансплантации костного мозга.

Ключевые слова: короткие пептидные фрагменты ТБГ, аллогенная трансплантация, α -1-кислотный гликопротеин, альфа-2-макроглобулин.

THE EFFECT OF SHORT PEPTIDE FRAGMENTS OF TROPHOBLASTIC β -1 GLYCOPROTEIN ON MARKERS OF RAT INFLAMMATION IN ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

Gutina E.V. Bochkova M.S.

Perm State University, Perm, Russia

Abstract. The results of an experiment to study the effect of short peptide fragments (YQCE, YECE and YACS) of trophoblastic β -1-glycoprotein (PSG) are presented on markers of Wistar rat inflammation against the background of allogeneic bone marrow transplantation. The dynamics of concentrations of two proteins of the acute phase of inflammation were evaluated: α -1-acid glycoprotein (AGP, orosomucoid) and α -2-macroglobulin (α 2M). It was found that bone marrow allotransplantation caused an increase in the concentrations of the studied markers of inflammation, but the immunopharmacological effect of the introduction of peptide fragments wasn't observed. Thus, short peptide fragments of TBG didn't have a significant effect on the level of orosomucoid and α 2M against the background of allogeneic bone marrow transplantation.

Keywords: short peptide fragments of PSG, allogeneic transplantation, α -1-acid glycoprotein, alpha-2-macroglobulin.

ВВЕДЕНИЕ

Главная проблема трансплантологии – отторжение пересаженных клеток, тканей и органов, являющееся следствием иммунного ответа реципиента на чужеродные антигены донорских тканей. Для решения этой проблемы применяются мощные иммуносупрессорные препараты системного действия, использование которых приводит к снижению устойчивости пациента к инфекциям и другим осложнениям.

На современном этапе для создания новых препаратов с меньшими негативными эффектами проводятся исследования биологических эффектов пептидов. Их главным преимуществом является возможности включения в естественные биохимические пути и осуществление терапии с меньшими побочными эффектами.

В нашей работе мы изучали эффекты коротких пептидных фрагментов (YQCE, YECSE и YACS) белка плаценты трофобластического β -1-гликопротеина (ТБГ) на фоне аллотрансплантации костного мозга. Известно, что ТБГ обладает выраженным иммуномодулирующим действием [1,2], а терапевтический эффект рекомбинантного ТБГ был показан в экспериментах на животных с индуцированными аутоиммунными заболеваниями [3] и острой реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [4].

Однако, получение целой нативной молекулы ТБГ сопряжено с множеством трудностей методологического и этического характера. Для создания фармакологического препарата предпочтительнее использование молекул, полученных методом химического синтеза. В нашей работе, проведенной в рамках международного научного проекта «Оценка иммунофармакологического потенциала пептидных фрагментов ТБГ в контексте их применения в трансплантологии» короткие пептидные фрагменты YECSE, YQCE, YVCS и YACS ТБГ рассматривались в качестве возможных иммуномодуляторов для решения проблем отторжения в трансплантологии [5].

Для оценки эффектов пептидных фрагментов на активность воспалительных процессов проводили оценку концентраций двух белков острой фазы воспаления: α -1-кислотного гликопротеина (AGP, орозомукоид) и α -2-макроглобулина (α 2M) в эксперименте *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования в эксперименте *in vivo* послужили самцы белых крыс популяции Wistar (n=55) возраст 2,5 мес., средней массой 224 г. Выведение животных из эксперимента проводилось на 3, 7, 14 и 21 сутки в соответствии с международными правилами проведения работ с экспериментальными животными. В работе использовали оригинальную модель реакции «хозяин против трансплантата» (РХПТ), разработанную по аналогии с моделью реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [6].

Животные были разделены на 4 группы: интактные животные (n=5), контрольная группа (KM) (n=16), опытная группа (KM+П) (n=17) и животные, которым вводились только пептидные фрагменты (n=17). Контрольной (KM) и опытной группе (KM+П) вводили взвесь костного мозга: 10^7 клеток, обработанных камптотечином (50 мкг/мл, «Tocris Bioscience», Великобритания), в 100 мкл физиологического раствора внутривентриально. Коктейль коротких пептидных фрагментов двум экспериментальным группам вводили внутримышечно, концентрация каждого пептидного фрагмента составила 12,5 мкг/мл.

Оценку концентраций двух факторов воспаления: α -1-кислотного гликопротеина (AGP, орозомукоид) и α -2-макроглобулина (α 2M) проводили сэндвич-методом иммуноферментного анализа (ИФА), с помощью наборов фирмы Cloud-Clone Corp. (США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программы GraphPad Prism 8, используя двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) и post-hoc тест Тьюки для множественных сравнений. Данные представлены в виде медианы (Me) и первого и третьего квартиля (Q1-Q3). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

AGP или орозомукоид является основным белком острой фазы у людей, крыс, мышей и других видов, вырабатываемым в печени и в местах воспаления (макрофагами) [7]. Выработка орозомукоида в печени и концентрация в сыворотке крови повышаются в ответ на системное повреждение и считается, что он может быть использован в качестве биомаркера для диагностики ряда заболеваний [8].

При обработке данных отмечено статистически значимое повышение концентрации орозомукоида на 14 сутки эксперимента в группе КМ относительно значений на 3 сутки эксперимента (см. рис 1), что свидетельствует о развитии воспалительной реакции на аллотрансплантат. Однако, концентрация орозомукоида на 14 сутки значимо увеличилась и в группе КМ+П относительно значений на 3 и 7 сутки и оставалась высокой на 21 сутки эксперимента, на основании чего можно говорить об отсутствии нормализующего эффекта пептидных фрагментов на концентрацию орозомукоида. Статистически значимого увеличения концентрации орозомукоида в группе, которой вводились только пептиды (П), выявлено не было.

$\alpha 2M$, белок острой фазы воспаления, являющийся членом суперсемейства альфа-макроглобулинов, состоящего из $\alpha 1$ макроглобулина, $\alpha 2$ макроглобулина, компонентов комплемента (C3, C4 и C5) и белка зоны беременности [9]. $\alpha 2M$ известен своей способностью ингибировать широкий спектр протеаз без прямой блокировки активного центра протеазы. Ряд иммунологически важных реакций включает протеазозависимую стадию, которая может быть модифицирована α -2 макроглобулином [10].

При анализе концентраций $\alpha 2M$ отмечено статистически значимое повышение концентрации в группах КМ и КМ+П на 3 и 7 сутки и в группе КМ+П на 14 сутки эксперимента относительно значений концентрации в этих группах на 21 сутки. Таким образом, трансплантация костного мозга вызывала значимое увеличение концентрации $\alpha 2M$, при этом введение пептидных фрагментов ТБГ значимо не изменяло концентрацию $\alpha 2M$. На 21 сутки отмечалось снижение концентраций в КМ и КМ+П относительно 7 и 14 суток эксперимента. Интересно, что в группе, которой вводили только пептиды (П) отмечалось значимое увеличение концентрации относительно группы интактных животных, которое исчезло к 14 суткам эксперимента.

Таким образом, аллотрансплантация костного мозга вызывала увеличение концентрации орозомукоида и $\alpha 2M$, что подтверждает их диагностическую значимость при формировании иммунного ответа на аллотрансплантат. В то же время, между опытной (КМ+П) и контрольной группой (КМ) статистически значимых различий по изучаемым маркерам выявлено не было. Однако, как ранее было нами показано, на уровне цитокинового профиля, пептиды ТБГ демонстрируют незначительный иммунофармакологический эффект [5]. В целом, можно сделать вывод, что введение коктейля коротких пептидных фрагментов не оказывало терапевтического эффекта на уровне орозомукоида и $\alpha 2M$.

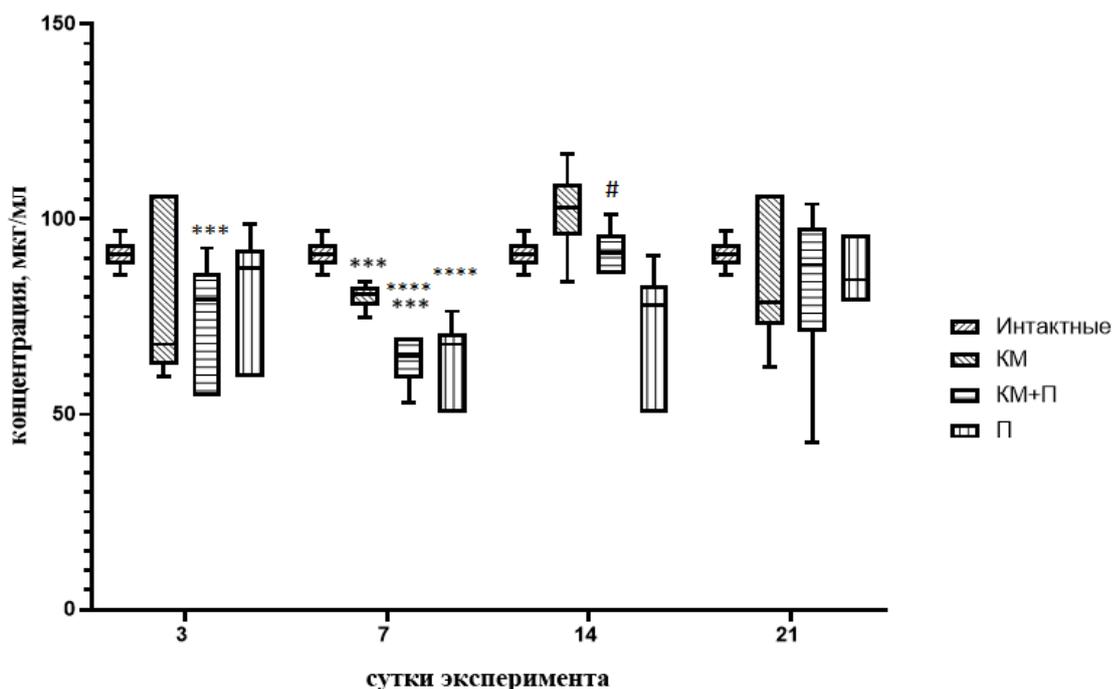


Рисунок 1 – Изменение концентрации оромукоида под влиянием аллотранспланта костного мозга и введения пептидов ТБГ (n=55).

Примечание для рис.1 и рис.2: указаны значения p (двухфакторный дисперсионный анализ) только $<0,05$; * – статистически значимые различия по отношению к группе интактных крыс; ** – внутри группы по отношению к 7 суткам после АТ; *** – внутри группы по отношению к 14 суткам после АТ; **** – внутри группы по отношению к 21 суткам после АТ; # – по отношению к контрольной группе; ## – по отношению к группе животных, которым вводили пептиды ТБГ.

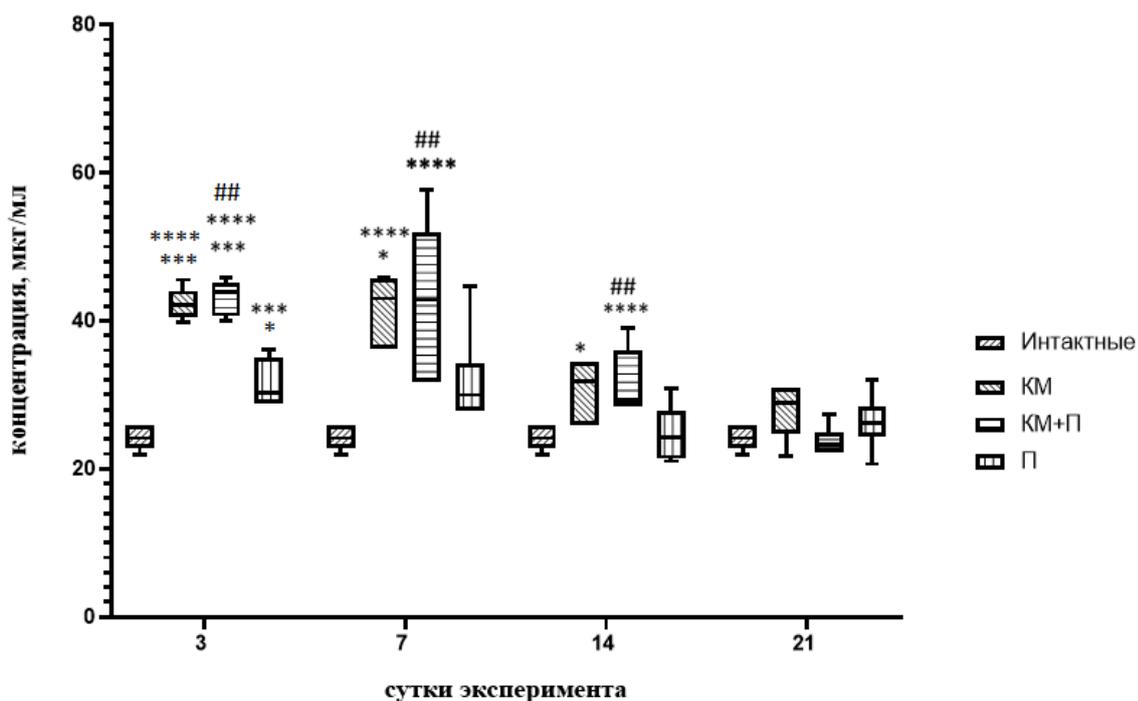


Рисунок 2 – Изменение концентрации альфа2-макроглобулина под влиянием аллотрансплантации костного мозга и введения пептидов ТБГ (n=55).

Исследование выполнено при финансовой поддержке правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/509.

Библиографический список

1. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Раев М.Б., Храмцов П.В., Заморина С.А. Иммунорегуляторный потенциал трофобластического β 1-гликопротеина // Медицинская иммунология. – 2021 – Т. 23 – № 3. – С. 455-468.
2. Blois S.M., Sulkowski G., Tirado-González I., Warren J., Freitag N., Klapp B., Rifkin D., Fuss I., Strober W., Dveksler G. Pregnancy-specific glycoprotein 1 (PSG1) activates TGF- β and prevents dextran sodium sulfate (DSS)-induced colitis in mice. // *Mucosal Immunol.* – 2014 – V. 7 – P. 348-358.
3. Falcón C.R., Martínez F.F., Carranza F. In vivo expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a inhibits the symptoms of collagen-induced arthritis. // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2014. – № 72. – P. 527-533.
4. Jones K., Bryant S., Luo J. Recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1 has a protective role in a murine model of acute graft-versus-host disease. // *Biol. Blood Marrow Transplant.* – 2019. – № 25. – P. 193-203.
5. Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиюк С.В., Гутина Е.В., Раев М.Б., Любимов А.В., Заморина С.А. Влияние коротких пептидных фрагментов ТБГ на цитокиновый профиль крыс Wistar при аллогенной трансплантации в эксперименте *in vivo*. // Медицинская иммунология. – 2022 – Т.24 – №3 – С.491-506.
6. Hardt F. Claësson M.H. Graft-versus-host reactions mediated by spleen cells from amyloidotic and nonamyloidotic mice. // *Transplantation.* – 1971. – V. 1 – № 12. – P.36-39.
7. Liu J, Marey MA, Kowsar R, Hambruch N, Shimizu T, Haneda S, Matsui M, Sasaki M, Hayakawa H, Pfarrer C, Miyamoto A. An acute-phase protein as a regulator of sperm survival in the bovine oviduct: alpha 1-acid-glycoprotein impairs neutrophil phagocytosis of sperm *in vitro*. // *J Reprod Dev.* – 2014 – V. 5. – № 60 – P. 342-348.
8. Hocheleid T., Berger F.G., Baumann H., Libert C. Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2003 – V.14 – №1 – P. 25-34.
9. Rehman A. A, Ahsan H., Khan F.H. α -2-Macroglobulin: a physiological guardian. // *Cell Physiol.* – 2013 – V.8 – № 228 – P.1665-1675.
10. Werb Z., Burleigh M.C., Barrett A.J., Starkey P.M. The interaction of alpha2-macroglobulin with proteinases. Binding and inhibition of mammalian collagenases and other metal proteinases // *Biochem J.* – 1974 – V.139 – №2 – P. 359-368.

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА

Дробот А.А.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия
Иосифовича Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия*

Аннотация. В статье представлено исследование аллельных вариантов генов цитокинов в слюне в зависимости от микрофлоры полости рта. В ходе исследования было выявлено, что в группе с повышенным содержанием микроорганизмов распределение частот генотипов по полиморфизму $-511T>C$ гена *IL1 β* статистически значимо отличается от группы с нормальным содержанием микроорганизмов в слюне, в то время как для полиморфизмов $-174G>C$ гена *IL6*, $-1082G>A$ гена *IL10* и $-197G>A$ гена *IL17A* не выявлено различия между группами.

Ключевые слова: Микрофлора полости рта, цитокины, полиморфизм генов.

RESEARCH OF ALLELIC VARIANTS OF CYTOKINE GENES DEPENDING ON THE STATE OF THE ORAL MICROFLORA

Drobot A.A.

*Southern Federal University, Dmitry Iosifovich Ivanovsky Academy of Biology and Biotechnology,
Rostov-on-Don, Russia*

Abstract. The article presents a study of allelic variants of cytokine genes in saliva, depending on the microflora of the oral cavity. The study revealed that in the group with an increased content of microorganisms, the distribution of genotype frequencies for the $-511T>C$ polymorphism of the *IL1 β* gene is statistically significantly different from the group with a normal content of microorganisms in saliva, while for the $-174G>C$ polymorphisms of the *IL6* gene, $-1082G>A$ of the *IL10* gene and $-197G>A$ of the *IL17A* gene showed no difference between the groups.

Keywords: Microflora of the oral cavity, cytokines, gene polymorphism.

Микрофлора полости рта – совокупность представителей различных таксономических групп микроорганизмов, вступающих в иммунологические, биохимические и другие взаимодействия с организмом человека и друг с другом. Видовой состав микробной флоры полости рта в норме довольно постоянен. Вместе с тем количество и разнообразие микробов может значительно колебаться, а появление представителей непостоянной микробной флоры приводит к патологическим процессам.

Патогенные виды микроорганизмов в ходе своей жизнедеятельности влияют на состояние полости рта человека, вызывая воспалительные процессы. В следствие чего человеческому организму необходимо контролировать состав и количество всех присутствующих в нем микроорганизмов. Одним из механизмов такого контроля является

работа цитокиновой системы – совокупности молекул, выполняющих роль посредников между различными клетками. Ведущим звеном в развитии воспалений при соматической патологии и заболеваниях органов и тканей полости рта являются нарушение цитокиновой регуляции. Это оказывает негативное воздействие на имеющиеся в полости рта микроорганизмы и приводит к развитию различных заболеваний [1]. Изучение цитокинового статуса принципиально важно для определения остроты и характера воспаления в ротовой полости [2].

На сегодняшний день к системе цитокинов относят примерно 200 полипептидных веществ. По современным представлениям, цитокины осуществляют связь между иммунной, эндокринной, кроветворной, нервной и другими системами и служат для их вовлечения в организацию и регуляцию защитных реакций организма. Цитокины воздействуют на клетку, связываясь со специфическими рецепторами на цитоплазматической мембране, вызывая этим каскад реакций, ведущий к индукции, усилению или подавлению активности ряда регулируемых ими генов, которые кодируют синтез провоспалительных цитокинов и других медиаторов воспаления [3].

Своя «цитокиновая среда» присутствует в ротовой полости в слюне. Ее составляют IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ и другие цитокины. Они в слюне оказываются после повреждения и последующего воспаления микроорганизмами слизистых оболочек полости рта, в эпителии которых и содержатся продуцирующие цитокины лимфоциты и макрофаги. Также, еще одним источником являются слюнные железы [4,5]. Цитокины в слюне являются уникальными биомаркерами различных тяжелых заболеваний, например, рака [6].

В то же время функционирование цитокиновой сети во многом зависит от ряда генетических особенностей человека. Изучение роли аллельных вариантов генов является одной из актуальных задач в исследовании патогенетических причин заболеваний и выявлений предрасположенности к ним в силу их влияния на уровень синтеза цитокинов, являющихся медиаторами воспаления.

В связи с этим, целью исследования было изучение частот генотипов генов цитокинов в слюне в зависимости от состояния микрофлоры полости рта.

В исследовании были изучены следующие интерлейкины:

Интерлейкин 1 бета (IL-1 β) – это провоспалительный цитокин, являющийся важным медиатором воспалительной реакции. Особое значение придается способности IL-1 β индуцировать синтез других провоспалительных цитокинов, низкомолекулярных медиаторов воспаления и других соединений, а также его участию в регуляции адаптивного иммунного ответа, опосредованного Th1- и Th17-клетками [7].

Интерлейкин 6 (IL-6) – цитокин, обладающий и про- и противовоспалительными свойствами, который функционирует при регуляции иммунных ответов, воспалении, кроветворных процессах и созревании В-клеток. Особое внимание уделяется способности IL-6 производить так называемое переключение лейкоцитов [8,9].

Интерлейкин 10 (IL-10) – противовоспалительный цитокин, который является ингибитором воспаления и цитокинового каскада. Он ингибирует синтез цитокинов Т-хелперов 1, хемокинов, адгезионных молекул [10].

Интерлейкин 17A (IL-17A) – провоспалительный цитокин, играющий основную роль в защите организма от внеклеточных бактериальных и грибковых инфекций. IL-17A участвует в процессах иммунного ответа, стимулируя синтез хемокинов, в следствие чего индуцирует перемещение нейтрофилов в зону воспаления [11].

В работе для исследования полиморфных вариантов генов интерлейкинов были взяты полиморфизмы расположенные в промоторных участках генов: $-511T>C$ гена *IL1 β* , $-174G>C$ гена *IL6*, $-1082G>A$ гена *IL10* и $-197G>A$ гена *IL17A*.

Материалом послужили образцы слюны, полученные от добровольцев в возрасте от 18 до 25 лет, без хронических заболеваний, без ран в ротовой полости, и не болевших воспалительными заболеваниями в течение двух предшествующих сдаче биоматериала недель. Сбор слюны проводили утром, до приёма пищи и чистки зубов. Количество образцов – 42.

При помощи набора реагентов «ДНК-сорб-АМ» (Россия) выделяли ДНК из образцов слюны. Исследование для определения концентрации ДНК энтеробактерий, стафилококков и стрептококков проводили при помощи набора реагентов АмплиСенс® Флороценоз / Аэробы-FL. Для исследования полиморфизмов в генах *IL1 β* , *IL6*, *IL10* и *IL17A* использовали наборы реагентов «SNP-экспресс-ЭФ» (Литех, Россия). Для разделения продуктов амплификации применяли метод горизонтального гель-электрофореза. Детекцию продуктов амплификации проводили на приборе трансиллюминатор Bio Rad Gel Doc XR.

Результаты мультиплексной ПЦР на выявление аэробных бактерий показали, что во всех образцах присутствует *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* и *Enterobacteriaceae spp.* При суммарном вычислении количественного содержания представителей трех исследуемых родов микроорганизмов для каждого образца было установлено, что значения варьируют от $3 \cdot 10^6$ Гэ/мл до $6 \cdot 10^{10}$ Гэ/мл. Для вычисления нормы содержания *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterobacteriaceae spp.* было взято суммарное значение нормы для каждого микроорганизма (Зеленова Е.Г. и др., 2004). Пороговое значение содержания данных микроорганизмов в норме составило $1,1 \cdot 10^8$ Гэ/мл. На основе этих данных мы разделили нашу выборку на две группы: содержание микроорганизмов «норма» (группа 1) и «выше нормы» (группа 2) (табл. 1).

Таблица 1 – Разделение образцов слюны на группы по суммарному числу микроорганизмов

Группа	Кол-во образцов	Среднее суммарное кол-во микроорганизмов, Гэ/мл
1 (норма)	8	$6,4 \cdot 10^7$
2 (выше нормы)	34	$4,8 \cdot 10^9$

Анализ на полиморфизм $-511T>C$ гена *IL1 β* показал, что в группе с нормальным числом микроорганизмов преобладающее количество образцов имеет генотип *CC*. В группе 2 (с повышенным содержанием микроорганизмов в ротовой полости) увеличена доля гетерозигот по полиморфизму $-511T>C$ гена *IL1 β* за счет снижения частоты двух видов гомозигот. Данные различия являются статистически значимыми (табл. 2). По литературным источникам у гомо- и гетерозигот по полиморфному аллелю уровень мРНК выше [12].

Таблица 2 – Частоты генотипов по полиморфизму $-511T>C$ гена *IL1 β* для 1 и 2 группы

Генотип	Группа 1	Группа 2	χ^2
	Частоты	Частоты	
<i>TT</i>	2 (25%)	1 (3,1%)	6,45 ($p < 0,05$)
<i>TC</i>	2 (25%)	21 (63,6%)	
<i>CC</i>	4 (50%)	11 (33,3%)	

Анализ на полиморфизм $-174G>C$ гена *IL6* и $-1082G>A$ гена *IL10* выявил преобладание гетерозиготных генотипов в обеих группах (рис. 1, 2). Частоты генотипов по двум данным SNP в сравниваемых группах лиц сходны.

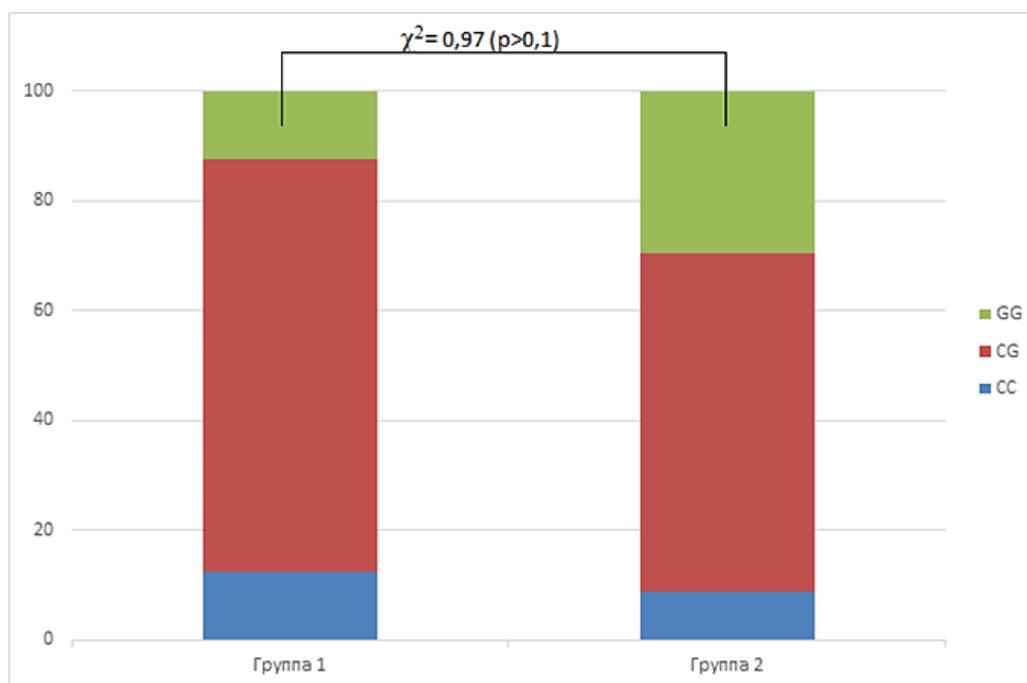


Рисунок 1 – Частоты генотипов по полиморфизму $-174G>C$ гена *IL6* для 1 и 2 группы.

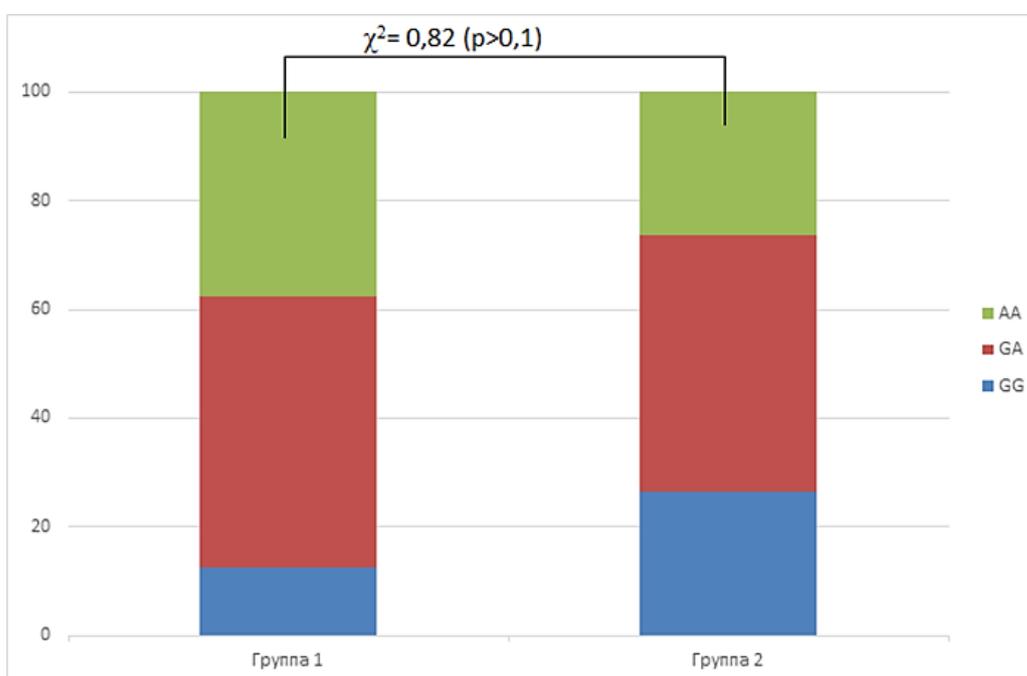


Рисунок 2 – Частоты генотипов по полиморфизму $-1082G>A$ гена *IL10* для 1 и 2 группы.

Анализ на полиморфизм $-197G>A$ гена *IL17A* показал, что большинство исследованных образцов имеют генотип GG, который превалирует в обеих группах (табл. 3). Стоит отметить, что в группе с повышенным содержанием микроорганизмов образцов с гетерозиготным генотипом меньше, чем с генотипом AA. Однако эти отличия статистически не значимы.

Таблица 3 – Частоты генотипов по полиморфизму $-197G>A$ гена *IL17A* для 1 и 2 группы

Генотип	Группа 1	Группа 2	χ^2
	Частоты	Частоты	
<i>GG</i>	4 (57,1%)	15 (57,7%)	0,43 (p>0,1)
<i>GA</i>	2 (28,6%)	5 (19,2%)	
<i>AA</i>	1 (14,3%)	6 (23,1%)	

Таким образом нами показано, что в группе с повышенным содержанием микроорганизмов распределение частот генотипов по полиморфизму $-511T>C$ гена *IL1 β* статистически значимо отличается от группы с нормальным содержанием микроорганизмов в слюне. Разницы в распределении частот генотипов по полиморфизмам $-174G>C$ гена *IL6*, $-1082G>A$ гена *IL10* и $-197G>A$ гена *IL17A* между группами не выявлено.

Библиографический список

- Исамулаева А. З. и др. Значимость цитокиновой регуляции в патогенезе заболеваний полости рта // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – №. 6. – С. 991-991.
- Орехова Л. Ю. Заболевания пародонта. -М.: Поли Медиа Пресс, 2004. – 432 с
- Кольман Я., Рем К. Г. Наглядная биохимия. – мир, 2000. – Т. 469. – С. 450-451.
- Kagami H., Hiramatsu Y., Hishida S., Okazaki Y., Horie K., Oda Y., Ueda M. Salivary growth factors in health and disease // Adv. Dent Res. – 2000 Dec – №14:99-102. – PMID: 11842932.
- Лобейко В.В., Иорданишвили А.К., Малышев М.Е. Возрастная характеристика иммунологических показателей слюны у взрослых людей. // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – №1.
- Нao Z., Pan Y., Shao W., Lin Q., Zhao X. Graphene-based fully integrated portable nanosensing system for on-line detection of cytokine biomarkers in saliva // Biosens Bioelectron. – 2019 Jun 1 – №134:16-23.
- Насонов Е.Л., Елисеев М.С. Роль интерлейкина 1 в развитии заболеваний человека. // Научно-практическая ревматология. – 2016. – №54(1):60-77.
- Тополянская С. В. Роль интерлейкина 6 при старении и возрастассоциированных заболеваниях. // Клиницист – 2020. – №14(3–4).
- Kany S., Vollrath J.T., Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease // Int J Mol Sci. – 2019 Nov 28 – №20 (23):6008. – PMID: 31795299.
- Asadullah K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy- review of new approach // Pharmacological reviews. – 2003. – Vol. 55, №2. – P. 241-269.
- Шилова Л.Н., Паньшина Н.Н., Чернов А.С., Трубенко Ю.А., Хортиева С.С., Морозова Т.А., Паньшин Н.Г., Паньшин Н.Г. Иммунопатологическое значение интерлейкина 17 при псориатическом артрите. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 6.
- Маев И.В., Кучерявый Ю.А., Оганесян Т.С. Аллельный полиморфизм интерлейкина-1 β при геликобактериозе. // РЖГГК. – 2008. – Т.18. – №5. – С.4-11.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АРГИНИН ДЕИМИНАЗЫ STREPTOCOCCUS PYOGENES M22 И АНАЛИЗ ЕЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ

Егидарова Е.Ю., Грудинина Н.А., Карасева А.Б., Суворов А.Н., Соколов А.В.

Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация: Получение эффективных противоопухолевых препаратов остается актуальной задачей. Учитывая возможность воздействия на рост опухолевых клеток ферментами, утилизирующими незаменимые или условно незаменимые аминокислоты, наше внимание привлекла аргинин деиминаза (ADI). В результате клонирования был получен штамм *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующий ген *arcA* *Streptococcus pyogenes* M22, были разработаны метод очистки и анализа ферментативной активности рекомбинантной ADI (rADI).

Ключевые слова: Аргинин деиминаза, *Streptococcus pyogenes*, рекомбинантный белок.

PURIFICATION OF RECOMBINANT ARGININE DEIMINASE OF STREPTOCOCCUS PYOGENES M22 AND ITS ENZYMATIC ACTIVITY ASSAY

Egidarova E.Yu., Grudinina N.A., Karaseva A.B., Suvorov A.N., Sokolov A.V.
FSBSI Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

Abstract. Obtaining effective antitumor drugs remains an relevant aim. Given the possibility of influencing tumor cell growth by enzymes utilizing essential or conditionally essential amino acids, arginine deiminase (ADI) attracted our attention. As a result of cloning, an *E. coli* strain BL21(DE3) expressing the *Streptococcus pyogenes arcA* gene M22 was obtained; a method for purification and analysis of the enzymatic activity of recombinant ADI (rADI) was developed.

Keywords: arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, recombinant protein

Аргининдеиминаза (ADI) является одним из трех ферментов, входящих в одноименную систему, которая широко распространена среди бактерий, встречается у архей и даже одноклеточных эукариот. ADI кодируется геном *arcA* и катализирует гидролиз L-аргинина (Arg) до цитруллина и аммония. В дальнейшем цитруллин превращается в орнитин и карбомиоилфосфат под действием орнитинкарбамоилтрансферазы, а карбомиоилфосфат, в свою очередь, расщепляется до карбоната и аммония с образованием 1 моль АТФ под действием карбаматкиназы. Путь ADI необходим для выживания микроорганизмов в дефицитной по углеводам и/или слабокислой среде, а также способствуют росту бактериальных биопленок, их устойчивости к антибиотикам и экспрессии некоторых генов патогенности [1,2,3]. Повышенный интерес к ADI обуславливается, во-первых, возможностью воздействия на выживание микроорганизмов с помощью ингибиторов ADI, а во-вторых, данными о подавлении роста аутокотрофных по аргинину опухолевых клеток рекомбинантной ADI (rADI). Нормальные клетки способны превращать цитруллин в Arg с помощью

аргининосукцинатсинтетазы и аргининосукцинатлиазы. Однако экспрессия этих ферментов подавляется в некоторых опухолевых клетках, что делает их ауксотрофными по Arg. Удаление Arg из среды, вследствие функционирования ADI, приводит к избирательной апоптотической гибели опухолевых клеток, не затрагивая нормальные. Согласно данным предыдущих исследований ADI, полученная из лизата клеток *Streptococcus pyogenes* M22, обладает значительным противоопухолевым потенциалом [4].

Целью нашего исследования являлась разработка системы экспрессии гена *argA* *Streptococcus pyogenes* M22 в клетках *E. coli* и биохимическая оценка свойств очищенного рекомбинантного фермента (rADI).

Для достижения цели кодирующая последовательность гена *argA* была вставлена в плазмиду *pet15/23*, представляющую собой комбинацию двух векторов *pet15b* и *pet23a(+)*. Клонирование осуществлялось по сайтам эндонуклеаз рестрикции *NdeI* и *XhoI*. В качестве матрицы для клонирования гена *argA* использовали ДНК штамма стрептококка M22 A1168 [5]. Плазмиду *pet15/23* и полученную ПЦР-копию гена *argA* обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *XhoI*. Очистку фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли при помощи набора фирмы Promega согласно инструкции производителя. Полученные таким образом фрагменты лигировали при помощи T4 ДНК-лигазы. После чего компетентные клетки штамма *E. coli* DH5(alpha) были трансформированы полученной лигазной смесью и высеяны на селективную среду, содержащую 100 мкг/мл ампициллина. Плазмидную ДНК, выделенную из полученных клонов методом щелочного лизиса, анализировали при помощи ПДРФ-анализа и секвенировали (3500 genetic analyzer, Applied Biosystems). Клетки экспрессионного штамма *E. coli* BL21(DE3), трансформированные плазмидной ДНК *pet15/23-argA*, выращивали при 37°C в условиях аэрации до достижения оптической плотности OD600 = 0,9-1. Синтез белка индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 250 мкМ и культивировали суспензию бактерий в течение ночи при 37°C в условиях аэрации.

Конечная последовательность полипептида rADI содержала метионин, полигистидиновую последовательность (His-tag) для очистки на Ni-хелатирующей-агарозе и сайт для последующего отщепления His-tag тромбином.

В клеточном лизате с помощью Вестерн-блоттинга с меченым пероксидазой зондом на His-tag была выявлена растворимая rADI, которая была способна к утилизации Arg. Анализ активности rADI проводили с помощью модифицированной реакции Сакагучи, позволяющей определять Arg в среде. Исследуемую пробу (50 мкл) смешивали с 50 мкл 2 мМ Arg либо натрий-фосфатного буфера (отрицательный контроль), инкубировали пробы на шейкере при температуре 37° С, через 5 и 30 минут отбирали из них по 20 мкл и добавляли 100 мкл 1 мМ 4-хлор-1-нафтола в 2 М NaOH и затем 200 мкл 2 мМ NaOBr в 2 М NaOH. Для получения градуировочной зависимости проводили реакцию со стандартами Arg: от 0,31 мМ до 2 мМ. По разности концентрации Arg в отрицательном контроле и смеси исследуемой пробы с 2 мМ Arg рассчитывали удельную активность ADI в мкмоль аргинина, утилизированного за 1 минуту на 1 мг общего белка. Было обнаружено, что при значениях pH выше 7 наблюдается частичная потеря способности rADI к гидролизу Arg, поэтому была изучена зависимость активности фермента от pH среды. Оказалось, что максимальная активность ADI характерна для pH 6,6. Было решено использовать 10 мМ натрий-фосфатный буфер для экстракции и для анализа активности rADI.

Помимо обнаруженной зависимости активности ADI от pH наблюдалась и частичная потеря способности rADI гидролизовать Arg после пилотной очистки и хранения замороженного фермента -20°C. Были изучены и подобраны условия для максимальной

сохранности активности ADI с помощью искусственного старения проб: ADI смешивали с потенциальными протекторами активности (ЭДТА, 2-меркаптоэтанол и NaCl), а затем подвергали пробы нескольким последовательным циклам замораживания/оттаивания. После каждого цикла отбиралась аликвота на анализ активности ADI по утилизации Arg. Было определено, что одновременное добавление к образцам NaCl до конечной концентрации 1 М и 2-меркаптоэтанола до конечной концентрации 0,5 мМ приводит к сохранению активности ADI в течение 2-3 циклов заморозки/оттаивания фермента.

Первоначально для очистки рекомбинантного фермента проводилась аффинная хроматография на смоле для металл-хелатной хроматографии (His-bind) с ионами Ni, которая связывает полигистидиновую последовательность на конце рекомбинантного белка. Для элюции с колонки связавшегося белка использовали ступенчатый градиент концентрации имидазола 5-40 мМ, рН 7,8. В элюирующий раствор добавляли 0,5 NaCl и 0,5 мМ 2-меркаптоэтанол. Для очистки полученных фракций от имидазола их диализовали против 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 6,6) при температуре +4°C в течение ночи. После этого проводилось измерение активности rADI во фракциях и SDS-электрофорез в денатурирующих условиях. По результатам определялась степень очистки rADI и необходимость повторной хроматографии. Оказалось, что после очистки rADI и последующего диализа белок практически полностью терял ферментативную активность. Результаты электрофореза также показали, что даже несколько повторных циклов хроматографии не обеспечивают чистоты получаемых фракций (Рис., А).

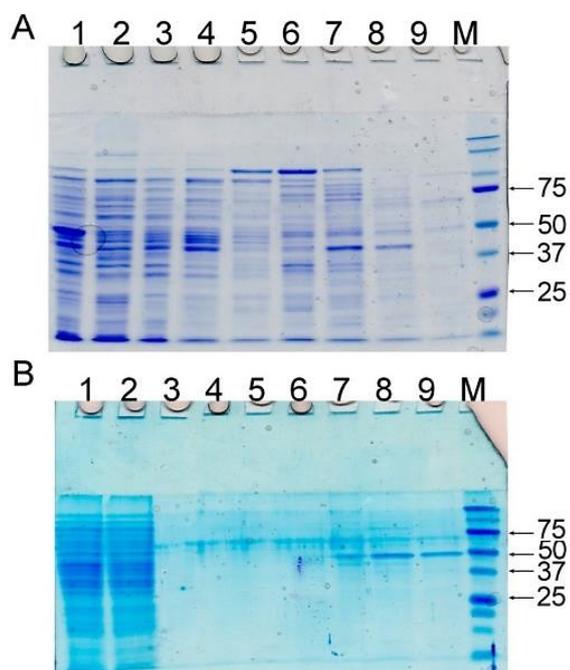


Рисунок – Результаты SDS-электрофореза после очистки rADI. (А) фракции, полученные при аффинной металл-хелатной хроматографии на смоле Ni-His-bind, и (В) фракции, полученные при аффинной металл-хелатной хроматографии на Ni-кальцеин-сефарозе: 1 – клеточный лизат до хроматографии, 2 – элюат балластных белков, 3-9 – фракции при элюции имидазолом, М – маркер (кДа).

Мы предположили, что потеря активности ADI обусловлена воздействием слабощелочной среды (рН 7,8), применяемой при очистке, однако, снижение рН до 6,6 показало отсутствие сорбции rADI на сорбенте His-bind. Таким образом, появилась необходимость создания более эффективного варианта сорбента для металл-хелатной

аффинной хроматографии. Для этой цели в качестве сорбента была использована сефароза 6В, к которой после активации бромцианом присоединяли лизин, а к его аминогруппе – активированный карбодиимидом кальцеин (флуорексон). Полученная кальцеин-сефароза обладала способностью связывать ионы никеля и взаимодействовать с His-tag рекомбинантного белка. После экстракции rADI 0,5 М NaCl, содержащим 0,5 мМ 2-мерктопэтанол и 10 мМ натрий-фосфатный буфер, рН 6,6, при хроматографии на колонке с Ni-кальцеин-сефарозой активный фермент задерживался на сорбенте и не обнаруживался в элюате, полученном при промывке колонки буфером, использованным для экстракции. Для элюции rADI связанной с Ni-кальцеин-сефарозой использовали ступенчатый градиент имидазола от 2 до 400 мМ, рН 6,6. Согласно результатам электрофоретического анализа фракций, после хроматографии была получена очищенная rADI с молекулярной массой около 45 кДа (Рис., В). Ферментативная активность составляла 11,4 мкмоль Arg за минуту на мг белка. В результате была получена очищенная и активная rADI. Для отщепления His-tag был использован тромбин, иммобилизованный на бромциан-активированной сефарозе. Согласно Вестерн-блоттингу после такой обработки происходило эффективное отщепление His-tag от rADI, полученный препарат не содержал следов активности тромбина, детектируемой с помощью специфического хромогенного субстрата.

В дальнейшем полученную rADI планируется очистить от эндотоксина и использовать для анализа ее противоопухолевой активности в отношении клеточных культур ауксотрофных по Arg. Учитывая, что ADI необходима для выживания бактерий в неблагоприятных условиях, являясь фактором патогенности микроорганизмов, планируется провести скрининг производных аргинина на способность ингибировать активность rADI. В случае выявления эффективных ингибиторов ADI будет изучено их влияние на рост и образование биопленок, как потенциальных средств для борьбы со стрептококковыми инфекциями.

Работа выполнена при поддержке НЦМУ – Лаборатория онколитических бактерий.

Библиографический список

1. Cusumano Z.T., Caparon M.G. Citrulline protects *Streptococcus pyogenes* from acid stress using the arginine deiminase pathway and the F1Fo-ATPase // *J Bacteriol.*–2015.–V.197.–№7.–P.1288-1296.
2. Freiberg J.A., Le Breton Y., Harro J.M., Allison D.L., McIver K.S., Shirtliff M.E. The Arginine Deiminase Pathway Impacts Antibiotic Tolerance during Biofilm-Mediated *Streptococcus pyogenes* Infections // *mBio.*–2020.–V.11.–№4.–e00919-20.
3. Hirose Y., Yamaguchi M., Sumitomo T., Nakata M., Hanada T., Okuzaki D., Motooka D., Mori Y., Kawasaki H., Coady A., Uchiyama S., Hiraoka M., Zurich R.H., Amagai M., Nizet V., Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface // *Cell Rep.*–2021.–V.34.–№13.–P.108924.
4. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22 // *Biochem Cell Biol.*–2016.–V.94.–№2.–129-137.
5. Burova L., Thern A., Pigarevsky P., Gladilina M., Seliverstova V., Gavrilova E., Nagornev V., Schalén C., Totolian A. Role of group A streptococcal IgG-binding proteins in triggering experimental glomerulonephritis in the rabbit // *APMIS.*–2003.–V.111.–№10.–P.955-962.

РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ УДОВЛЕТВОРЕНИЯ ПОТРЕБНОСТЕЙ В ПОЛНОЦЕННОМ ПИЩЕВОМ БЕЛКЕ

Еримбетов К.Т.¹, Обвинцева О.В.²

¹ *ООО Научно-исследовательский центр «Парк активных молекул» (НИЦ «ПАМ»),
Обнинск, Россия*

² *Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания
животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства –
ВИЖ им. Л.К. Эрнста», Боровск, Россия*

Аннотация. Анаболические и катаболические стимулы интегрируются посредством передачи сигналов в системах, контролирующих процессы синтеза и распада структурных белков скелетных мышц. В периоды интенсивного роста накопление мышечной массы стимулируется увеличением синтеза белка на уровне трансляции мРНК, а клеточный пул мРНК зависит от количества ядер. Поэтому интенсивный синтез белков у растущих животных обусловлен высоким темпом накопления ядер, а с возрастом этот процесс снижается, и количество ядер на единицу длины мышечного волокна выходит на уровень плато. Генетические факторы, гормоны, аминокислоты, фитоэкдистероиды, роданины, β -адренергические агонисты, томатыдин, урсоловая кислота влияют на метаболизм белка через сигнальные пути, изменяя эффективность мышечного роста. На протяжении всей жизни в скелетных мышцах функционируют несколько протеолитических систем, включая аутофагию, лизосомальную систему, убиквитин-протеасомный путь, кальций-зависимые кальпаины и семейство каспаз. Несколько сетей передачи сигналов направляют и координируют эти процессы, способствуя поддержанию белкового гомеостаза. Учёт этих факторов даёт определённые ориентиры для выработки рекомендаций по повышению эффективности конверсии корма и качества мясной продукции.

Ключевые слова: метаболизм мышечных белков, сигнальные пути, синтез и распад белков, факторы регуляции, скелетные мышцы.

SOLUTIONS TO THE PROBLEM OF SATISFACTION OF THE REQUIREMENTS FOR A COMPLETE DIETARY PROTEIN

Erimbetov K.T.¹, Obvintseva O.V.²

¹ *Scientific Research Technological Center «Preventive Information Medicine», Obninsk, Russia*

² *Russian Research Institute of Animal Physiology, Biochemistry, and Nutrition-Branch of the L.K.
Ernst Federal Research Centre for Animal Husbandry, Borovsk, Russia*

Abstract. Anabolic and catabolic stimuli are integrated through signaling in systems that control the synthesis and breakdown of skeletal muscle structural proteins. During periods of intense growth, the accumulation of muscle mass is stimulated by an increase in protein synthesis at the level of mRNA translation, and the cellular pool of mRNA depends on the number of nuclei. Therefore, intensive

protein synthesis in growing animals is due to the high rate of accumulation of nuclei, and with age this process decreases, and the number of nuclei per unit length of the muscle fiber reaches a plateau. Genetic factors, hormones, amino acids, phytoecdysteroids, rhodanines, β -adrenergic agonists, tomatidine, ursolic acid affect protein metabolism through signaling pathways, changing the efficiency of muscle growth. Throughout life, several proteolytic systems function in skeletal muscle, including autophagy, the lysosomal system, the ubiquitin-proteasome pathway, calcium-dependent calpains, and the caspase family. Several signaling networks guide and coordinate these processes, helping to maintain protein homeostasis. Accounting for these factors provides certain guidelines for developing recommendations for improving the efficiency of feed conversion and the quality of meat products.

Keywords: muscle protein metabolism, signaling pathways, protein synthesis and degradation, regulatory factors, skeletal muscles.

Введение. Рост численности населения во всем мире увеличил глобальный спрос на адекватное белковое питание [1]. Для решения проблемы удовлетворения мировых потребностей в полноценном пищевом белке необходимы новые стратегии для увеличения производства белка животных при минимизации негативного воздействия объектов отрасли на окружающую среду. В целом, усилия по повышению объёмов производства мясных продуктов наталкиваются на трудности, связанные с биологическими ограничениями и с проблемами загрязнения окружающей среды. По этим причинам исследования, нацеленные на выяснение основных путей воздействия на процессы метаболизма мышечного белка, имеют непосредственное отношение к обеспечению полноценного белкового питания [2, 3, 4]. Несмотря на определённые успехи, достигнутые в области биологии развития, в том числе в исследованиях синтеза и обновления белков в организме животных, многие механизмы, регулирующие эти процессы в организме продуктивных животных, изучены недостаточно.

Цель работы – изучение факторов регуляции, вовлечённых в координацию процессов синтеза и обновления белков в скелетно-мышечных тканях.

Материалы и методы. Проведены исследования *in vitro* на биопсийном материале мышечной ткани и *in vivo* на разных видах животных. Эксперименты проведены с применением стабильных изотопов ^{15}N – аминокислот и радиоактивных меток ^{14}C -лейцин и ^{14}C -ацетата. Измерение содержания ^{15}N (в атомных процентах) – на изотопном масс-спектрометре. Удельную радиоактивность тотальных белков – на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Препаративное выделение фракции азота – на приборе Къельтек по методу Къельдаля. Концентрацию 3-метилгистидина в моче – методом ионообменной хроматографии на аминокислотном анализаторе. В ходе проведения экспериментов были разработаны модели оценки метаболизма белков *in vivo* [5].

Результаты. В настоящее время значительный интерес вызывают вопросы закономерности роста и развития животных и факторы, определяющие метаболизма белков в их организме. Поскольку содержание в тканях белков определяется скоростью синтеза и распада, то оба эти процесса регулируют их обмен. Ключевой точкой интеграции в росте и развитии мышц является протеинкиназа B / Akt киназа (RAC-альфа серин/треониновая протеинкиназа (продукт гена akt1)). Путь инсулин / IGF-I-Akt увеличивает синтез белков в скелетных мышцах посредством ингибирования гликогенсинтазинкиназы 3β (ингибитора образования тройного комплекса eIF2) и активации механистической мишени передачи сигналов комплекса рапамицина 1 (mTORC1). Активация mTORC1 стимулирует биосинтез

белка за счёт фосфорилирования ключевых регуляторов трансляции mPDK. mTORC1 фосфорилирует ингибирующий белок EIF4EBP1, который в результате высвобождается и разблокирует фактор инициации трансляции 4E (eIF4E). Кроме этого, активированный mTORC1 фосфорилирует и активирует p70 киназу рибосомального белка S6 (S6K1), что также стимулирует синтез белка. Akt протеинкиназа В / Akt киназа также снижает деградацию белков посредством фосфорилирования факторов транскрипции Forkhead box class O (FOXO). Белки подсемейства FOXO эволюционно консервативные транскрипционные факторы, определяющие клеточный метаболизм и гомеостаз [5].

Исследования на растущих животных по интенсивности роста мышц и динамике метаболизма мышечных белков в период с 4- до 14-месячного возраста показали, что увеличение скорости их обновления имеет место только в первые месяцы жизни, поскольку на последующих этапах онтогенеза эффективность синтеза белков значительно снижается (с $30,5 \pm 2,0$ до $18,8 \pm 1,9$ %). Интенсивность синтеза и отложения белков в скелетных мышцах в молодом возрасте значительно выше, чем скорость распада белков. В раннем возрасте процессы синтеза преобладают над процессами распада, разница между ними более заметна, она и составляет долю отложения белков. Далее эта разница сокращается, и у взрослого животного, процессы синтеза и распада приходят в равновесие. Например, в *in vitro* исследованиях у животных с 4- до 14-месячного возраста интенсивность включения 14C-лейцина в белки мышц, имп/мин/ г ткани снизилась, соответственно, с 5613 ± 561 до 3315 ± 40 . Аналогичное возрастное снижение отмечено в *in vivo* исследованиях. Например, скорость синтеза белков скелетных мышц за аналогичный период снизилась с $18,45 \pm 0,41$ до $13,57 \pm 0,25$ г / сутки на кг общей массы мышц $0,75$.

Следовательно, что в более зрелом возрасте животных их высокий продуктивный потенциал целесообразно поддерживать путем использования способов и средств, направленных на снижение скорости распада мышечных белков, поскольку известно, что по мере роста животных, «белоксинтезирующие системы» мышц менее чувствительны к изменениям условий питания и внешней среды по сравнению с «белокдеградирующими системами».

Закключение. Поддержание баланса между синтезом и распадом белков в скелетных мышцах является необходимым условием для нормального роста и здоровья животных. Анаболические и катаболические стимулы интегрируются посредством передачи сигналов в системах, контролирующими процессы синтеза и распада структурных белков скелетных мышц. Генетические факторы, гормоны, аминокислоты, фитоэкдистероиды, роданины, β -адренергические агонисты, томатыдин, урсоловая кислота влияют на метаболизм белка через сигнальные пути, изменяя эффективность роста мышц. В области биологии продуктивных животных исследовательские усилия должны быть направлены на понимание механизмов отложения белка в тканях.

Для конститутивных белков, включая мышечные белки, чистое отложение в ткани отражает баланс между синтезом и распадом, поэтому изменения в одном или в обоих составляющих процессах могут увеличить (или уменьшить) скорость роста. Анаболический ответ в периферических тканях многочисленными факторами регуляции, влияющими на соотношение между синтезом белка и его распадом. Учёт этих факторов даёт определённые ориентиры для выработки рекомендаций по повышению эффективности конверсии корма и повышения качества мясной продукции.

Библиографический список

1. WHO. Availability and changes in consumption of animal products. Nutrition health topics: Global and regional food consumption patterns and trends. 2018 http://www.who.int/nutrition/topics/3_foodconsumption/en/index4.html.
2. Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В., Соловьева А.Г., Федорова А.В., Земляной Р.А. Сигнальные пути и факторы регуляции синтеза и распада белков в скелетных мышцах (обзор) // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2020. – № 1. – С.24-33. DOI: 10.25687/1996-6733.prodanimbiol.2020.1.24-33.
3. Anthony T.G. Mechanisms of protein balance in skeletal muscle // Domest. Anim. Endocrinol. – 2016. – V. 56. – P. 23-32. 10.1016/j.domaniend.2016.02.012.
4. Zuo J, Xu M, Abdullahi Y.A, Ma L, Zhang Z, Feng D. Constant heat stress reduces skeletal muscle protein deposition in broilers // J. Sci. Food Agric. – 2015. – V. 95. – P. 429-436.
5. Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В. Исследование метаболизма белков мышц *in vitro* и *in vivo* // В сборнике ЯДЕРНО-ФИЗИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И ТЕХНОЛОГИИ В СЕЛЬСКОМ ХОЗЯЙСТВЕ (к 50-летию со дня образования ФГБНУ ВНИИ радиологии и агроэкологии): сборник докладов международной научно-практической конференции, Обнинск. – 2020. – С. 63-67.

КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Ермаков Е.А.^{1,2}, Меламуд М.М.¹, Балахонова Е.А.¹, Степанов Г.А.¹, Невинский Г.А.^{1,2},
Бунева В.Н.^{1,2}

¹*Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск*
²*Новосибирский государственный университет, Новосибирск*

Аннотация. В данной работе проанализирована концентрация внеклеточной ДНК (вкДНК) в плазме пациентов с шизофренией и здоровых добровольцев. На предварительном этапе с использованием метода флуориметрической детекции и ПЦР обнаружена тенденция к увеличению уровня вкДНК у пациентов в 1,4 раза по сравнению со здоровыми донорами ($P = 0,06$). Проведенный метаанализ литературных данных на выборке из 946 пациентов и 541 здорового донора подтвердил данные о более высоком уровне вкДНК ($P < 0,00001$) при шизофрении.

Ключевые слова: шизофрения, внеклеточная ДНК, метаанализ.

THE CONCENTRATION OF CIRCULATING CELL-FREE DNA IN SCHIZOPHRENIA

Ermakov E.A.^{1,2}, Melamud M.M.¹, Balakhonova E.A.¹, Stepanov G.A.¹, Nevinsky G.A.^{1,2},
Buneva V.N.^{1,2}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk*
²*Novosibirsk State University, Novosibirsk*

Abstract. In this work, the concentration of cell-free DNA (cfDNA) in the plasma of patients with schizophrenia and healthy volunteers was analyzed. At the preliminary stage, a trend towards an increase in the level of cfDNA in patients by 1.4 times compared with healthy donors ($P = 0.06$) was detected using fluorimetric detection and PCR. A subsequent meta-analysis of the literature data on a sample of 946 patients and 541 healthy donors confirmed the data on a higher level of cfDNA ($P < 0.00001$) in schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, cell-free DNA, meta-analysis.

Внеклеточная ДНК (вкДНК) – это фрагменты нуклеиновых кислот, которые высвобождаются в результате гибели клеток в кровотоке [1]. Увеличение концентрации, циркулирующей вкДНК в биологических жидкостях наблюдается при физиологических или патологических состояниях и может использоваться для диагностических целей [2]. Однако данные об уровне вкДНК у пациентов с шизофренией противоречивы. Поэтому цель данной работы заключалась в анализе концентрации вкДНК в плазме крови больных шизофренией по сравнению со здоровыми донорами.

На предварительном этапе проведен анализ 40 отобранных образцов плазмы, разделенных на две группы, сопоставимых по полу и возрасту: группу здоровых доноров (20 человек) и группу больных шизофренией (20 человек). Во вторую группу входили пациенты с диагнозом параноидная и простая шизофрения (F20.0 и F20.6). Средний возраст пациентов с шизофренией составил 38 лет, а здоровых доноров – 36 лет, и статистически значимо не отличался в исследуемых группах. Для выделения вкДНК из плазмы использовали набор D-blood-50 компании ООО «Биолабмикс» (Новосибирск, Россия). Во всех случаях для выделения использовался одинаковый объем плазмы (200 мкл). Концентрацию выделенной вкДНК определяли методом флуориметрической детекции с использованием набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay Kit на флуориметре Qubit 4 (ThermoFisher Scientific, Германия), а также методом ПЦР с “горячим” стартом в режиме реального времени с использованием флуоресцентно-меченых зондов. В качестве референсного гена использовали ген рибонуклеазы Р человека (RP). Для проведения ПЦР использовали набор реагентов БиоМастер HS-qPCR (2×) (ООО «Биолабмикс»). Амплификацию проводили с использованием автоматического анализатора Light Cycler 96 (Roche Life Science, Мюнхен, Германия). Программа включала 45 циклов амплификации. Статистическая обработка полученных результатов проводилась в программе STATISTICA 10.

Результаты анализа уровня вкДНК флуориметрическим методом представлены на Рис. 1. Концентрация вкДНК в плазме крови больных шизофренией составила (медиана [Q1; Q3]): 263,1 [142,7; 360,9] нг/мл. В случае здоровых доноров медианная концентрация вкДНК составила: 184,0 [121,1; 230,3] нг/мл. Несмотря на то, что уровень вкДНК в группе больных шизофренией был в 1,4 раза выше, чем в контрольной группе, отличия оказались статистически не значимыми (критерий Манна-Уитни, $p=0.06$). Анализ методом ПЦР показал аналогичные результаты. Кроме того, корреляционный анализ позволил выявить положительную корреляцию ($r = 0,576$, $P < 0.05$) уровня вкДНК с баллами по шкале PANSS негативных симптомов. Таким образом, обнаружена тенденция к увеличению уровня вкДНК в плазме крови больных шизофренией, по сравнению со здоровыми донорами. Малый размер выборки не позволил выявить статистически значимые отличия. Поэтому на втором этапе исследования впервые проведен литературный поиск и метаанализ литературных данных уровня вкДНК при шизофрении.

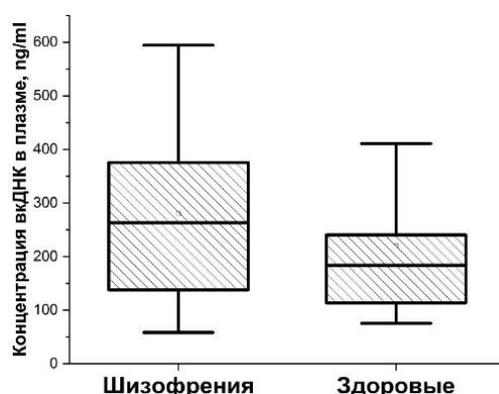


Рисунок 1 – Концентрация вкДНК в плазме крови больных шизофренией и здоровых доноров, определенная методом флуориметрической детекции.

Метаанализ проведен в соответствии с международными рекомендациями PRISMA 2020 [3]. Поиск подходящих статей осуществлялся в базах данных PubMed/MEDLINE, Google

Scholar, Scopus, PsycINFO и Web of Science, а также в поисковой системе Google. Статистическую обработку результатов метаанализа проводили с помощью программ Review Manager 5.4.1, MedCalc и OriginPro 2021. Модель случайного эффекта использовалась для оценки размеров эффекта. В связи с тем, что в работах концентрацию вкДНК измеряли в разных единицах измерения (нг/мл, нМ, копий/мкл, GE/мл), оценку эффекта проводили с использованием стандартизированной разности средних (Standardized Mean Difference, SMD). Степень неоднородности оценивали с помощью статистического теста I^2 . Значения I^2 0–25%, 26–50%, 51–75% и 75–100% классифицировали как отсутствующую, низкую, умеренную и существенную неоднородность соответственно. Уровень систематической ошибки оценивали с помощью критерия Эггера, критерия Бегга и воронкообразных графиков.

Проведенный метаанализ объединил данные восьми исследований с участием 946 пациентов и 541 здорового донора [4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Результаты метаанализа представлены на Рис. 1А. Показано, что концентрация циркулирующей вкДНК при шизофрении достоверно выше, чем у здоровых доноров. SMD для общего эффекта составил 0,56 (95% ДИ = [0,36–0,75]) с умеренной неоднородностью ($\text{Chi}^2 = 19,32$, $\text{df} = 7$ ($P < 0,007$); $I^2 = 64,8\%$, 95% ДИ = [24,91–83,5]). Тест на общий эффект также подтвердил значимость различий ($Z = 5,58$; $P < 0,00001$). При использовании критерия Эггера ($P = 0,2446$), критерия Бегга ($P = 0,0833$) и воронкообразного графика (Рис. 2Б) не наблюдалось никаких доказательств предвзятости включенных исследований. Таким образом, метаанализ подтвердил полученные данные об увеличении концентрации циркулирующей вкДНК при шизофрении.

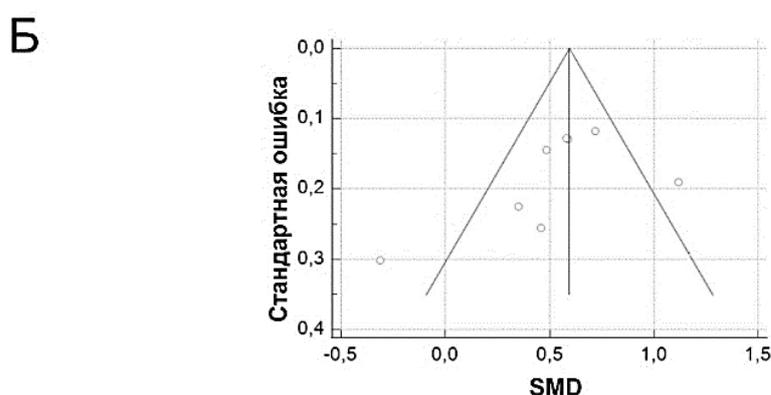
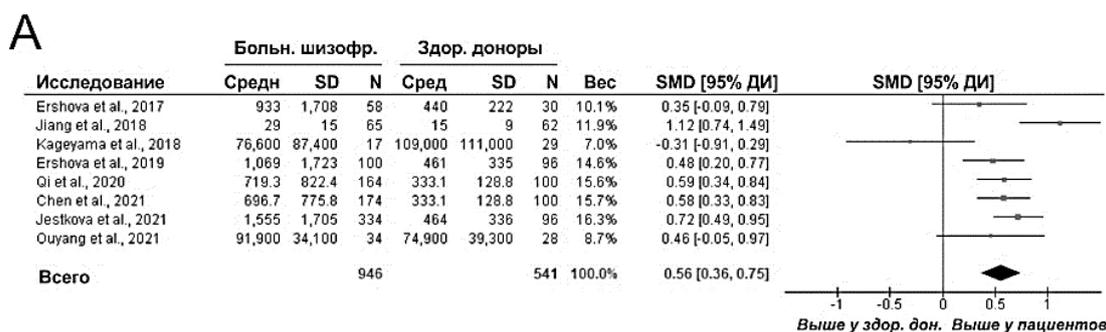


Рисунок 2 – Мета-анализ литературных данных о концентрации циркулирующей вкДНК при шизофрении. А – лесовидный график, суммирующий результаты метаанализа. Б – воронкообразный график, отражающий уровень систематической ошибки метааналитических данных. Сокращения: Средн – среднее значение, SD – стандартное отклонение, N – число пациентов, SMD – стандартизированная разность средних, ДИ – доверительный интервал.

Проведенная работа позволила получить надежные данные о более высокой концентрации вкДНК при шизофрении по сравнению со здоровыми донорами. Высокие уровни вкДНК при шизофрении могут быть связаны с усиленной гибелью клеток и/или с

неэффективностью клиренса циркулирующей вкДНК. Следовательно, идентификация клеточных источников вкДНК в крови больных шизофренией является важным направлением дальнейших исследований. Кроме того, имеются данные, что вкДНК больных шизофренией стимулирует экспрессию генов *TLR9* и *STING*, которые активируют воспалительный ответ [12]. Поэтому можно предположить, что повышенный уровень вкДНК может быть связан с хроническим провоспалительным состоянием при шизофрении.

Работа поддержана грантом РФФ № 21-75-00102.

Библиографический список

1. The diverse origins of circulating cell-free DNA in the human body: a critical re-evaluation of the literature / J. Aucamp [et al.] // *Biological Reviews*. 2018. V. 93. № 3. P. 1649-1683.
2. Epigenetics, fragmentomics, and topology of cell-free DNA in liquid biopsies / Y. M. D. Lo [et al.] // *Science*. 2021. V. 372. № 6538. P. eaaw3616.
3. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews / M. J. Page [et al.] // *Systematic reviews*. 2021. V. 10. № 1. P. 1-11.
4. The value of serum cell-free dna levels in patients with schizophrenia / L. Chen [et al.] // *Frontiers in psychiatry*. 2021. V. 12. P. 637789.
5. Reduced Cell-Free Mitochondrial DNA Levels Were Induced by Antipsychotics Treatment in First-Episode Patients with Schizophrenia / H. Ouyang [et al.] // *Frontiers in Psychiatry*. 2021. V. 12. P. 1084.
6. Analytical Value of Cell-Free DNA Based on Alu in Psychiatric Disorders / J. Qi [et al.] // *Frontiers in Psychiatry*. 2020. V. 10. P. 992.
7. Accumulation of circulating cell-free CpG-enriched ribosomal DNA fragments on the background of high endonuclease activity of blood plasma in schizophrenic patients / E. S. Ershova [et al.] // *International journal of genomics*. 2019. V. 2019. P. 8390585.
8. Analysis of the concentrations and size distributions of cell-free DNA in schizophrenia using fluorescence correlation spectroscopy / J. Jiang [et al.] // *Translational psychiatry*. 2018. V. 8. №. 1. P. 1-8.
9. The relationship between circulating mitochondrial DNA and inflammatory cytokines in patients with major depression / Y. Kageyama et al. // *Journal of affective disorders*. 2018. V. 233. P. 15-20.
10. Quantification of cell-free DNA in blood plasma and DNA damage degree in lymphocytes to evaluate dysregulation of apoptosis in schizophrenia patients / E. S. Ershova [et al.] // *Journal of Psychiatric Research*. 2017. V. 87. P. 15-22.
11. Концентрация циркулирующей внеклеточной ДНК в плазме периферической крови больных с острыми психозами эндогенной и экзогенной этиологии / Е. М. Жесткова [и др.] // *Психиатрия*. 2021. Т. 19. №. 3. С. 6-14.
12. In Vitro Analysis of Biological Activity of Circulating Cell-Free DNA Isolated from Blood Plasma of Schizophrenic Patients and Healthy Controls / E. S. Ershova [et al.] // *Genes*. 2022. V. 13. №. 3. P. 551.

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В И С, ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ В «ЦЕНТРАЛИЗОВАННОЙ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ»

Жуланова Л.К.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Проведён анализ наличия вирусов гепатитов В и С у пациентов 4 медицинских организаций, расположенных в Пермском крае, при помощи метода ПЦР для определения наличия вирусных ДНК и РНК в крови. Всего было выполнено 47 тестов. Гепатит С установлен в 61,11% проведенных тестов на определение данного заболевания, а гепатит В – в 36,36%. Полученные результаты важны для характеристики инфекционных заболеваний в Пермском крае, возбудителями которых являются вирусы гепатитов В и С.

Ключевые слова: вирус гепатита В, С, заболеваемость.

THE MORBIDITY OF VIRAL HEPATITIS B AND C, DETERMINED IN THE «CENTRALIZED CLINICAL DIAGNOSTIC LABORATORY»

Julanova L. K.

Perm State University, Perm, Russia

Abstract. The analysis of the presence of hepatitis B and C viruses in patients of 4 medical organizations located in the Perm Krai was carried out using the PCR method to determine the presence of viral DNA and RNA in the blood. 47 tests were performed. Hepatitis C was found in 61.11% of the tests performed to determine this disease, and hepatitis B – in 36.36%. The results obtained are important for the description of infectious diseases in the Perm Krai, the causes of which are hepatitis B and C viruses.

Keywords: hepatitis B, C virus, morbidity.

Введение. По оценкам ВОЗ в мире насчитывается примерно 325 миллионов человек, которые болеют гепатитом В и/или С, при этом каждый год выявляются около 1,5 миллиона новых случаев заражения, поэтому вирусные гепатиты до сих пор являются актуальной проблемой здравоохранения всех стран [1]. В Российской Федерации пик заболеваемости различными формами гепатитов В и С пришёлся на конец 90-х гг. XX в. и начало 2000-х XXI в., но за последнее десятилетие прослеживается тенденция к снижению (табл.) числа заболевших [2]. Однако вирусные гепатиты уже более двух лет входят в тройку значимых причин смерти от инфекционных и паразитарных заболеваний, и на момент 2020 г. на них приходилось 7,1% случаев смерти среди инфекционных заболеваний, что уступает только ВИЧ-инфекции и туберкулёзу [3].

Под вирусными гепатитами подразумевают группу самых частых заболеваний печени, причиной которых являются вирусы. Среди всех известных вирусных гепатитов на данный момент первое место по опасности и распространённости занимают вирусные гепатиты В и С,

так как предрасполагают к наиболее частому развитию осложнений в виде цирроза или рака печени, приводящих в некоторой доле случаев к летальному исходу [4].

Целью нашего исследования является определение встречаемости вирусов гепатитов В и С в Пермском крае.

Материалы и методы. Материалами исследования служили пробы плазмы крови, взятые в период с 3 июня 2022 года по 1 июля 2022 года у 43 пациентов из 4 медицинских учреждений: Осинская ЦРБ (г.Пермь), Кишертская Центральная Районная Больница ГБУЗ ПК, Камышловская ЦРБ ГАУЗ СО и Республиканский клинический противотуберкулёзный диспансер ГБУЗ РБ. Пробы были взяты у пациентов как мужского, так и женского пола (21 и 22 пациента соответственно), возраст которых варьировался от 9 до 83 лет (средний возраст пациентов составил $47,4 \pm 16,77$ лет).

Пробы были проанализированы при помощи метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием оборудования и реактивов компаний «ДНК-Технология» и «ApliSens» на базе «Централизованной клинико-диагностической лаборатории» (ЦКДЛ). Выделение вирусных ДНК (для определения вируса гепатита В) и РНК (для определения вируса гепатита С) проводилось в соответствии с методикой при помощи набора реагентов «РИБО-преп» предоставленных компанией «ApliSens» [5]. В дальнейшем пробы с выделенными нуклеиновыми кислотами проходили через качественный и количественный анализы на наличие вирусов гепатитов В и С согласно соответствующим методикам компании «ДНК-Технология». Амплификацию проводили на детектирующем амплификаторе ДТпрайм («НПО ДНК-Технология», Россия) придерживаясь программы для каждого анализа, которую рекомендует производитель [6,7,8,9].

Результаты и обсуждение. Из всех проведённых тестов 11 были на обнаружение вируса гепатита В (23,4%), 36 тестов – на обнаружение вируса гепатита С (76,6%), что уже говорит о большей востребованности анализов на обнаружение нуклеиновой кислоты именно вируса гепатита С (у 3 пациентов проводились исследования как на наличие вируса гепатита В, так и вируса гепатита С).

Вирус гепатита В. Вирусная природа возбудителя гепатита В была доказана ещё в 60-х годах XX в. Сам же вирус гепатита В передаётся через кровь (при переливании, использовании одного шприца несколько раз, хирургическом вмешательстве при помощи нестерильных инструментов) и слюну (при поцелуе), при половом контакте и от матери к ребёнку. Из-за длительного инкубационного периода, который может длиться от 2 до 6 месяцев большинство носителей может не догадываться о заражении, так как инфекция чаще всего проходит бессимптомно, особенно у детей. Инфекция у взрослых протекает в виде воспаления печени, болей в животе и желтухи.

Согласно международной классификации вирус гепатита В относится к семейству гепаднавирусов. В электронном микроскопе представлен в виде близкую к сферической форме частицу размером примерно 42 нм. Генетический материал вируса уложен в виде линейной частично двуцепочечной молекулой ДНК, длина которой составляет примерно 3200 нуклеотидов. Инфекция, вызываемая вирусом гепатита В, диагностируется либо по обнаружению HBs-антигена, который является основным компонентом вируса, при помощи иммуноферментного анализа, либо по наличию вирусной ДНК, используя методы ПЦР, в крови больного [10].

Таблица – Динамика заболеваемости населения РФ вирусными гепатитами В и С

Год	Заболеваемость вирусным гепатитом В на 100 тыс. населения		Заболеваемость вирусным гепатитом С на 100 тыс. населения	
	Острый гепатит	Хронический гепатит	Острый гепатит	Хронический гепатит
1997	36,6	-	9,1	4,4
1998	39,5	-	11,6	8,7
1999	43,77	8,95	20,9	12,9
2000	42,48	14,18	21,1	21,1
2001	35,34	16,03	16,7	29,5
2002	19,75	14,96	7,1	30,7
2003	13,02	14,94	5,2	33,1
2004	10,36	15,55	4,8	34,0
2005	8,6	13,93	4,5	31,8
2006	7,03	14,01	4,1	35,8
2007	5,28	14	3,6	37,1
2008	4,04	14,19	2,8	39,1
2009	2,7	14,39	2,2	40,9
2010	2,22	13,27	2,1	40,2
2011	1,71	12,95	1,8	39,9
2012	1,42	12,63	1,5	39,1
2013	1,33	11,69	1,5	39,2
2014	1,32	11,11	1,6	40,4
2015	1,12	10,78	1,4	38,0
2016	0,95	10,21	1,2	36,4
2017	0,88	9,76	1,2	35,3

Из всех тестов на обнаружения вирусной ДНК гепатита В 4 были с «положительным» результатом (36,36%). Больше всего тестов на вирус гепатита В было сделано по заказу Осинской ЦРБ (г.Пермь) – 8 тестов, и Кишертской Центральной Районой Больницы ГБУЗ ПК – 3 теста. Остальные два учреждения не заказывали данные исследования для своих пациентов. Из 8 результатов, полученных по заказу от Осинской ЦРБ (г.Пермь), 1 был «положительным» (12,5%). Все 3 результата пациентов из Кишертской Центральной Районой Больницы ГБУЗ ПК показали наличие вирусной нуклеиновой кислоты в их крови, что составляет 100%.

Вирус гепатита С. В отличие от вируса гепатита В обнаружение вируса гепатита С пришло только на 80-е годы прошлого столетия. Пути передачи вируса от человека к человеку аналогичны вирусу гепатита В. Инкубационный период же намного короче и составляет 6-8 недель, при этом половина случаев заражения проходит без наличия симптомов. Инфекция протекает также, как и при заражении вирусом гепатита В, в виде воспаления печени, которое может перейти в цирроз или даже рак печени при синхронизации инфекции. Вирус гепатита С относится к семейству флавивирусов и в крови представляет собой вирусные частицы размером от 38 до 50 нм. Генетический материал состоит из одноцепочечной молекулы РНК длиной около 9400 нуклеотидов. Диагностика инфекции проводится на базе определения антитела, относящегося к классу IgG, к белкам вируса при помощи иммуноферментного анализа или определения в крови больного вирусной РНК методом ПЦР [10].

Исследования на наличие вирусной нуклеиновой кислоты были заказаны всеми 4 медицинскими организациями: Осинской ЦРБ (г.Пермь) – 18 тестов, Кишертской

Центральной Районой Больницы ГБУЗ ПК – 8 тестов, Камышловской ЦРБ ГАУЗ СО – 9 тестов, Республиканским клиническим противотуберкулёзным диспансером ГБУЗ РБ – 1 тест. Из всех тестов 22 (61,11%) выявили наличие в крови пациентов вирусной РНК: Осинская ЦРБ (г.Пермь) – 12 тестов из 18 (66,67%), Кишертская Центральная Районая Больница ГБУЗ ПК – 5 тестов из 8 (62,50%), Камышловская ЦРБ ГАУЗ СО – 5 тестов из 9 (55,56%), Республиканский клинический противотуберкулёзный диспансер ГБУЗ РБ – 0 тестов (0%).

Заключение. Таким образом, исследовав пробы крови 43 пациентов из 4 медицинских организаций на наличие нуклеиновых кислот вирусов гепатита В и гепатита С при помощи метода ПЦР, была выявлена заболеваемость инфекциями, возбудителями которых являются вирусы гепатитов В и С. Из всех выполненных тестов на долю заказов по определению вирусной РНК гепатита С пришлось 76,6%, по определению вирусной ДНК гепатита В – 23,4% заказов. Из 36 тестов на определение наличия вируса гепатита С 22 теста (61,11%) дали «положительный» результат. При определении вируса гепатита В в крови пациентов из 11 тестов только 4 (36,36%) установили наличие вирусной ДНК. Исходя из полученных результатов, можно увидеть, что большим спросом у медицинских учреждений Пермского края пользуются заказы на определения РНК вируса гепатита С в крови, что также подтверждается большим процентом «положительных» результатов на выявление данного вируса. Полученные результаты важны, во-первых, для характеристики инфекционных заболеваний в Пермском крае, возбудителями которых являются вирусы гепатитов В и С; во-вторых, для дальнейшего мониторинга заболевания при дальнейших исследованиях в подобных направлениях.

Библиографический список

1. Гепатит [Электронный ресурс] // Всемирная организация здравоохранения. URL: https://www.who.int/ru/health-topics/hepatitis#tab=tab_1. (дата обращения: 04.10.2022).
2. Вирусные гепатиты в Российской Федерации: аналитический обзор / Е.В. Эсауленко, Л.В. Лялина, А.В. Семенов [и др.]; под ред. В.И. Покровского, А.А. Тотоляна. СПб.: ФБУН НИИЭМ имени Пастера, 2018. 112 с.
3. Михайлова Ю.В., Стерликов С.А., Громов А.В. Смертность от вирусных гепатитов в Российской Федерации (аналитический обзор) // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. 2022. № 1. С. 414-437.
4. Лысанов Ю.И., Шаманова Л.В. Вирусные гепатиты: распространённость и динамика заболеваемости // Сибирский медицинский журнал. 2011. № 4. С. 110-113.
5. Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп». Утв. 30.04.2021. 10 с.
6. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ВГБ-ГЕН. Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03507 от 25.07.2016. 2018. № 136-16. 48 с.
7. Инструкция по применению набора реагентов для количественного определения ДНК вируса гепатита В (HBV) методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) ГЕПАТОГЕН-Б количественный. Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03506 от 24.05.2010. № 131-14. 2018. 48 с.
8. Инструкция по применению набора реагентов для выявления РНК вируса гепатита С (HCV) методом обратной транскрипции (ОТ) и полимеразной цепной реакции ОТ-

ГЕПАТОГЕН-С. Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03892 от 15.11.2016. № 137-15. 2018. 52 с.

9. Инструкция по применению набора реагентов для количественного определения РНК вируса гепатита С (НСV) методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) ОТ-ГЕПАТОГЕН-С количественный. Регистрационное удостоверение № ФСР 2008/03508 от 04.05.2010. № 130-14. 2018. 48 с.
10. Нетесов С.В. Вирусные гепатиты // Соросовский образовательный журнал. 1997. № 2. С. 35-43.

ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО NO-ДОНОРА ТЕТРАНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ПЕНИЦИЛЛАМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ

Забельникова А.М.¹, Файнгольд И. И.², Санина Н.А.², Смолина А.В.²

¹*Ивановский государственный университет, Иваново, Россия*

²*ФИЦ проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Московская обл., Россия*

Аннотация. Исследован антиоксидантный потенциал тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами (комплекса I) – донора монооксида азота (NO) в гомогенатах печени мышей с моделью кардиотоксичности, индуцированной азитромицином. Установлено, что после введения модельным животным комплекса I в дозе 18 мг/кг эффективно снижается интенсивность процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ) в гомогенатах их печени. Выраженные антиоксидантные свойства исследуемого комплекса рассматриваются как один из механизмов его кардиопротекторного действия.

Ключевые слова: нитрозильный железо-серный комплекс, NO-донор, модель кардиотоксичности, антиоксидант.

EVALUATION OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF A NEW NO DONOR TETRANITROSYL IRON COMPLEX WITH PENICILLAMINE LIGANDS ON THE MOUSE MODEL OF CARDIOTOXICITY

Zabelnikova A.M.¹, Faingold I.I.², Sanina N.A.², Smolina A.V.²

¹*Ivanovo State University, Ivanovo, Russian Federation*

²*Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation*

Abstract. The antioxidant potential of the tetranitrosyl iron complex with penicillamine ligands (complex I) – a nitric oxide (NO) donor – in liver homogenates of mice with an experimental model of azithromycin- induced cardiotoxicity have been investigated. It was found that after the introduction of complex I in a dose of 18 mg/ kg, the intensity of the lipid peroxidation in liver homogenates of model animals effectively decreases. The pronounced antioxidant properties of the studied complex are considered as one of the mechanisms of its cardioprotective action.

Keywords: nitrosyl iron-sulfur complex, NO donor, experimental model of cardiotoxicity, antioxidant.

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) – социально значимое заболевание, лидирующее среди причин смерти от сердечно-сосудистой патологии. Основной причиной возникновения и развития ИБС является атеросклероз, т.е. образование отложений жирных кислот. Одним из

его проявлений считается дисфункция эндотелия, причиной которой, в свою очередь, является инактивация NO молекулами и ионами активных форм кислорода (АФК) и, соответственно, его недостаток в организме [1,2]. Продукты ПОЛ или окисленные основания ДНК (РНК), свидетельствуют о том, что образование АФК из различных источников (НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза и дыхательная цепь митохондрий) играет центральную роль в степени тяжести ишемического повреждения [3].

Окислительный стресс возникает, когда антиоксидантная система организма не справляется с большим количеством высокоактивных молекул, таких как АФК и активные формы азота (АФА). К АФК относятся перекись водорода, супероксид, гидроксильный радикал и др; к АФА – диоксид азота, пероксинитрит и др. [4]. Дисбаланс между образованием АФК и АФА, вызываемый ими окислительный стресс являются основными причинами старения, инсульта, развития нейродегенеративных заболеваний, а также сердечно-сосудистых заболеваний, таких как ИБС, инфаркт миокарда, сердечная недостаточность [5,6].

NO играет множество важнейших ролей в организме, выполнение которых зависит от концентрации, времени его воздействия, скорости образования и других факторов. Необходимо отметить, что NO участвует в регуляции различных митохондриальных функций, в том числе работы мембраносвязанных ферментов. В связи с этим, в настоящее время широко исследуются NO-доноры, обнаруживая широкий спектр биологической активности [7]. Низкомолекулярные доноры NO (никорандил, нитроглицерин, изосорбида динитрат), применяемые в клинике, вызывают развитие нитратной толерантности, требуют дополнительной активации, у ряда пациентов вызывают значительные побочные эффекты. Сера-нитрозильные комплексы железа (СНКЖ) способны донировать NO без дополнительной активации в физиологических условиях, что является важным критерием для разработок в медицинской химии.

Однако известно, что нейтральные комплексы плохо растворимы в воде, а анионные, хоть и водорастворимы, неэффективно донируют NO [8]. Поэтому поиск и исследование биологической активности и физико-химических механизмов действия новых эффективных катионных СНКЖ является необходимой и актуальной задачей в свете отбора многообещающих кандидатов для разработки препаратов кардиопротекторного действия.

В настоящей работе мы исследовали антиоксидантный потенциал катионного тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами $[\text{Fe}_2(\text{S}(\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{NH}_3)\text{COOH}))_2(\text{NO})_4]\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (комплекс I), синтезированного в лаборатории структурной химии (ФИЦ ПХФ и МХ РАН) в гомогенатах печени мышей с моделью кардиотоксичности, индуцированной азитромицином.

Комплекс I включает серосодержащие лиганды природного происхождения (пеницилламин) и NO группы (рис. 1). Ранее были установлены его антигипертензивные и противоишемические свойства в опытах *in vivo* [9], что делает его перспективным кандидатом для разработки кардиопротекторных лекарственных средств.

Моделирование кардиотоксичности, индуцированной азитромицином, проводилось в лаборатории физико-химической биологии физиологически активных соединений ФИЦ ПХФ и МХ РАН по методу [11].

Для работы использовали образцы печени разных экспериментальных групп животных: №1 – контрольная группа интактных мышей; №2 – группа мышей с моделью кардиотоксичности; в остальных группах мышам с моделью кардиотоксичности вводили внутривенно раствор комплекса I в дозе 36 мг/кг (№3) или 18 мг/кг (№4), препарат сравнения нитроглицерин в дозе 36 мг/кг (№5) или 18 мг/кг (№6).

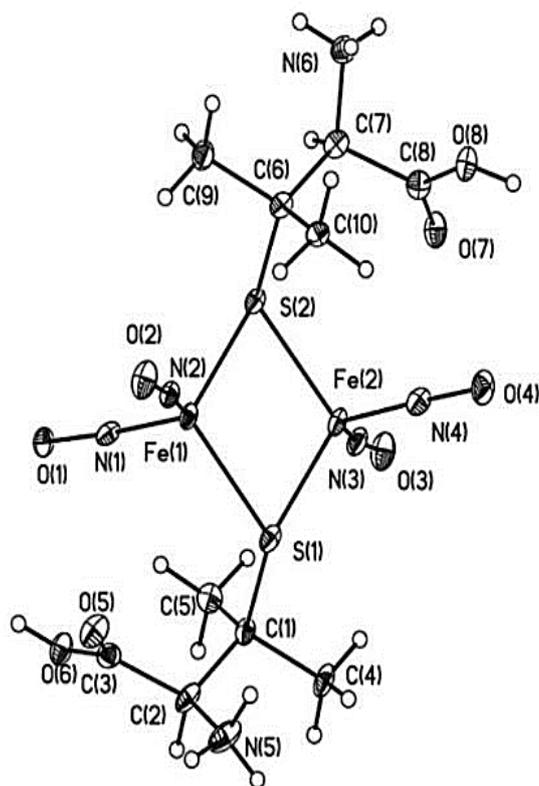


Рисунок 1 – Структура тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами [10].

Исследование антиоксидантного действия комплекса I проводилось по методу [12] с модификациями: влияние комплекса I на интенсивность процесса ПОЛ определялось по содержанию его конечного ТБК (тиобарбитуровая кислота) – активного продукта, малонового диальдегида, в гомогенате печени мышей экспериментальных групп. Метод основан на реакции между ТБК и промежуточными реактивными продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс с максимумом поглощения при длине волны равной 532 нм. Измерения проводили на спектрофотометре Agilent Cary 60 UV-Vis (Agilent, США).

Гомогенат печени экспериментальных групп мышей готовили путем измельчения в К-Na-фосфатном буферном растворе (0,1 М, pH = 7,2) в соотношении 1:5 (1 г печени:5 мл К-Na-фосфатного буфера) с помощью гомогенизатора HG-15D (DAIHAN Scientific, Ю.Корея) в течении 2 минут при температуре 4° С.

Для оценки влияния соединений на интенсивность ПОЛ в гомогенате печени мышей к 0,5 мл гомогената добавляли 1 мл 15% трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и центрифугировали при 3000 г в течение 15 минут. К 1 мл супернатанта добавляли 2 мл 0,8% ТБК, инкубировали на водяной бане 15 мин при 100°С, затем охлаждали до комнатной температуры и измеряли оптическую плотность при $\lambda=532$ нм. В качестве контроля использовали образцы без супернатанта.

Концентрацию ТБК-активных продуктов рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{(A_0 - A_k)}{\varepsilon \cdot l \cdot C}$$

где K – концентрация ТБК-активных продуктов; A_0 – оптическая плотность опытного образца; A_k – оптическая плотность контрольного образца; ε – молярный коэффициент экстинкции, равный $1.56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; l – длина кюветы; C – концентрация белка.

Концентрацию белка определяли по методу Лоури [13] который основан на реакции белков с солями меди (II) в щелочном растворе и восстановлении фосфорно-молибдено-вольфрамового реактива (реактив Фолина) с образованием окрашенных продуктов, интенсивность окраски которых определяют по оптической плотности при длине волны 750 нм.

Гомогенаты печени мышей экспериментальных групп разбавляли в 10 раз. В опытные пробирки добавляли 0,1 мл разбавленного белка, 0,8 мл H_2O и 0,1 мл 0,1Н NaOH, в контрольную – 0,9 мл H_2O и 0,1 мл 0,1 Н NaOH. Были приготовлены реактив А (0,5% водный раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), реактив В (1% водный раствор $\text{Na}_2\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$) и реактив С (2% Na_2CO_3 в 0,1Н NaOH). К каждой пробе добавляли по 1 мл свежеприготовленного реактива Д (10 мл реактива С, 0,1 мл реактива А и 0,1 мл реактива В). Выдержав 10 мин. при комнатной температуре, добавляли реактив Фолина по 0,1 мл. Затем пробы инкубировали 35 мин. при 37°C . Измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при $\lambda=750 \text{ nm}$. Находили разницу между средним значением оптической плотности опытных образцов и контрольных.

Результаты исследования антиоксидантного потенциала комплекса I представлены на рисунке 2.

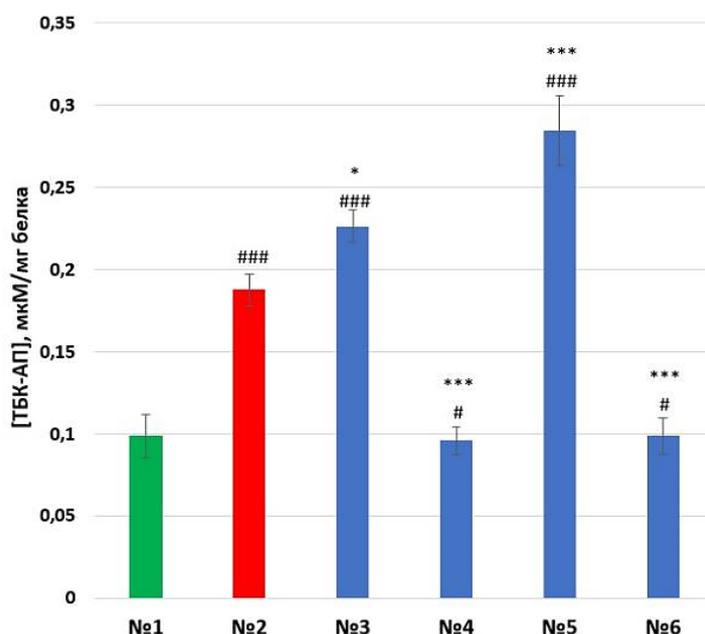


Рисунок 2 – Влияние исследуемого комплекса I и соединения сравнения нитроглицерина на интенсивность процесса ПОЛ в гомогенате печени мышей с моделью кардиотоксичности. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ относительно группы мышей с моделью кардиотоксичности без терапии; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ относительно контрольной группы.

Установлено, что введение комплекса I в дозе 18 мг/кг мышам с моделью кардиотоксичности эффективно снижает количество ТБК-АП в гомогенате печени (≈на 49%

по сравнению с группой мышей с моделью кардиотоксичности без терапии), т.е. снижает интенсивность процесса ПОЛ в печени мышей с моделью кардиотоксичности, и соответственно, обладает выраженными антиоксидантными свойствами.

№1 – контрольная группа интактных мышей;

№2 – группа мышей с моделью кардиотоксичности без терапии;

№3 – кардиотоксичность+комплекс I, 36 мг/кг;

№4 – кардиотоксичность+комплекс I, 18 мг/кг;

№5 – кардиотоксичность+нитроглицерин, 36 мг/кг;

№6 – кардиотоксичность+нитроглицерин, 18 мг/кг.

В качестве соединения сравнения мы использовали лекарственное средство на основе органических нитратов нитроглицерин – известный сосудорасширяющий препарат, который применяют в основном для уменьшения боли при стенокардии, одного из проявлений ИБС. Он обладает значительными побочными эффектами при длительном применении, такими как слабость, тошнота, обморок, гипотензия, расширение вен, в том числе – у пациентов с инфарктом правого желудочка может вызвать кардиогенный шок [14].

Результаты нашего исследования показали, что нитроглицерин имеет сходный с комплексом I характер действия на интенсивность процесса ПОЛ: в дозе 18 мг/кг интенсивно снижал количество ТБК-АП (~на 48%), но при этом в дозе 36 мг/кг значительно повышал интенсивность процесса ПОЛ по сравнению с группой мышей с моделью кардиотоксичности без терапии. Таким образом, введение нового NO-донора тетранитрозильного комплекса железа с пеницилламиновыми лигандами в дозе 18 мг/кг мышам с моделью кардиотоксичности приводит к снижению интенсивности процесса ПОЛ, как показано, в основном за счет выхода молекул NO при разложении комплекса в физиологических условиях. Приведенные результаты и литературные данные о антигипертензивных и противоишемических свойствах исследуемого комплекса позволяют рассматривать его антиоксидантное действие как один из важнейших механизмов кардиопротекторного эффекта комплекса I и рекомендовать его для дальнейшей разработки лекарственного средства для терапии ИБС.

Изучение биологической активности комплекса I поддержано грантом Российского научного фонда (проект № 22-24-00764). Синтез исследуемого комплекса поддержан Государственным заданием [№ АААА-А19-119071890015–6].

Библиографический список

1. Cai H., Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress // *Circ Res.* – 2000. – № 87 (10). – P. 840-844.
2. Бондар К.Ю., Белая О.Л., Лазутина О.М., Михайлова И.С., Сморгалова Т.В., Куроптева З.В., Байдер Л.М. Гендерные особенности антиоксидантной защиты и эффективность аторвастатина у больных со стабильными формами ишемической болезни сердца // *Клиническая медицина.* – 2017. – №5. – С. 398-403.
3. Daiber A., Andreadou I., Oelze M., Davidson S.M., Hausenloy D.J. Discovery of new therapeutic redox targets for cardioprotection against ischemia/reperfusion injury and heart failure // *Free Radic Biol Med.* – 2021. – № 163. – P. 325-343.

4. Zhang P.Y., Xu X., Li X.C. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2014. – № 18 (20). – P. 3091-3096.
5. Soto-Otero R., Méndez-Alvarez E., Hermida-Ameijeiras A., Sánchez-Sellero I., Cruz-Landeira A., Lamas M.L. Inhibition of brain monoamine oxidase activity by the generation of hydroxyl radicals: potential implications in relation to oxidative stress // *Life Sci.* – 2001. – № 69 (8). – P. 879-889.
6. Barnham K., Masters C., Bush A. Neurodegenerative diseases and oxidative stress // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2004. – № 3 (3). – P. 205-214.
7. Garren M.R., Ashcraft M., Qian Y., Douglass M., Brisbois E.J., Handa H. Nitric oxide and viral infection: recent developments in antiviral therapies and platforms // *Appl. Mater. Today.* – 2021. – V. 22. – № 100887. – P. 1-16.
8. Шматко Н.И. Катионные динитрозильные комплексы железа с тиомочевинной и ее производными – новые доноры оксида азота: дис. канд. хим. наук. – Черноголовка. – 2017. – С. 1-158.
9. Санина Н.А., Серебрякова Л.И., Шульженко В.С., Писаренко О.И., Руднева Т.Н., Алдошин С.М. Патент на изобретение № 2460531. Применение биядерного сера-нитрозильного комплекса железа катионного типа в качестве вазодилататорного лекарственного средства, 2012.
10. Pokidova O., Kormukhina A., Kotelnikov A., Rudneva, T., Lyssenko K., Sanina N. Features of the decomposition of cationic nitrosyl iron complexes with N-ethylthiourea and penicillamine ligands in the presence of albumin // *Inorganica Chimica Acta.* – 2021. – № 524. – P. 1-12.
11. Atli O., Ilgin S., Altuntas H., Burukoglu D. Evaluation of azithromycin induced cardiotoxicity in rats // *Int J Clin Exp Med.* – 2015. – № 8 (3). – P. 3681-3690.
12. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // *Anal Biochem.* – 1979. – № 95 (2). – P. 351-358.
13. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J Biol Chem.* – 1951. – № 193 (1). – P. 265-275.
14. Kim K.H., Kerndt C.C., Adnan G., Schaller D.J. // *Nitroglycerin.* – 2021.

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ *CANDIDA ALBICANS* С БАКТЕРИЯМИ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Захарова Ю. В., Отдушкина Л. Ю., Марковская А. А.

Кемеровский государственный медицинский университет, Минздрава РФ, Кемерово, Россия.

Аннотация. Цель: исследование *in vitro* механизмов взаимодействия грибов *Candida albicans* с кишечными микросимбионтами ВИЧ-инфицированных пациентов. Материалы и методы: В экспериментах использованы 38 штаммов *Candida albicans*, 48 культур *Bifidobacterium spp.*, 28 штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Результаты: Фосфолипазы грибов снижали в 2 содержание ненасыщенных и длинноцепочечных жирных кислот у бифидобактерий ($\chi^2=4,08$, $df=1$, $p=0,023$). *K. pneumoniae* в 2 раза снижали пролиферацию ($p=0,01$) и образование ростовых трубок ($p=0,05$). Вывод: Между грибами и бактериями установлены антагонистические взаимоотношения.

Ключевые слова: взаимодействие, *Candida albicans*, бифидобактерии, клебсиеллы.

MECHANISMS OF INTERACTION OF *CANDIDA ALBICANS* WITH INTESTINAL MICROBIOME BACTERIA IN HIV-INFECTED PATIENTS

Zakharova Yu. V., Otdushkina L. Yu., Markovskaya A. A.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract: Objective: to study *in vitro* the mechanisms of interaction of *Candida albicans* fungi with microsymbionts of the intestinal microbiome of HIV-infected patients. Materials and methods: 38 strains of *Candida albicans*, 48 cultures of *Bifidobacterium spp.*, 28 strains of *Klebsiella pneumoniae* were used in experiments. Results: Fungal phospholipases reduced by 2 the content of unsaturated and long-chain fatty acids in bifidobacteria ($\chi^2=4.08$, $df=1$, $p=0.023$). *K. pneumoniae* reduced proliferation by 2 times ($p=0.01$) and the formation of growth tubes ($p=0.05$). Conclusion: Antagonistic effects were established between fungi and bacteria relationships.

Keywords: interaction, *Candida albicans*, bifidobacteria, klebsiella.

Кишечный микробиом человека выполняет множество функций, направленных на поддержание гомеостаза и определяющих состояние здоровья, качество и продолжительность жизни человека [1]. Огромный видовой состав, сложные межмикробные взаимоотношения, динамичность во времени – все это делает кишечный микробиом объектом пристального изучения [1, 2]. При этом сейчас активно изучается не столько качественный и количественный состав микробиоты кишечника в норме [2] и при патологических состояниях [3], в настоящее время активно исследуются межмикробные факторы и механизмы

взаимодействия микробов [4]. Как в любом сложном и многокомпонентном сообществе микроорганизмы в кишечном микробиоме вступают в разные типы симбиотических взаимоотношений – от синергизма до антагонизма. Многие факторы их взаимодействия уже известны. Это и сигнальные молекулы, определяющие «социальное» поведение бактерий, антимикробные низкомолекулярные вещества, выполняющие роль факторов прямого антагонизма, молекулы, активирующие гены вторичных путей метаболизма, что представляет собой вариант непрямого антагонизма бактерий [5].

Грибы рода *Candida* являются представителями не только кишечного микробиома, их присутствие регистрируют в составе микробиоты кожи, слизистых полости рта, половых органов. В видовой структуре чаще доминирует *Candida albicans* [6]. Обычно они не вызывают проблем у человека при нормальном иммунном статусе. Однако, кандидозы являются распространенным заболеванием у иммунокомпрометированных пациентов. В связи с тем, что кандидоз слизистых является эндогенной инфекцией, а желудочно-кишечный тракт является основным резервуаром данных микромицетов, возникает необходимость изучения характера взаимодействия грибов *Candida albicans* с другими представителями кишечного биотопа.

Цель: исследование *in vitro* механизмов взаимодействия грибов *Candida albicans* с кишечными микросимбионтами ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы: В экспериментах были использованы 38 штаммов грибов *C. albicans*, изолированных из кишечного микробиома 89 ВИЧ-инфицированных детей I и II иммунной категории. В качестве доминантных представителей были взяты микроорганизмы рода *Bifidobacterium* – 48 штаммов, в качестве условно-патогенных микроорганизмов – 28 штаммов *Klebsiella pneumoniae*. На проведение исследования было получено согласие этического комитета. Все пациенты, включенные в исследование, подписывали информированное добровольное согласие. Изоляцию микросимбионтов проводили стандартным бактериологическим методом, идентификацию осуществляли на анализаторе VITEK 2 Compact (BioMerieux, Франция).

Изучали воздействие липаз грибов на жирнокислотный состав клеточных стенок и биологические свойства бифидобактерий. Концентрацию липаз *C. albicans* в культуральной жидкости определяли на спектрофотометре СФ-2000, используя коммерческий набор «LIPASA liquicolor» (HUMAN, Германия). Из культуральной жидкости грибов готовили супернатанты и добавляли к бульонной культуре бифидобактерий. У интактных и экспонированных экзометаболитами штаммов изучали колонизационные свойства: гидрофобность и специфическую адгезию. Качественный и количественный состав жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов бактерий, оценивали на хроматомасс-спектрометре Agilent 7000 В (Германия).

Оценивали влияние *K. pneumoniae* на пролиферативные свойства грибов, конструируя бактериально-грибковые консорциумы. Количество микроорганизмов разных видов в консорциуме составило по 0,5 Ед по Мак-Фарленду. Сокультивировали их в жидкой питательной среде в течение суток, затем делали посевы по Голду на среду Сабуро (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Для получения клебсиелл количественные высевы из бульонной ассоциации делали на среду Эндо (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск). Также оценивали влияние *K. pneumoniae* на морфологическую трансформацию грибов *Candida albicans*, т.е. способность формировать ростовые трубки в белковой среде.

Проверку гипотезы о нормальности распределения переменных в рассматриваемой совокупности оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Характер распределения

данных не соответствовал нормальному, поэтому для статистической обработки применяли непараметрические методы оценки статистической значимости (критерий χ^2 и критерия Манна-Уитни). Результаты представлены в относительных числах и в виде медианы с интерквартильным размахом – Ме (25-й; 75-й). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты исследования:

Ранее нами было показано, что у детей с ВИЧ-инфекцией происходит формирование специфического био профиля бифидобактерий, что выражается снижением их регуляторного потенциала [7]. У бифидобактерий регистрировали снижение способности к аутоагрегации и адгезии, падало количество продуцируемых кислот и лизоцима, изменялись антиоксидантные свойства [7]. Это способствовало формированию многокомпонентных ассоциаций условно-патогенной микробиоты, включающих энтерококков, энтеробактерий, грибов рода *Candida*.

Известно наличие нескольких групп факторов патогенности у грибов рода *Candida*, особое место занимают гидролитические ферменты – фосфолипазы. Эти ферменты используются микромицетами для инвазирования тканей при оппортунистических микозах. Однако данные энзимы могут воздействовать не только на клетки – мишени макроорганизма, но также использоваться грибами как факторы межконкурентной борьбы в системе «бактерия-микромицет».

Количественный анализ показал высокое содержание фосфолипаз в супернатантах *C. albicans* – 79 (64; 81) Е/мл. В опыте *in vitro* установлено, что под влиянием фосфолипаз грибов у бифидобактерий статистически значимо изменялась структура жирных кислот ($\chi^2=104,1$, $df=21$, $p=0,0003$). У интактных бифидобактерий в структуре жирных кислот плазматической мембраны преобладали кислоты с ненасыщенной углеродной цепью (58,9%), при этом 77,1% из них были в виде изоформ. Соотношение ненасыщенных кислот к насыщенным составило 1,5 : 1. После экспонирования бифидобактерий супернатантами грибов у них изменялась в 2 раза масса жирных кислот с насыщенной алкильной цепью, доля которых в общей структуре достигала уже 90,2%. Отношение непредельных кислот к предельным уже составило 1 : 9. До воздействия супернатантов *C. albicans* наибольший удельный вес в составе фосфолипидов *Bifidobacterim spp.* занимала непредельная олеиновая (С 18:1; 39,6%), второе место – насыщенная пальмитиновая (С 16:0; 26,6%), третье – кислота с двумя непредельными связями – линолевая (С 18:2; 14,4%). После экспонирования бифидобактерий супернатантами структура жирных кислот в фосфолипидах поменялась. Наибольший удельный вес среди жирных кислот стали занимать ненасыщенная пальмитиновая (С 16:0) и стеариновая кислоты (С 18:0) 45,2% и 41,1% соответственно. На олеиновую кислоту (С 18:1), которая до обработки фосфолипазами грибов доминировала, приходилось уже только 4,5%. Отмечали снижение спектра регистрируемых жирных кислот. В составе мембранных фосфолипидов уже отсутствовали алифатические длинноцепочечные одноосновные карбоновые кислоты такие как, как эйкозановая (С 20:0), докозановая (С 22:0), тетракозановая кислоты (С 24:0) и непредельная докозеновая кислота (С 22:1). Также уменьшалось содержание жирных кислот со средней длиной углеродной цепи – тридекановой (С 13:0), миристиновой (С 14:0), тетрадеценовой (С 14:1), их суммарный удельный вес снижался с 6,1% до воздействия экзометаболитами до 3,8% после воздействия. Популяция бифидобактерий, взятая в опыт, характеризовалась средней гидрофобностью (54,8% (28,3; 78,7) и средним индексом адгезии (ИАМ= 4,1 (1,3; 5,5). Изменение у них состава

фосфолипидов после контакта с супернатантами грибов приводило к снижению гидрофобности до 35,2% (17,8; 42,1) и адгезии до 3,9 (0,9; 4,1) ($\chi^2=4,08$, $df=1$, $p=0,023$).

У 33% детей с ВИЧ-инфекцией формировались ассоциации *K. pneumoniae*. и *C. albicans*. Отмечали, что в этих ассоциациях грибы имели низкие количественные уровни 2,4 (2,0; 3,2) lg КОЕ/г, а титры клебсиелл в ассоциациях достигали 7,2 (5,6; 8,1) lg КОЕ/г ($p=0,001$). Если же грибы выделяли в монокультурах, то их количественный уровень достигал 3,5 (2,9; 3,8) lg КОЕ/г. Отсутствие грибов в микробиоме не сказывалось на количественном уровне *K. pneumoniae*, так как в монокультурах титр клебсиелл составил 7,1 (6,6; 7,5) lg КОЕ/г. Полученные результаты позволяют предположить формирование антагонистических взаимоотношений клебсиелл и грибов, однако, опыты по наличию прямого антагонизма между этими микросимбионтами показали его отсутствие. В связи с этим нами был оценен *in vitro* характер влияния *K. pneumoniae*. на пролиферативные свойства и количественный уровень *C. albicans*. Опыты *in vitro* по сокультивированию *K. pneumoniae* и *C. albicans* показали, что через 4,5 часа титры грибов после инкубирования с клебсиеллами составляют 2,3 (2; 2,5) lg, тогда как монокультура *C. albicans* уже через 2 часа достигала титров в 4,2 (3,1; 4,5) lg КОЕ/г ($p=0,01$). В ходе изучения микробиома ВИЧ-инфицированных детей мы отмечали, что грибы из ассоциаций только в 38% давали ростовые трубки, которые предшествуют образованию гифальной формы этих микромицетов, т.е. предшествуют морфологической трансформации грибов. Этот признак довольно часто используется как скрининговый, позволяющий идентифицировать вид *C. albicans*. При совместном культивировании с клебсиеллами только 2 (1; 3) дрожжевые клетки в поле зрения давали ростовые трубки, тогда как в монокультуре грибов обнаруживали 5 (4; 6) трансформированных бластоспор ($p=0,05$).

Выводы:

1. В многокомпонентном кишечном сообществе в основе взаимодействия грибов *C. albicans* и бактериальных микросимбионтов рода *Bifidobacterium* и *Klebsiella* лежит антагонистический тип симбиоза.
2. Основными факторами антагонизма условно-патогенных бактерий по отношению к грибам являются секретируемые ингибиторы пролиферативной активности, морфологической трансформации микромицетов. У *C. albicans* факторами непрямого антагонизма являются ферменты патогенности, в частности, фосфолипаза, которая изменяет архитектуру клеточных мембран и биологические свойства бифидобактерий.

Библиографический список

1. Ghosh S., Pramanik S. Structural diversity, functional aspects and future therapeutic applications of human gut microbiome. // Archives of Microbiology. – 2021. – V. 203. P. 5281–5308.
2. Adadea E. E., Lakhena K. A., Lemusa A. A, Valm A. M. Recent progress in analyzing the spatial structure of the human microbiome: distinguishing biogeography and architecture in the oral and gut communities. // Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research. – 2021. – V. 18. P. 275–283.
3. Yan Sh., Yin X-M. Gut microbiome in liver pathophysiology and cholestatic liver disease. // Liver Research. – 2021. V. 5. P. 151-163.

4. Олескин А. В., Эль-Регистан Г. И., Шендеров Б. А. Межмикробные химические взаимодействия и диалог микробиота-хозяин: роль нейромедиаторов. // Микробиология. – 2016. – Т. 85. – № 1. С. 3-25.
5. Liang G. Altered gut bacterial and metabolic signatures and their interaction in inflammatory bowel disease. // Synthetic and Systems Biotechnology. – 2021. – V.6. P. 377–383.
6. Muzaheeda, Alshehrib B. A., Rabaanc A. A, El-Masrya O. S., Acharyaf S., Alzahrana F.M. A 20-year retrospective clinical analysis of *Candida* infections in tertiary centre: Single-center experience. // Journal of Infection and Public Health. – 2022. – V. 15. P. 69–74.
7. Захарова Ю. В., Леванова Л. А., Штернис Т. А., Сухих А. С., Марковская А. А. Характеристика биологических свойств бифидобактерий при микрoэкологических нарушениях кишечника у ВИЧ-инфицированных детей. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 3. – С. 3-9.

РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ХИМУСА И ПЛОТНОЙ ЭНДОГЕННОЙ ФРАКЦИИ ХИМУСА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Ксенофонтов Д.А., Ксенофонтова А.А.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

Аннотация. В эксперименте на кроликах из разных отделов пищеварительного тракта получены образцы химуса, из которого выделена плотная эндогенная фракция. Методом рентгеноструктурного анализа получены рентгенограммы химуса. Делается заключение о пространственной неоднородности химуса, свидетельствующее о наличие структурной периодичности. Плотность колец рентгенограмм ПЭФ и их количество гораздо выше, чем в цельном химусе, что свидетельствует о высокой степени упорядоченности протеогликанов слизи химуса.

Ключевые слова: химус, кролики, энтеральная среда, рентгеноструктурный анализ.

X-RAY ANALYSIS OF CHEMUS AND DENSE ENDOGENOUS CHEMUS FRACTION OF THE GASTROINTESTINAL TRACT.

Ksenofontov D.A., Ksenofontova A.A.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract. In an experiment on rabbits from different parts of the digestive tract, samples of chyme were obtained, from which a dense endogenous fraction was isolated. X-ray diffraction patterns of the chyme were obtained by X-ray diffraction analysis. A conclusion is made about the spatial heterogeneity of the chyme, indicating the presence of structural periodicity. The density of PEF X-ray rings and their number are much higher than in whole chyme, which indicates a high degree of ordering of proteoglycans in chyme mucus.

Keywords: chyme, rabbits, enteral environment, X-ray diffraction analysis.

Изучение процессов пищеварения представляет большой теоретический и практический интерес для медицинской и зоотехнической науки в области питания человека и животных [1, 2, 3, 4]. В настоящее время полостное пищеварение остается наименее изученным звеном пищеварительной системы, а содержащийся в кишечнике химус рассматривается как смесь пищевых волокон и пищеварительных соков. В исследованиях, проведенных Ю.М. Гальпериным из химуса были впервые выделены и изучены рыхлые флокулярные структуры эндогенного происхождения, а в работах сотрудников кафедры физиологии, этологии и биохимии животных ФГБОУ ВО РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева детально проанализированы количественные характеристики плотной эндогенной фракции химуса [5, 6, 7]. В итоге установлены общевидовые закономерности взаимообусловленных изменений

соотношения экзогенных и эндогенных структур химуса по мере его продвижения по кишечнику.

Также было показано, что энтеральный химус – это гомеостатичная среда, где в качестве системообразующего начала выступает плотная эндогенная фракция, содержащая флоккулярные образования полостной слизи, которая, находясь в нативном химусе в гидратированном состоянии, образует своеобразную энтероплазму и составляет большую часть его объема [8].

Масса слизи, присутствующая в таком количестве в полости ЖКТ у всех видов животных независимо от строения ЖКТ и от рациона, не может выполнять только защитную функцию, как это было принято считать ранее. По-видимому, слизь в таком количестве физиологически необходима и выполняет собственную специфическую функцию в процессах пищеварения. Но так как функцию без структуры выполнять весьма затруднительно, целью данной работы стало проведение рентгеноструктурного анализа химуса и его плотной эндогенной фракции из разных отделов пищеварительного тракта кроликов.

Метод рентгеноструктурного анализа позволяет оценить и объективно установить структуру кристаллических веществ, в том числе витаминов, антибиотиков, а также сложных органических полимеров. Рентгеноструктурный анализ также с успехом применяется для изучения кристаллического состояния аморфных и жидких тел [9, 10]. Рентгенограмма химуса кроликов при малоугловом рассеивании, позволила выявить его пространственную неоднородность, свидетельствующие о наличие структурной периодичности, размеры которой превышают межатомные расстояния (рис. 1).

По ширине, форме и интенсивности колец рентгенограмм можно делать заключения об особенностях ближнего порядка межатомных расстояний в той или иной конкретной жидкой или аморфной структуре. Чем выше степень упорядоченность атомного строения химуса, тем более плотный и широкий, диффузный характер имеет рассеянное им рентгеновское излучение. Рентгенограммы образцов химуса, размещенные на пленке на расстоянии 45 мм от детектора отличны как от самой пленки, так и от отдела ЖКТ. На рисунке хорошо видно, что пленка дает лишь один дифракционный максимум в форме тонкого прерывистого кольца с шестью утолщениями. Это кольцо имеется и на фотографиях химуса из всех отделов пищеварительного тракта. Однако помимо него во всех образцах наблюдается яркий максимум в виде широкого диффузного кольца, которое наиболее плотное и широкое в образцах химуса из 12-ти перстной и тощей кишки. В целом полученные диффузные кольца цельного химуса напоминают рентгенограмму аморфного вещества – ацетата целлюлозы, а их диаметр может служить для грубой оценки средних межатомных расстояний в нём.

Полученная картина аморфного химуса также напоминает порошковые рентгенограммы, которые получаются при рассеянии рентгеновских лучей кристаллами. В данном случае широкие и диффузные кольца на рентгенограммах химуса из разных отделов пищеварительного тракта, напоминающие по форме оптический феномен – гало, указывают на наличие кристаллов очень малого размера, случайно ориентированных в энтеральной среде, а наблюдаемые структуры представляют собой плотно упакованные ассоциаты молекул. При этом в аморфном веществе правильно повторяются межатомные расстояния внутри молекулы.

Таким образом, в цельном химусе существует небольшое число часто встречающихся межатомных расстояний, что и является причиной появления на рентгенограмме аморфного гало, ширина которого значительно превышает ширину кристаллических рефлексов.

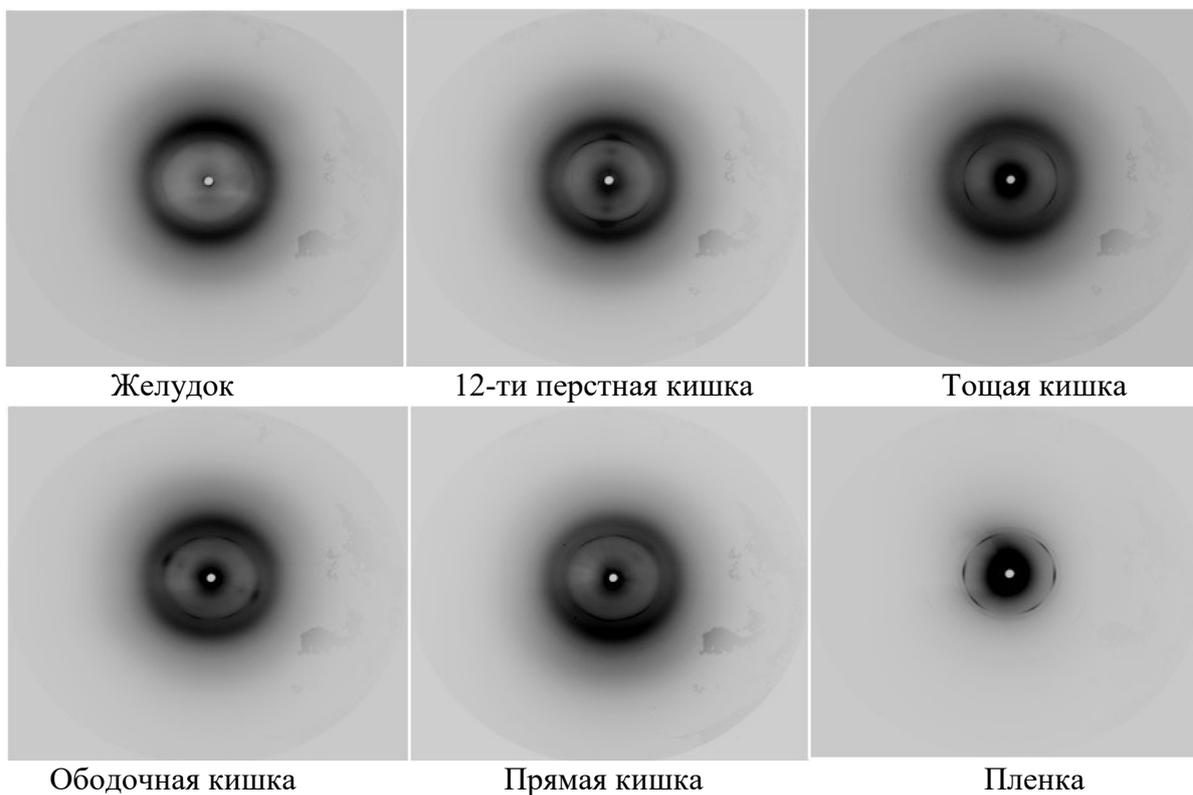


Рисунок 1 – Рентгенограммы химуса кролика на пленке, расстояние от детектора 45 мм (фотографический метод).

Аморфное состояние химуса придает ему определенные физико-химические свойства. Во-первых, это изотропичность, т.е. независимость механических, оптических, электрических и др. свойств от направления вещества, во-вторых, отсутствует определенная точка плавления, в-третьих, в аморфном веществе в отличие от жидкости отсутствует интенсивный обмен местами между соседними атомами или молекулами – самодиффузия, поэтому нативный химус можно рассматривать как жидкость с очень большим коэффициентом вязкости. Кроме этого аморфное состояние, обладая некоторым избыточным запасом внутренней энергии, всегда менее устойчиво и стабильно по сравнению с кристаллическим. Особенность аморфного вещества обусловлена отсутствием строгой повторяемости во всех направлениях одного и того же элемента структуры и наличием упорядоченности в расположении соседних элементов структуры на расстояниях, сравнимых с размерами молекул. В этой связи аморфное вещество отличается от кристаллического изотропностью характеристик и как жидкость оно имеет одинаковые значения данного свойства при измерении в любом направлении внутри вещества.

Для энтеральной среды аморфное состояние химуса является наиболее эффективным, в отличие от жидкого состояния, которое характеризуется достаточно сильным межмолекулярным взаимодействием, распространяющимся внутри небольших агрегатов сохраняющим заметную подвижность относительно друг друга. Структура химуса, находясь в аморфном состоянии, будет стремиться к упорядочению, т. е. к образованию пространственных структур, в которых расположение атомов (молекул) соответствует периодическому повторению узора в трех измерениях. Следовательно, химус по своей структуре более близок к твердому телу с кристаллической структурой, для которого характерно постоянная термодинамическая и кинетическая стабильность, существенно повышающая время жизни структурных элементов при изменении внешних условий.

Поэтому при внешних воздействиях аморфный химус обнаруживает одновременно упругие свойства, подобно кристаллическим твёрдым веществам, и текучесть, подобно жидкости. В механике такие сплошные среды моделируются как вязкоупругие среды. В биологии органические высокомолекулярные соединения в процессе гидратации образуют довольно стабильные коллоидные среды, в которых действуют силы, препятствующие укрупнению мицеллярных комплексов. Коллоидные системы могут быть в двух состояниях – золь или гель. У гелей молекулы соединяются друг с другом в длинные цепочки или нити, которые создают пространственную решетку – скелет геля, ячейки которого заполняются жидкостью. Такая структура сообщает гелю свойства твёрдого тела сопротивляться деформации. Концентрация геля сильно зависит от содержания в нем воды, а гелеобразование происходит в результате частичной коагуляции, когда частицы слипаются не полностью, образуя пространственную сетку, в петлях которой находится дисперсионная среда. Чем толще прослойка среды между частицами, тем менее прочна структура и тем жидкообразней система, что является важнейшей характеристикой химуса.

Для более полной структурной оценки энтеральной среды был проведен рентгеноструктурный анализ плотной эндогенной фракции, который наглядно подтвердил структурированность слизистых образований данной составляющей химуса. Картина дифракционных колец ПЭФ существенно отличается от диффузного гало цельного химуса. Рефлексы на рентгенограмме плотной эндогенной фракции очень тонкие, что присуще так называемым «структурным» рефлексам, то есть рефлексам, обусловленным структурой молекулы протеогликанов (рис. 2). В то же время рефлексы цельного химуса имеют довольно большую ширину, так называемые «упаковочные» рефлексы, обусловленные, как правило, регулярной взаимной упаковкой молекулы.

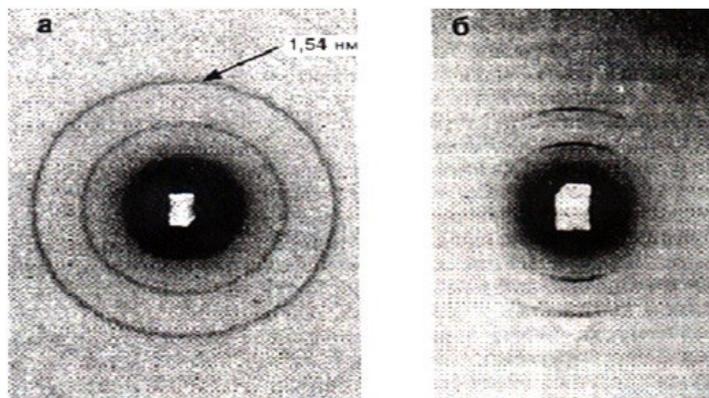


Рисунок 2 – Рентгенограммы ПЭФ химуса кролика (фотографический метод):
а) ПЭФ химуса тощей кишки, б) ПЭФ химуса толстой кишки.

Таким образом, можно предположить, что наблюдаемые рефлексы обусловлены структурой молекул протеогликанов полостной слизи. Плотность колец рентгенограмм ПЭФ и их количество гораздо выше, чем в цельном химусе, что свидетельствует о высокой степени упорядоченности протеогликановых систем химуса.

Наиболее упорядоченный характер мицелл мукополисахаридов ПЭФ характерен для химуса двенадцатиперстной кишки (таблица). На полученных рентгенограммах наибольшее число четких дифракционных максимумов (11) наблюдалось в ПЭФ из 12-перстной кишки. В данном образце межплоскостные расстояния между атомами в гликопротеинах имеют разный порядок от 5,06 до 0,42 нм, что свидетельствует о высокой степени упорядоченности молекул

протеогликанов. Менее выраженную, но достаточно четкую дифракцию дают препараты ПЭФ из тощей (8) и подвздошной кишок (9). Препараты ПЭФ из толстого кишечника (слепая, ободочная и прямая кишки) дают только 1 рефлекс. Образцы ПЭФ из желудка рефлексов не дали.

Таблица – Дифракционные кольца и межплоскостные расстояния по данным рентгеноструктурного анализа ПЭФ из разных отделов ЖКТ (нм)

Рефлексы	Желудок	Тонкий кишечник			Толстый кишечник		
		12-ти перстная кишка	тощая кишка	подвздошная кишка	слепая кишка	ободочная кишка	прямая кишка
1	-	5,06	4,9	4,93	5,4	5,5	5,45
2	-	2,74	-	-	-	-	-
3	-	2,49	2,45	2,48	-	-	-
4	-	1,82	-	-	-	-	-
5	-	1,65	1,65	1,66	-	-	-
6	-	1,25	1,25	1,25	-	-	-
7	-	0,98	0,98	0,99	-	-	-
8	-	0,63	0,63	0,62	-	-	-
9	-	0,59	-	0,52	-	-	-
10	-	0,45	0,44	0,45	-	-	-
11	-	0,42	0,42	0,42	-	-	-

Таким образом, гликопротеины слизи энтеральной среды имеют более упорядоченную структуру, чем цельный химус, и имеет выраженную динамику структурных изменений на протяжении пищеварительного тракта. В содержимом желудка при низком значении pH упорядоченность молекул протеогликановых систем исчезает, в тонком кишечнике наиболее структурирована ПЭФ проксимальной части, а далее по мере продвижения химуса по кишке структура ПЭФ частично разрушается, что можно объяснить ее повышенной функциональной активностью и в связи с этим неизбежным изнашиванием структуры. Уже на уровне подвздошной кишки четкость рефлексов стирается. В толстом кишечнике ПЭФ из всех отделов имеет лишь один максимум одинакового порядка, отличного от препаратов из тонкого кишечника, что свидетельствует об иной структурно-функциональной организации химуса.

Результаты рентгеноструктурного анализа однозначно говорят о том, что процесс формирования плотной эндогенной фракции связан с двенадцатиперстной кишкой. Свою функциональную активность полостная слизь приобретает при взаимодействии химуса желудка, панкреатического сока и секретов бокаловидных клеток слизистой двенадцатиперстной кишки. Вероятность развития событий именно по такому сценарию подчеркивает то, что химус после прохождения пилоруса не задерживается в двенадцатиперстной кишке и очень быстро ее покидает. Поэтому при наблюдении *in situ* за работой двенадцатиперстной кишки, последняя всегда выглядит полупустой, а получение дуоденального химуса у животных из-за его малого количества представляется сложной методической задачей.

Пространственная структурированность ПЭФ и ее химический состав в химусе дают основания говорить об универсальной (общебиологической) роли полостной слизи в процессах пищеварения. Протеогликановые системы полостной слизи, участвуя в структурировании химуса, как полидентантные лиганды, формируют нанопорядоченный каркас энтероплазмы. При сопряжении конформационно детерминированных элементов

глобулярных белковых структур слизистого эпителия кишечной стенки и конформационно лабильных протеогликановых структур пристеночного матрикса около клеток образуется специфическая коллоидная среда с громадной фрактальной поверхностью, очень чувствительная к различным физико-химическим факторам экзогенного и эндогенного характера.

Библиографический список

1. Ermund A., Schütte A., Johansson M. E. V., Gustafsson J.K., Hansson G.C. Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. I. Gastrointestinal mucus layers have different properties depending on location as well as over the Peyer's patches // American Journal of physiology Gastrointestinal and Liver physiology, Volume 305 Issue 5September 2013.- P. G341-G347.
2. Holmén Larsson J.M., Thomsson K.A., Rodríguez-Piñeiro A.M. et al Studies of mucus in mouse stomach, small intestine, and colon. III. Gastrointestinal Muc5ac and Muc2 mucin O-glycan patterns reveal a regiospecific distribution // Am.J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. -2013 Sep 1;305(5):G357-63. doi: 10.1152/ajpgi. 00048.2013
3. Bergstrom K.S., Xia L. Mucin-type O-glycans and their roles in intestinal homeostasis // Glycobiology. 2013 Sep – 23 (9):1026-37. doi: 10.1093/glycob/cwt045.
4. Syed Z.A., Zhang L., Hagen K.G. Ten In vivo models of mucin biosynthesis and function // Adv Drug. Deliv. Rev. 2022 May;184:114182. doi: 10.1016/j.addr.2022.114182.
5. Гальперин Ю.М., Лазарев П.И. Пищеварение и гомеостаз // М.: Наука, 1986.- 311С.
6. Иванов А.А., Полякова Е.П., Ксенофонтов Д.А. Экспериментальное обоснование роли структурирования и других характеристик химуса в определении функциональных возможностей желудочно-кишечного тракта при проведении энтерального питания // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009.- №6.- С.51-56.
7. Полякова Е.П. Д.А. Ксенофонтов Метод изучения полостного пищеварения // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – М.2016.- №12.- С.110-114.
8. Ксенофонтов Д.А., Ксенофонтова А.А. Общебиологические закономерности в структурно-функциональной организации полостного пищеварения // Международный научно-исследовательский журнал.- №7-2 (121).- 2022.- С.115-118.
9. Пьянкова О.Б., Карпунина Т.И., Волынцев А.Б., Бачурихин В.П. Рентгеноспектральный и рентгеноструктурный анализ фаций желчи при различных видах механической желтухи // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI Веке» №11, 2012г. (Т.14) Материалы X международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке» РУДН, Москва.
10. Максимова Е.М., Наухацкий И.А., Стругацкий М.Б., Мостовой С.О. Рентгеноструктурный анализ костной ткани, легированной свинцом //Ученые записки Таврического национального университета имени В.И. Вернадского Серия «Физико-математические науки». Том 25 (64). 2012 г. № 1. С. 217-222.

УДЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДЬ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ ЕЕ СТРУКТУРЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Кузнецова Э.О., Лащенко Л.И.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. При сахарном диабете возникают патологические изменения в ткани поджелудочной железы. Произведена морфометрическая оценка. При расчете удельной площади панкреатических островков (УППО) обнаружено, что в группе контроля показатель был в 4,8 раз выше, чем у крыс с экспериментальным сахарным диабетом. Параметр «УППО» может использоваться при проведении медико-биологических исследований как достоверный показатель изменений островковой ткани при экспериментальном сахарном диабете.

Ключевые слова: сахарный диабет, панкреатический островок, морфометрия.

SPECIFIC AREA OF PANCREATIC ISLETS AS A MORPHOMETRIC CRITERION OF VALIDITY OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF DIABETES MELLITUS

Kuznetsova E. O., Laschenova L. I.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. diabetes mellitus, pathological changes occur in the pancreatic tissue. Morphometric assessment was made. When calculating the specific area of pancreatic islets, it was found that in the control group the indicator was 4.8 times higher than in rats with experimental diabetes mellitus. The parameter can be used during biomedical research as a reliable indicator of changes in islet tissue in experimental diabetes mellitus.

Keywords: diabetes mellitus, pancreatic islet, morphometry.

Введение

Сахарный диабет – группа эндокринных заболеваний, связанных с нарушением усвоения глюкозы и развивающихся вследствие абсолютной или относительной недостаточности гормона инсулина, в результате чего развивается гипергликемия. Для него характерны многочисленные осложнения, характеризующиеся тяжестью поздних стадий. Например, разнообразные нефро-, офтальмо-, кардио -, ангиопатии. В настоящее время проблема сахарного диабета среди населения очень актуальна. Данное заболевание составляет не малый процент смертности среди населения, находясь на третьем месте по этому показателю. Даже на ранних этапах развития он заметно снижает уровень жизни человека и обязывает его проходить долгий курс лечения под наблюдением врача [1]

При сахарном диабете возникают патологические изменения в ткани поджелудочной железы, поэтому изучение ее гистологической структуры представляет повышенный интерес для медицинской науки.

При гистологическом исследовании поджелудочной железы широко используются описательные методики, однако они имеют значение только для выявления наличия патологического процесса. Если требуется провести оценку степени поражения, необходимо прибегнуть к методам морфометрического анализа. Наиболее широко применяются такие показатели как площадь островковой ткани, количество островков, их диаметр [2, 3, 4, 5]

Таким образом, цель исследования – обосновать выбор морфометрического критерия для оценки гистологических изменений панкреатических островков при экспериментальном сахарном диабете.

Материалы и методы

Исследование проводилось на белых беспородных крысах-самцах. Животные были поделены на 2 группы: 1. Контроль (n=6), 2. Экспериментальный сахарный диабет (ЭСД), который моделировали введением стрептозотоцина и никотинамида (n=6). После выведения крыс из эксперимента поджелудочную железу разделяли на фрагменты, которые фиксировали в 10%-м нейтральном забуференном формалине, затем с использованием микротомы изготавливали парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окраску препаратов проводили по общепринятым гистологическим методикам (гематоксилин и эозин). При микроскопическом исследовании определяли количество панкреатических островков, площадь островков каждого среза, общую площадь срезов, удельную площадь (УП) рассчитывали, как соотношение этих двух параметров, представленное в процентах. Расчеты проводили с использованием программы Photo M. Статистическая обработка данных осуществлялась в программе Statistica 12.5 (Stat Soft Inc., USA), использовали t-критерия Стьюдента, достоверными считались различия при показателе $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В результате исследования было выявлено, что площадь панкреатических островков в группе с экспериментальной патологией оказалась несколько ниже в сравнении с контролем, также наблюдалась тенденция к уменьшению количества островков. Однако статистической достоверности не было установлено, что можно объяснить небольшим количеством животных, участвовавших в эксперименте. При расчете удельной площади островков обнаружено, что в группе контроля показатель был в 4,8 раз выше, чем у крыс с экспериментальной патологией и составил $0,43 \pm 0,16$, в то время как у животных с ЭСД – $0,09 \pm 0,02$ ($p < 0,05$).

При обычном расчете площади срезов, островков и других морфометрических параметров, исследователь сталкивается с широким диапазоном величин, т.к. их размеры и форма могут варьировать. Это может быть обусловлено как развитием различных патологических процессов (отек, склероз и др.), так и технологическими особенностями при пробоподготовке материала к гистологическому исследованию и изготовлению срезов (случайный выбор плоскости среза лаборантом-гистологом и др.).

На основании проведенного исследования можно рекомендовать использование критерия удельной площади островков как объективного параметра, отражающего степень патологических изменений ткани поджелудочной железы.

Выводы

Морфометрический параметр «удельная площадь панкреатических островков» может использоваться при проведении медико-биологических исследований как достоверный показатель изменений островковой ткани при экспериментальном сахарном диабете.

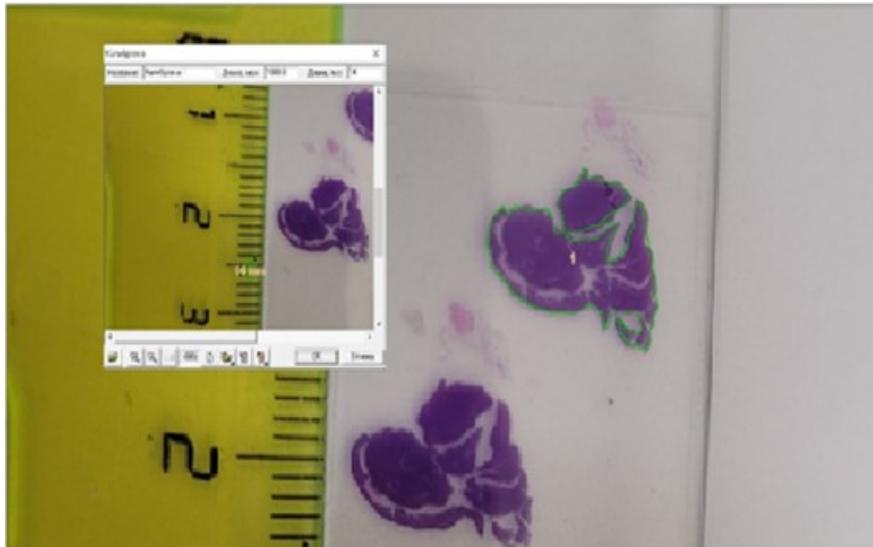


Рисунок 1 – Срезы поджелудочной железы крысы с экспериментальным сахарным диабетом.

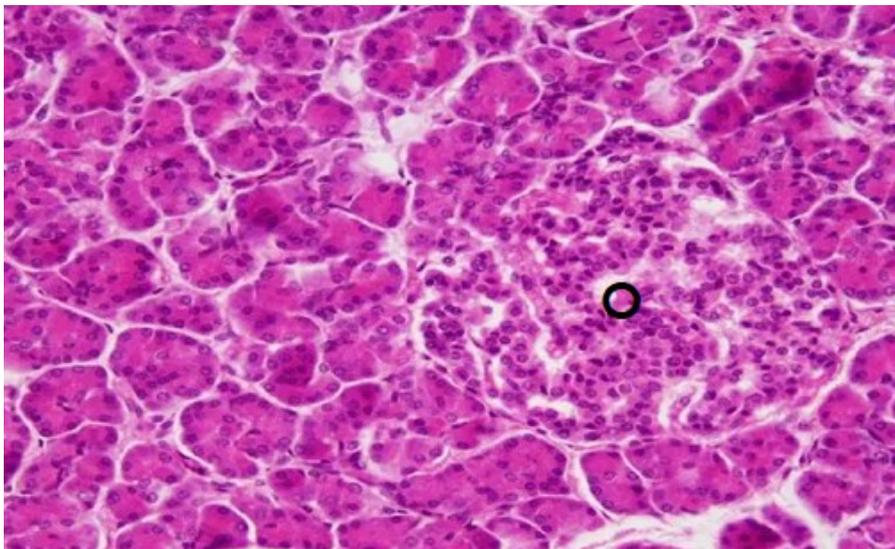


Рисунок 2 – Островок Лангерганса (O) в поджелудочной железе крысы. Увеличение: 400

Библиографический список

1. Лаврова Д.И. Сахарный диабет в России: заболеваемость, инвалидность, смертность // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 5. -№12. – С. 160-162.
2. Снигур Г.Л., Смирнов А. В. К вопросу стандартизации патогистологической диагностики сахарного диабета // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – №. 3 (35). – С.112-115.

3. Шидаков Ю.М., Шарова Е. В., Абдумаликова И. А. Морфофункциональная характеристика поджелудочной железы крыс при экспериментальной гипергликемии пищевым сахаром // Бюллетень науки и практики. – 2020. – Т. 6. – №. 5.- С. 89-95.
4. Bonifacio M. et al. Effects of photobiomodulation on glucose homeostasis and morphometric parameters in pancreatic islets of diabetic mice //Lasers in Medical Science. – 2021. – С. 1-11.
5. Можейко Л.А., Беленинова А. С. Морфофункциональная оценка эндокринного аппарата поджелудочной железы потомства крыс, родившихся в условиях холестаза // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2011. – №. 1 (33). – С. 46-48.
6. Целуйко С.С. и др. Морфофункциональная характеристика поджелудочной железы и легкого при экспериментальной гипергликемии на фоне применения дигидрокверцетина. – 2017, 147 с.

ВКЛАД МЕЛАТОНИНА В ФОРМИРОВАНИЕ Т-ХЕЛПЕРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МАРКЕРЫ TH17/TREG

Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В.

Институт экологии и генетики микроорганизмов Уральского отделения Российской академии наук – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Исследованы эффекты гормона мелатонина в отношении субпопуляций Th17, Treg и клеток с промежуточным фенотипом. Мелатонин в концентрации, соответствующей его уровню в периферической крови при фармакологическом использовании, стимулировал дифференцировку Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих ROR γ t/FoxP3, уровень же классических CD4⁺FoxP3⁺Т-клеток снижался. Связанный с этим сдвиг баланса Th17/Treg в направлении Th17 может вносить вклад в развитие воспаления при различных патологических ситуациях.

Ключевые слова: мелатонин, мелатониновые рецепторы, Th17, Treg, ROR γ t⁺/FoxP3⁺ Т-клетки.

MELATONIN CONTRIBUTION IN THE FORMATION OF T HELPER SUBPOPULATIONS CO-EXPRESSING TH17/TREG MARKERS

Kuklina E.M., Glebezdina N.S., Nekrasova I.V.

Perm Federal Research Center, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation

Abstract. Melatonin influence on level of Th17, Treg and cells with an intermediate phenotype were studied. Melatonin at a concentration corresponding to its level in peripheral blood during pharmacological usage stimulated the differentiation of T lymphocytes co-expressing ROR γ t/FoxP3, while the amount of classical CD4⁺FoxP3⁺ T cells were decreased. The associated shift in Th17/Treg balance towards Th17 may contribute to inflammation development in various pathological situations.

Keywords: melatonin, melatonin receptors, Th17, Treg, ROR γ t⁺FoxP3⁺ T cells.

Один из основных гормонов эпифиза мелатонин является важнейшим компонентом нейроэндокринной системы [1, 2]. Кроме этого, гормон проявляет и иммунорегуляторную активность [2, 3]. Так, мелатонин способен эффективно регулировать клетки иммунной системы, в частности, Т-хелперы, продуцирующие интерлейкин-17 (Th17), и регуляторные Т-клетки (Treg). Данные субпопуляции экспрессируют рецепторы для мелатонина – как мембранные (MT1/MT2), так и внутриклеточный (ROR α), и находятся под непосредственным контролем гормона [4-8]. Th17 инициируют воспалительные, аутоиммунные реакции, реакции отторжения трансплантата, играют особое значение в борьбе с экстраклеточными патогенами

[9-11]. Treg же, выполняя реципрокные функции, активно поддерживают иммунологическую аутоотолерантность, секретируя иммуносупрессивные цитокины, ответственны за гипореактивность к опухолевым антигенам и за индукцию толерантности к трансплантату [12-15]. Однако данные субпопуляции крайне неоднородны и обладают высокой пластичностью. Так, дифференцированные Th17 способны трансформироваться в $IFN\gamma^+Th17^+$ -клетки, так называемые Th17/Th1-клетки [16], или в Treg [17], тогда как регуляторные Т-лимфоциты при поляризующих условиях трансдифференцируются в IL-17-продуцирующие клетки [18, 19]. Этот потенциал наделяет их многочисленными и противоположными функциями, что позволяет им вызывать качественно различные реакции в зависимости от условий микроокружения [20]. Механизмы пластичности наивных и зрелых клеточных популяций в полной мере не изучены, но этот процесс очень важен, поскольку именно неклассическим популяциям Th17/Treg отводят в настоящее время ведущую роль в патогенезе различных заболеваний. Целью данной работы была оценка вклада мелатонина в формирование промежуточных форм Т-хелперных субпопуляций Th17 и Treg.

Объектами исследования служили лейкоциты здоровых небеременных женщин (n=10). От всех доноров получено информированное согласие на участие в исследовании. Лейкоциты выделяли из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фикола-верографина (1,077 г/см³, “Pharmacia”, Швеция). Из суспензии мононуклеарных клеток получали Treg методом иммуномагнитной сепарации (“R&D Systems”, США), которые (1·10⁶ клеток/мл) культивировали 48 часов в среде RPMI 1640 (“Gibco. Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (“Serva”, Германия), 1 mM HEPES (“Sigma-Aldrich”, США), 2 mM L-глутамин (“Serva”, Германия) и 40 ед/мл гентамицина (“Pharmacia”, Швеция), при 37° С и 5% CO₂ – без активатора (спонтанный вариант) и в условиях поликлональной активации (система для активации на основе моноклональных антител к CD3/CD28, “Invitrogen”, США). Экспрессия клетками транскрипционных факторов ROR γ t (маркера дифференцировки Th17) и FOXP3 (маркера Treg), а также внутриклеточного IL-17 определялась по окончании 48-часового культивирования проточной цитометрией с использованием моноклональных антител (“Biolegend”, “Novus Biologicals”, “R&D Systems”, США) по стандартной методике. Мелатонин (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрациях 0,5 и 5 нг/мл, соответствующих фармакологическим уровням гормона в крови [21], вносили в культуру за 30 минут до активации. Вклад мембранных мелатониновых рецепторов в реализацию эффектов гормона определяли с использованием соответствующих антагонистов – неселективного (лузиндол – для MT1/MT2) и селективного (4-P-PDOT – для MT2), оба “Tocris Bioscience”, США [22]. Их вносили в интактную и стимулированную (CD3/CD28) культуру Treg за час до активации. Статистический анализ проводили с использованием парного *t*-критерия Стьюдента.

В результате проведенных исследований *in vitro* мы обнаружили, что в присутствии мелатонина в культуре интактных лимфоцитов содержание классических Treg (CD4⁺FoxP3⁺T-клеток) снижалось (процент CD4⁺FoxP3⁺T-клеток: 6,26 ± 0,871 – контроль, 3,38 ± 0,725 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, *p* < 0,05; 4,47 ± 0,926 – на фоне 5 нг/мл мелатонина, *p* > 0,05). В условиях поликлональной активации изменений не выявлено. При этом супрессивный эффект гормона в отношении классических Treg отменялся при блокаде мембранных рецепторов для мелатонина (процент CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, спонтанный вариант: 4,51 ± 0,847 – на фоне лузиндола, 3,81 ± 0,648 – на фоне лузиндола и 0,5 нг/мл мелатонина, *p* > 0,05; 4,85 ± 1,05 – на фоне 4-P-PDOT, 4,35 ± 0,753 – на фоне 4-P-PDOT и 0,5 нг/мл мелатонина, *p* > 0,05). В

отношении классической субпопуляции Th17 (CD4⁺RORγt⁺T-клеток) статистически значимого действия мелатонина не выявлено, хотя также имеется тенденция к снижению. Тем не менее, баланс CD4⁺RORγt⁺/CD4⁺FoxP3⁺T-клеток на фоне гормона сдвигается в направлении Th17 (соотношение CD4⁺RORγt⁺/CD4⁺FoxP3⁺ T-клеток: 0,334 ± 0,054 – контроль, 0,589 ± 0,15 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p = 0,05$, 0,516 ± 0,142 – на фоне 5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Этот эффект подтверждается и ростом соотношения уровня экспрессии соответствующих транскрипционных факторов в клетке (MFI RORγt/MFI FoxP3, спонтанный вариант: 0,615 ± 0,103 – контроль, 1,01 ± 0,260 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$; 1,07 ± 0,202 – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$).

Важно отметить, что в культуре интактных T-лимфоцитов мелатонин в фармакологической концентрации 0,5 нг/мл вызывает появление заметной фракции CD4⁺T-клеток с промежуточным фенотипом – коэкспрессирующих RORγt/FoxP3 (процент CD4⁺RORγt⁺ FoxP3⁺ T-клеток, спонтанный вариант: 0,538 ± 0,084 – контроль, 2,24 ± 0,647 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$; 1,35 ± 0,482 – на фоне 5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Более того, соотношение уровней экспрессии транскрипционных факторов RORγt/FoxP3 в таких клетках повышено на фоне гормона (MFI RORγt/MFI FoxP3 в CD4⁺RORγt⁺FoxP3⁺ T-клетках, спонтанный вариант: 0,514 ± 0,078 – контроль, 1,26 ± 0,339 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p < 0,05$; 0,463 ± 0,062 – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Данный эффект подтверждается также присутствием в соответствующих пробах IL-17-продуцирующих лимфоцитов, несущих маркер регуляторных клеток FoxP3, и тенденцией к повышению уровня этих клеток на фоне мелатонина (процент CD4⁺IL-17⁺FoxP3⁺T-клеток, спонтанный вариант, $n = 4$: 0,723 ± 0,161 – контроль, 3,24 ± 0,941 – на фоне 0,5 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$; 1,67 ± 0,441 – на фоне 5,0 нг/мл мелатонина, $p > 0,05$). Строго говоря, такая неклассическая субпопуляция может быть результатом как редифференцировки Treg или Th17 [23], так и первичной дифференцировки наивных CD4⁺T-клеток, также присутствующих в культуре, однако, учитывая показанное выше мелатонин-зависимое снижение уровня CD4⁺FoxP3⁺T-клеток, речь идет, по-видимому, о первом варианте, то есть о приобретении регуляторными T-клетками маркеров и свойств провоспалительной субпопуляции Th17.

В целом, данные, полученные *in vitro*, указывают на способность экзогенного мелатонина в концентрации, соответствующей его уровню в периферической крови при фармакологическом использовании, стимулировать дифференцировку T-лимфоцитов с промежуточным фенотипом, коэкспрессирующих маркеры T-хелперных субпопуляций Th17/Treg. Различие по величине эффектов гормона в отношении классических субпопуляций Th17/Treg в итоге приводит к сдвигу баланса в направлении провоспалительной субпопуляции Th17, что может вносить вклад в развитие воспаления при различных патологических ситуациях.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-25-20121.

Библиографический список

1. Macchi M.M., Bruce J.N. Human pineal physiology and functional significance of melatonin // Front Neuroendocrinol. – 2004. – V. 25 (3-4). – P. 177-195.

2. Hardeland R., Cardinali D.P., Srinivasan V., Spence D.W., Brown G.M., Pandi-Perumal S.R. Melatonin – A pleiotropic, orchestrating regulator molecule // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – V. 93 (3). – P. 350-384.
3. Mahmood D. Pleiotropic Effects of Melatonin // *Drug. Res (Stuttg).* – 2019. – V. 69 (02). – P. 65-74.
4. Pandi-Perumal S.R., Trakht I., Srinivasan V., Spence D.W., Maestroni G.J., Zisapel N., Cardinali D.P. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways // *Prog. Neurobiol.* – 2008. – V. 85 (3). – P. 335-353.
5. Slominski R.M., Reiter R.J., Schlabritz-Loutsevitch N., Ostrom R.S., Slominski A.T. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions // *Mol. Cell. Endocrinol.* – 2012. – V. 351. – № 2. – P. 152–166.
6. Kuklina E.M. Melatonin as potential inducer of Th17 cell differentiation // *Med. Hypotheses.* 2014. – V. 83 (3). – P. 404-406.
7. Куклина Е.М., Глебздина Н.С., Некрасова И.В. Роль мелатонина в контроле дифференцировки Т-лимфоцитов, продуцирующих IL-17 (Th17) // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2015. – Т. 160 (11). – С. 604-607.
8. Глебздина Н.С., Олина А.А., Некрасова И.В., Куклина Е.М. Молекулярные механизмы контроля дифференцировки регуляторных Т-лимфоцитов экзогенным мелатонином // *Доклады Академии наук.* – 2019. – Т. 484 (2). – С. 224-227.
9. Maddur M.S., Miossec P., Kaveri S.V., Bayry J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies // *Am. J. Pathol.* – 2012. – V.181. – P. 8-18.
10. Lee S.K., Kim J.Y., Lee M., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2012. – V. 67. – P. 311–318.
11. Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S. Circulating and Decidual Th17 Cell Levels in Healthy Pregnancy // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2010. – V. 63. – P. 104–109.
12. Prado D.S., Cattley R.T., Shipman C.W., Happe C., Lee M., Boggess W.C., MacDonald M.L., Hawse W.F. Synergistic and additive interactions between receptor signaling networks drive the regulatory T cell versus T helper 17 cell fate choice // *J. Biol. Chem.* – 2021. – V. 297 (6). – P. 101330.
13. Kanamori M., Nakatsukasa H., Okada M., Lu Q., Yoshimura A. Induced Regulatory T Cells: Their Development, Stability, and Applications // *Trends Immunol.* – 2016. – V. 37 (11). – P. 803–811.
14. Jeffery H.C., Braitch M.K., Brown S., Oo Y.H. Clinical Potential of Regulatory T Cell Therapy in Liver Diseases: An Overview and Current Perspectives // *Front. Immunol.* – 2016. – V. 7. – P. 334.
15. Shevryev D., Tereshchenko V. Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis // *Front. Immunol.* – 2020. – V. 10. – P. 3100.
16. Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Th17 cells: new players in asthma pathogenesis // *Allergy.* – 2011. – V. 66 (8). – P. 989-998.
17. Gagliani N., Amezcua Vesely M.C., Iseppon A. et al. Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation // *Nature.* – 2015. – V. 523 (7559). – P. 221-225.
18. Koenen H.J., Smeets R.L., Vink P.M., van Rijssen E., Boots A.M., Joosten I. Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells // *Blood.* – 2008. – V. 112 (6). – P. 2340-2352.
19. Komatsu N., Okamoto K., Sawa S. Pathogenic conversion of Foxp3⁺ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis // *Nat. Med.* – 2014. – V. 20 (1). – P. 62-68.

20. Guery L., Hugues S. Th17 cell plasticity and functions in cancer immunity // *Biomed. Res. Int.* – 2015. – V. 2015. – P. 314620.
21. Gooneratne N.S., Edwards A.Y., Zhou C., Cuellar N., Grandner M.A., Barrett J.S. Melatonin pharmacokinetics following two different oral surge-sustained release doses in older adults // *J. Pineal. Res.* – 2012. – V. 52 (4). – P. 437-445.
22. Cecon E., Oishi A., Jockers R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signaling in the context of system bias // *Br. J. Pharmacol.* – 2018. – V. 175 (16). – P. 3263-3280.
23. Yazdani M.R., Khosropanah S., Doroudchi M. Interleukin-17 production by CD4⁺CD45RO⁺Foxp3⁺ T cells in peripheral blood of patients with atherosclerosis // *Arch. Med. Sci. Atheroscler. Dis.* – 2019. – V. 4. – e215-e224.

НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА НЕЙРОНЫ ГАНГЛИЕВ ЗАДНИХ КОРЕШКОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СДАВЛИВАНИЕМ

Куницына А. Е.¹, Калюжная Ю.Н.¹, Питинова М.А.¹, Силачев Д.Н.², Демьяненко С.В.¹

¹ Южный Федеральный Университет, Ростов-на-Дону, Россия.

² ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», Москва, Россия

Аннотация. В данном исследовании изучена эффективность регенерации периферических нервов при применении гелевого препарата внеклеточных везикул мультипотентных мезенхимальных клеток, для чего была разработана модель повреждения путем сдавливания седалищного нерва крыс. Выводы об эффективности препарата получены на основе зафиксированного повышения содержания NF, GAP-43 и βIII-тубулина. Полученные результаты открывают перспективы для создания методов терапии нейротравм.

Ключевые слова: аксотомия, везикулы, нейротравма.

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF HUMAN MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELL-DERIVED EXTRACELLULAR VESICLES ON RAT DORSAL ROOT GANGLIA NEURONS AFTER CRUSH INJURY

Anastasia E. Kunitsyna¹, Yulia N. Kalyuzhnaya¹, Maria A. Pitinova¹, Denis N. Silachev², Svetlana V. Demyanenko¹

¹Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

² V.I. Kulakov National medical research center for obstetrics, gynecology and perinatology, Moscow, Russia

Abstract. This study estimates the effectiveness of peripheral nerve regeneration using a gel preparation of multipotent mesenchymal cell-derived extracellular vesicles on a specially developed model of sciatic nerve crush injury in rats. The regenerative effects of the vesicle preparation were indicated by an increase in the content of NF, GAP-43, and βIII-tubulin in the nervous cells. The obtained results open up opportunities for the development of new neurotrauma treatment methods.

Keywords: Axotomy, vesicles, neurotrauma.

Известно, что повреждение нерва характеризуется снижением содержания в нем белков нейрофиламентов (NF) и нарушением распределения белков цитоскелета, поэтому их иммуногистохимическое определение широко используется для изучения регенерации поврежденных периферических нервов [1]. Еще один фактор регенерации – GAP-43 представляет собой нейрональный белок, локализованный в аксонах, помогающий им правильно расти и разветвляться в ходе развития и регенерации, что делает его маркером регенерации аксонов после травматического повреждения [2]. Показано, что увеличение

экспрессии GAP-43 при повреждении нервов также коррелирует с увеличением количества и скорости доставки бета-III-тубулина к аксонам регенерирующих нейронов [3]. Именно поэтому нами было рассмотрено влияние препарата везикул на уровень всех этих маркеров регенерации.

Сами же внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой часть цитоплазмы, заключенную в мембрану и содержащую различные компоненты: цитозольные белки, мембранные протеины, мРНК и т. д. [4]. Разнообразие их функций и способность доставлять различные молекулы делают их потенциально интересными для разработки новых типов лекарств для терапии патологий нервной системы. Тем не менее производство, расчет дозировок и задача доставки везикул в конкретные области все еще создают проблемы для развития широкого применения ВВ в медицине [5]. Поэтому имеет большое значение не только рассмотрение эффектов ВВ на нервные клетки, но и пригодных для практического их применения носителей.

Повреждение седалищного нерва у крыс считается лучшей моделью для изучения регенерации периферических нервов, что обусловлено схожестью анатомии нервных стволов у людей и крыс [6]. Используемая методика сдавливания седалищных нервов взрослых белых крыс-самцов линии Wistar предполагает такую степень повреждения нерва, при которой возможно повторное восстановление утраченных связей.

Для внесения ВВ использовали коллагеновый гель, который наносили непосредственно на участок повреждения седалищного нерва во время проведения операции по сдавливанию. Через 15 и 30 суток после одностороннего сдавливания правого седалищного нерва проводили забор материала (4 и 5 спинномозговые ганглии и поврежденный участок нерва). Из замороженных образцов на криотоме (Leica CM1850, Германия) изготавливались срезы толщиной 40 мкм и помещались в раствор 30% сахарозы для последующего исследования. Срезы после промывания от сахарозы в PBS инкубировали 1 час при комнатной температуре с 5% BSA и 0,3% тритоном X-100 для блокирования сайтов неспецифического связывания. Затем инкубировали с первичными кроличьими антителами (все Sigma-Aldrich): анти-нейрофиламент-200 (N4142), анти-GAP-43 (SAB4300525) и анти-βIII-тубулин (T2200) в разведении 1:500 и с мышинными антителами против нейроспецифического ядерного белка NeuN (MAB377) в разведении 1:500 в течение ночи при 4 °С. После трехкратного промывания в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами анти-кроличьи IgG (H+L), CF™ 488A (SAB4600045; 1:1000), анти-мышинные IgG1 (γ1) и CF™555 (SAB4600302; 1:1000). Ядра клеток визуализировали с помощью Hoechst 33342 (40 мкм; 10 мин). Срезы помещали в 60% глицерин и исследовали на микроскопе Olympus BX-51, оснащенном цифровой камерой OrcaFlash 4.0 V3 (Hamamatsu, Япония).

Данные измерений нормировали на интенсивность фоновой флуоресценции. Все значения представлены как среднее (M) ± стандартная ошибка (SEM). Для представленных результатов значимость межгрупповых различий оценивалась с использованием однофакторного дисперсионного анализа с критерием Тьюки. Статистический анализ и построение графиков выполняли с использованием программного обеспечения SigmaPlot v12.5 (Systat Software, Сан-Хосе, Калифорния, США).

Статистически значимое снижение уровня NF-200 на 23% ($p < 0,05$) по сравнению с группой без повреждения (Intact) наблюдалось в ганглиях через 15 дней после сдавливания седалищного нерва и применения чистого коллагенового геля (Crush+Col). Особых различий между группой со сдавленным нервом совсем без геля (Crush) и группой, получившей гель без везикул, как через 15, так и через 30 дней после травмы не было. Использование препарата

(Col-V) способствовало увеличению уровня белка на 64% ($p < 0,05$) через 15 дней и на 52% ($p < 0,05$) через 30 дней по сравнению с группами, получавшими гель без везикул (Рисунок 1).

При осмотре фрагмента нерва на расстоянии 0,5–1 см от места повреждения выявлено 40% ($p < 0,05$) снижение уровня NF-200 через 15 дней в группе без применения геля и на 37% ($p < 0,05$) – в группе с нанесенным коллагеновым гелем без везикул по сравнению с интактными нервами. Низкий уровень NF-200 в ткани седалищного нерва сохранялся даже через 30 дней после раздавливания. Применение геля, содержащего везикулы, через 15 дней после операции повышало уровень NF-200 на 42% ($p < 0,05$) и через 30 дней на 43% ($p < 0,05$) по сравнению с применением геля без везикул (Рисунок 1).

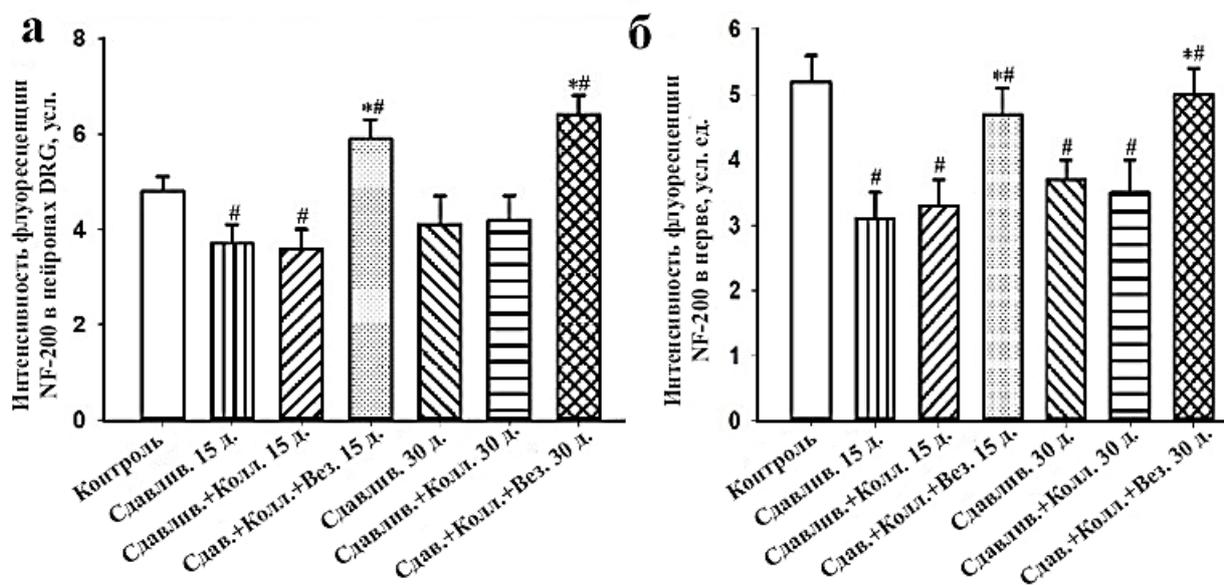


Рисунок 1 – (а) Относительная интенсивность флуоресценции NF-200 в нейронах DRG в разные сроки после раздавливания (15 и 30 дней), без и с применением препарата везикул. (б) Относительная интенсивность флуоресценции NF-200 в седалищном нерве.

Статистически значимое повышение содержания белка GAP-43 на 96,3% ($p \leq 0,05$) после применения препарата по отношению к группе с коллагеновым гелем наблюдалось в ганглиях через 15 дней. Не наблюдалось изменений уровня белка через 30 дней после повреждения нерва и применения препарата, содержащего везикулы, по отношению к группам с применением чистого коллагенового геля или контролем (Рисунок 2).

Экспрессия β -III-тубулина в ганглиях через 15 дней после нанесения везикул на раздавленный участок не изменилась по сравнению с контрольными группами. Установлено статистически значимое снижение уровня β -III-тубулина на 34,7% ($p \leq 0,05$) при применении препарата относительно группы с применением простого коллагенового геля и на 32% ($p \leq 0,05$) по сравнению с контрольной группой через 30 дней после сдавливания (Рисунок 3).

Однако уровень β -III-тубулина на расстоянии около 1 см от места повреждения повышался на 53% ($p \leq 0,05$) через 15 дней после передавливания нерва и применения препарата везикул по сравнению с группой, получавшей коллагеновый гель, их не содержащий. Через 30 дней после сдавливания нерва достоверных различий в уровне β -III-тубулина в зоне повреждения седалищного нерва, где наносился препарат, по сравнению с контрольной группой и с гелем, не содержащим везикул, не было (Рисунок 3).

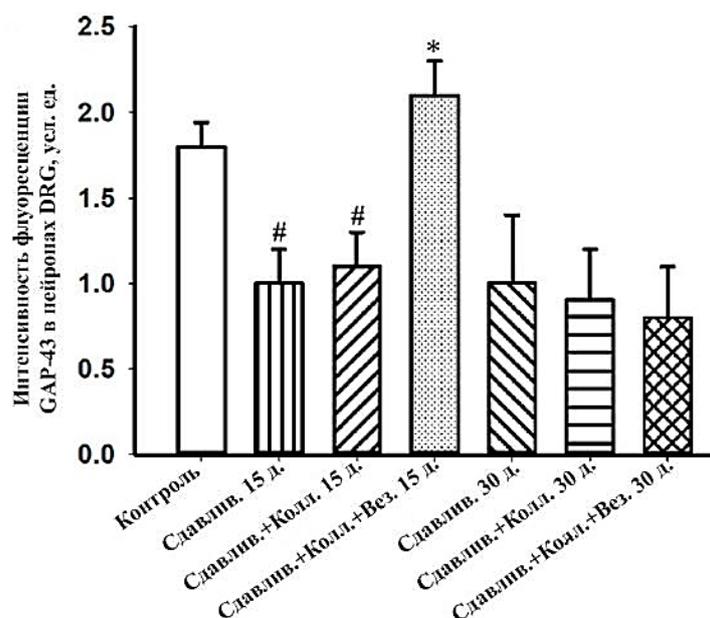


Рисунок 2 – Относительная интенсивность флуоресценции GAP-43 в нейронах ДРГ в разное время после раздавливания, с применением препарата везикул и без него.

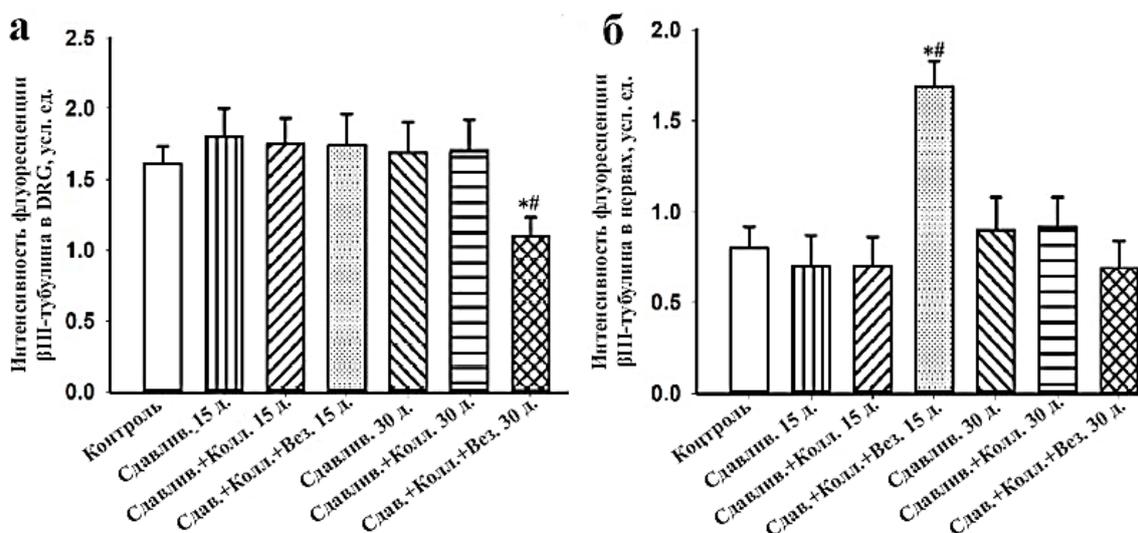


Рисунок 3 – (а) Относительная интенсивность флуоресценции β -III-тубулина в DRG крыс в разные сроки после раздавливания, с обработкой везикулами и без нее. (б) Относительная интенсивность флуоресценции β -III-тубулина в нерве на расстоянии 0,5–1 см от места повреждения в разные сроки после раздавливания, с обработкой везикулами и без нее.

Таким образом, исследования показали, что через 30 дней ВВ повышали синтез NF-200 в нейронах DRG более чем на 60% по сравнению с группой без лечения, а увеличивающийся к 30 дню после применения препарата уровень NF-200 указывает на формирование зрелых миелинизированных аксонов уже в месте регенерации нерва.

Белок GAP-43 чаще всего используется исследователями в качестве маркера регенерации. Полученные результаты показали, что через 15 дней уровень синтеза GAP-43 увеличился почти на 97% по сравнению с группой без лечения, что является признаком

высокой интенсивности роста аксонов, но к 30 дню изменений в любой из трех групп уже не обнаружилось. Это может свидетельствовать об истощении терапевтического потенциала ВВ.

Это также косвенно подтверждается данными с β -III-тубулином – белком, который содержится в повышенных количествах именно в отростках нейронов. Это структурный белок нейротрубочек, и одной из его функций в нейронах является осуществление аксонального транспорта. Высокое содержание β -III-тубулина наблюдалось вблизи поврежденного участка в нервах на 15 сутки после сдавливания и применения препарата. Последующее снижение его синтеза в ганглиозных тканях и нервах на 30 сутки после начала лечения, может также косвенно свидетельствовать о снижении роста аксонов и замедлении регенерации.

Следует отметить, что в качестве способа доставки внеклеточных везикул был использован коллагеновый гель, который не является биологически нейтральным и может оказывать собственное терапевтическое действие. Действительно, по некоторым оцениваемым параметрам был замечен умеренно выраженный положительный эффект на регенерацию от одного только коллагенового геля. Этот факт можно объяснить несколькими механизмами. Однако, несмотря на это, нейропротекторный эффект в группах с применением препарата везикул был более выражен, чем в группах, получавших только коллагеновый гель. Таким образом, полученные данные однозначно свидетельствуют об эффективности ВВ в процессах восстановления периферических нервов на ранних стадиях (15–30 дней) развития патологии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (проект № 0852-2020-0028).

Библиографический список

1. Zhang W., Li Z. The effects of target skeletal muscle cells on dorsal root ganglion neuronal outgrowth and migration in vitro // *PLoS One*. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. e52849.
2. Murata R. et al. Extracorporeal shockwaves induce the expression of ATF3 and GAP-43 in rat dorsal root ganglion neurons // *Autonomic Neuroscience*. – 2006. – Т. 128. – №. 1-2. – С. 96-100.
3. Moskowitz P. F., Oblinger M. M. Sensory neurons selectively upregulate synthesis and transport of the beta III-tubulin protein during axonal regeneration // *Journal of Neuroscience*. – 1995. – Т. 15. – №. 2. – С. 1545-1555.
4. Iraci N. et al. Extracellular vesicles are independent metabolic units with asparaginase activity // *Nature chemical biology*. – 2017. – Т. 13. – №. 9. – С. 951-955.
5. Hercher D., Nguyen M. Q., Dworak H. Extracellular vesicles and their role in peripheral nerve regeneration // *Experimental neurology*. – 2021. – С. 113968.
6. Geuna S. The sciatic nerve injury model in pre-clinical research // *Journal of neuroscience methods*. – 2015. – Т. 243. – С. 39-46.

ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ мРНК GFP И РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЕЕ ДОСТАВКИ

Литвинова В.Р.¹, Рудомётов А.П.¹, Шарабрин С.В.¹, Рудомётова Н.Б.¹, Новопашина Д.С.², Карпенко Л.И.¹, Ильичёв А.А.¹

¹ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск

Аннотация. Вакцины на основе мРНК представляют собой новый подход к созданию вакцин. Важными этапами в разработке мРНК-вакцин являются повышение их стабильности и эффективности доставки в клетки-мишени. В работе было изучено, как оптимизация нетранслируемых областей и включение в состав мРНК химически модифицированных нуклеотидов влияют на эффективность ее трансляции. Также была отработана методика анализа проникновения мРНК в клетки с помощью олигонуклеотидных зондов с флуоресцентной меткой.

Ключевые слова: РНК, мРНК-вакцины, модификации мРНК, химически модифицированные нуклеотиды, оптимизированные нетранслируемые области.

OPTIMIZATION OF GFP mRNA STRUCTURE AND DEVELOPMENT OF METHODS FOR EFFICIENCY ANALYSIS OF ITS DELIVERY

Litvinova Viktoriia R.¹, Rudometov Andrey P.¹, Sharabrin Sergey V.¹, Rudometova Nadezhda B.¹, Novopashina Darya S.², Karpenko Larisa I.¹, Ilyichev Alexander A.¹

¹Vector State Research Center of Virology and Biotechnology, Koltsovo, Novosibirsk oblast, Russia

²Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

Abstract: mRNA-based vaccines represent a new approach to vaccine development. Important steps in the development of mRNA vaccines include the increasing of their stability and efficiency of delivery to target cells. In this work, we studied how the optimization of untranslated regions and the inclusion of chemically modified nucleotides in mRNA affect the efficiency of its translation. A technique for analyzing the penetration of mRNA into cells using oligonucleotide probes with a fluorescent label was also developed.

Keywords: RNA, mRNA vaccines, mRNA modifications, chemically modified nucleotides, optimized untranslated regions.

Введение

Вакцинация – это наиболее эффективный метод предотвращения инфекционных заболеваний. Вакцины на основе мРНК имеют ряд преимуществ перед другими типами вакцин. В отличие от традиционных вакцин, при введении мРНК в организм отсутствует потенциальный риск заражения вакцинируемого, т.к. мРНК кодирует только целевой иммуноген. Также действие мРНК происходит в цитозоле клетки, поэтому вероятность интеграции в геном хозяина крайне низка. мРНК-вакцины способны индуцировать специфические клеточный и гуморальный иммунные ответы, но не вызывают антивекторного ответа [1]. Важным достоинством мРНК-вакцин является их быстрое, недорогое, масштабируемое и однотипное производство, которое обеспечивает высокие выходы целевого продукта в условиях *in vitro* [2,3].

Зрелая мРНК эукариот состоит из пяти основных частей, которые включают в себя структуру кэпа на 5'-конце, 5'-нетранслируемую область (5'-UTR), открытую рамку считывания (ORF), 3'-нетранслируемую область (3'-UTR) и 3'-хвост из 100-250 аденозиновых остатков (поли(А)-хвост) [4]. Каждый из этих элементов играет важную роль в процессе трансляции мРНК. Их можно модифицировать с целью обеспечения наибольшей эффективности трансляции мРНК *in vivo*.

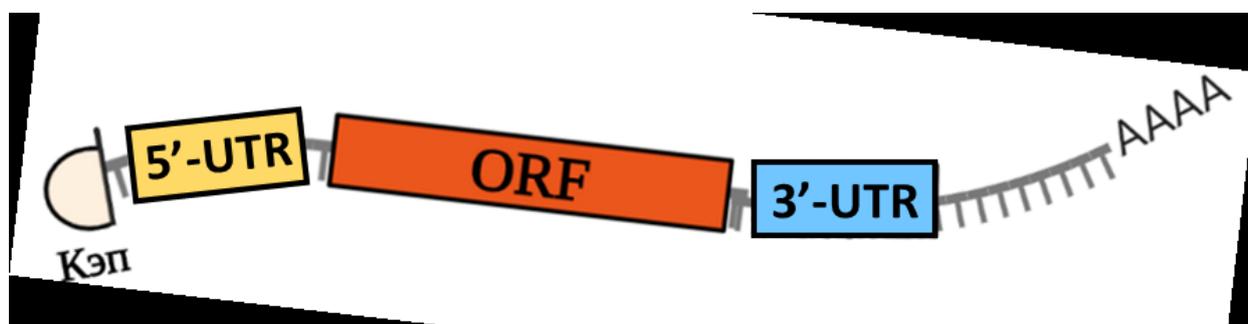


Рисунок 1 – Структура мРНК эукариот. На рисунке представлены: кэп, 5'-UTR – 5'-нетранслируемая область, 3'-UTR – 3'-нетранслируемая область, ORF – открытая рамка считывания и поли(А)-хвост.

Цель работы состояла в оптимизации структуры мРНК с помощью включения в ее состав химически модифицированных нуклеотидов и подбора нетранслируемых областей и разработке метода анализа эффективности ее доставки в клетки.

Результаты и обсуждение

Известно, что вводимая в организм мРНК может вызывать нежелательный врожденный иммунный ответ из-за взаимодействия с рецепторами распознавания образов (PRR), включая Toll-подобные рецепторы (TLR) [5]. Чтобы избежать этого, можно включать в состав мРНК модифицированные нуклеозиды, такие как псевдоуридин, N1-метил-псевдоуридин, 2-тиоуридин, 5-метилцитидин, 6-метиладенозин, инозин и 2'-О-метилированные нуклеозиды [6]. В нашей работе для исследования были выбраны такие модифицированные нуклеозиды, как псевдоуридин и N1-метил-псевдоуридин, и проанализировано их влияние на эффективность трансляции мРНК GFP на эукариотических клетках HEK293.

На рисунке 2 приведены микрофотографии клеток HEK293. При синтезе РНК использовались смеси нуклеотидов с уридином, со 100 % заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин, со 100 % заменой уридина на псевдоуридин. Также в качестве контроля проводили трансфекцию клеток плазмидой pHMGFP.

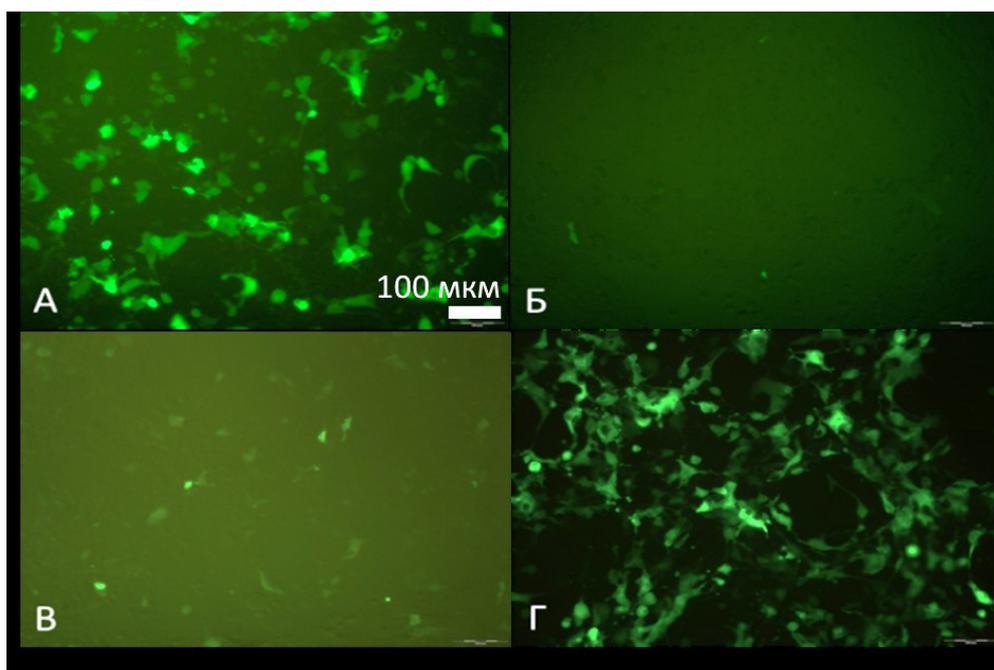


Рисунок 2 – Микрофотография клеток HEK293. А – клетки HEK293, трансфицированные плазмидой rhMGFP; Б – клетки HEK293, трансфицированные мРНК GFP с уридином; В – клетки HEK293, трансфицированные мРНК GFP с псевдоуридином; Г – клетки HEK293, трансфицированные мРНК GFP с N1-метилпсевдоуридином.

Наиболее интенсивное свечение зеленого флуоресцентного белка (GFP) в клетках наблюдалось в случае использования смеси нуклеотидов со 100 % заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин, поэтому данный нуклеотидный состав был выбран как наиболее эффективный.

Также важную роль в обеспечении эффективности трансляции играют нетранслируемые последовательности (UTR), фланкирующие кодирующую область с 5'- и 3'-стороны. Основная биологическая функция UTR заключается в регуляции посттранскрипционной экспрессии генов: 5'-UTR в значительной степени влияет на инициацию трансляции, 3'-UTR играет важную роль в стабилизации мРНК. Большинство UTR содержат специфические последовательности, которые могут связываться с различными регуляторными белками, запуская инициацию или ингибирование процесса трансляции. Также на эффективность трансляции влияют вторичные структуры и длина UTR [7,8].

Один из подходов к повышению эффективности трансляции и стабильности мРНК в клетках заключается во включении в их состав 5'- и 3'-UTR из высокоэкспрессируемых и стабильных мРНК известных генов [9]. Например, включение специфических последовательностей мРНК α -глобина или β -глобина человека (или 2 копий 3'-UTR в тандеме гена β -глобина человека [10]) увеличивает стабильность мРНК и продолжительность продукции белка, соответственно [11].

Итак, в ходе нашей работы с помощью модели мРНК GFP были выбраны конструкции с оптимизированными 5'- и 3'-нетранслируемыми областями, обеспечивающие наиболее эффективную продукцию белка GFP в эукариотических клетках. Конструкция Cassette1 содержала последовательности нетранслируемых областей гена α -глобина человека, Cassette2 – последовательности UTR α -цепи цитохрома b-245 (CYBA), Cassette3 – последовательности UTR β -глобина человека. На рисунке 3 представлены микрофотографии клеток HEK293,

трансфицированных мРНК с различными 5'- и 3'-нетранслируемыми областями в составе Cassette1, 2 и 3. В качестве контроля проводили трансфекцию клеток мРНК, полученной с матрицы pHMGFP.

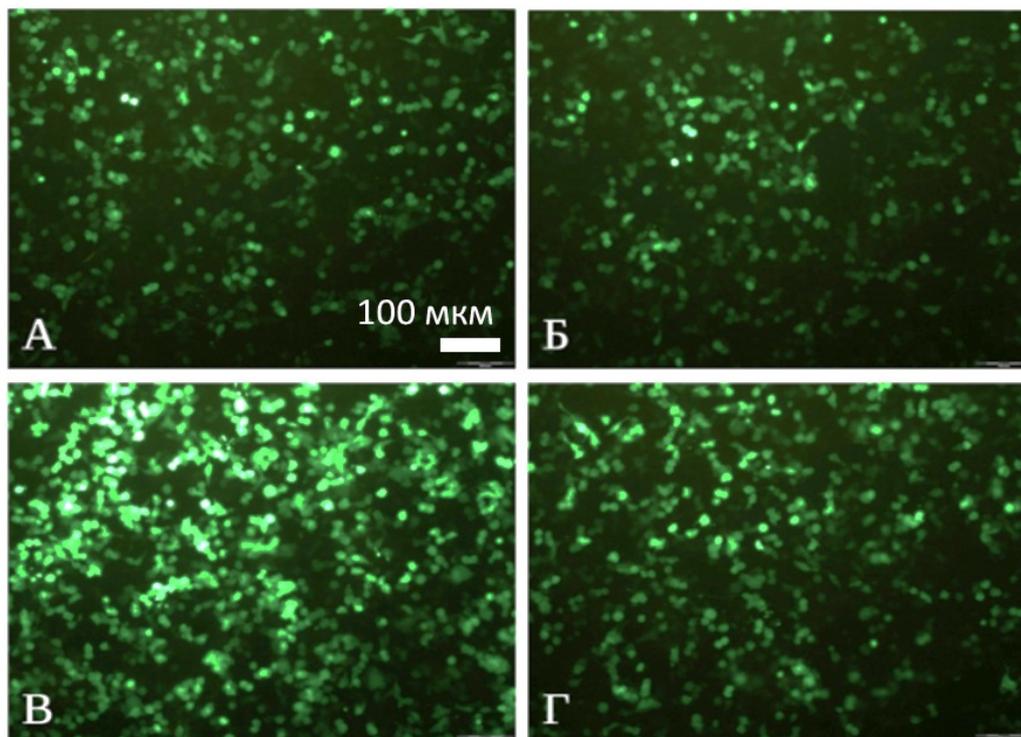


Рисунок 3 – Микрофотография клеток HEK293. А – клетки HEK293, трансфицированные мРНК Cassette1+GFP, Б – клетки HEK293, трансфицированные мРНК Cassette2+GFP, В – клетки HEK293FT, трансфицированные мРНК Cassette3+GFP, Г – контроль, клетки HEK293, трансфицированные мРНК pHMGFP

Наиболее интенсивное свечение наблюдалось при использовании Cassette3. Далее планируется использовать конструкцию Cassette3 и смесь нуклеотидов с заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин для получения мРНК, кодирующих антигены вируса гриппа, а также иммунизация экспериментальных животных для оценки способности полученных мРНК вызывать специфический иммунный ответ против вируса гриппа А (H1N1).

Известно, что доставка мРНК в клетки очень важна для успешного действия мРНК-вакцин. Существуют различные варианты доставки мРНК с использованием как вирусных, так и невирусных систем [12]. Для оценки эффективности каждой из них необходима удобная модель. Один из существующих подходов – мечение РНК зондами с флуоресцентной меткой, по которой можно отследить проникла ли РНК с носителем внутрь клетки [13]. Итак, на данном этапе работы мы получали и исследовали модель РНК-зонд-флуоресцентная метка.

Были получены короткие олигодезоксирибонуклеотидные последовательности (зонды) с флуоресцентной меткой карбоксифлуоресцеина, комплементарные участкам РНК Cassette3+GFP. Полученные зонды были гибридизованы с целевой РНК. Для проверки данной модели проводили трансфекцию клеток HEK293 комплексом РНК с зондами в составе Lipofectamine Messenger Max, а также в качестве контроля – комплексом РНК-зонды без Lipofectamine Messenger Max и зондом 3'-UTR с Lipofectamine Messenger Max. Далее анализировали клетки с помощью проточной цитофлуориметрии.

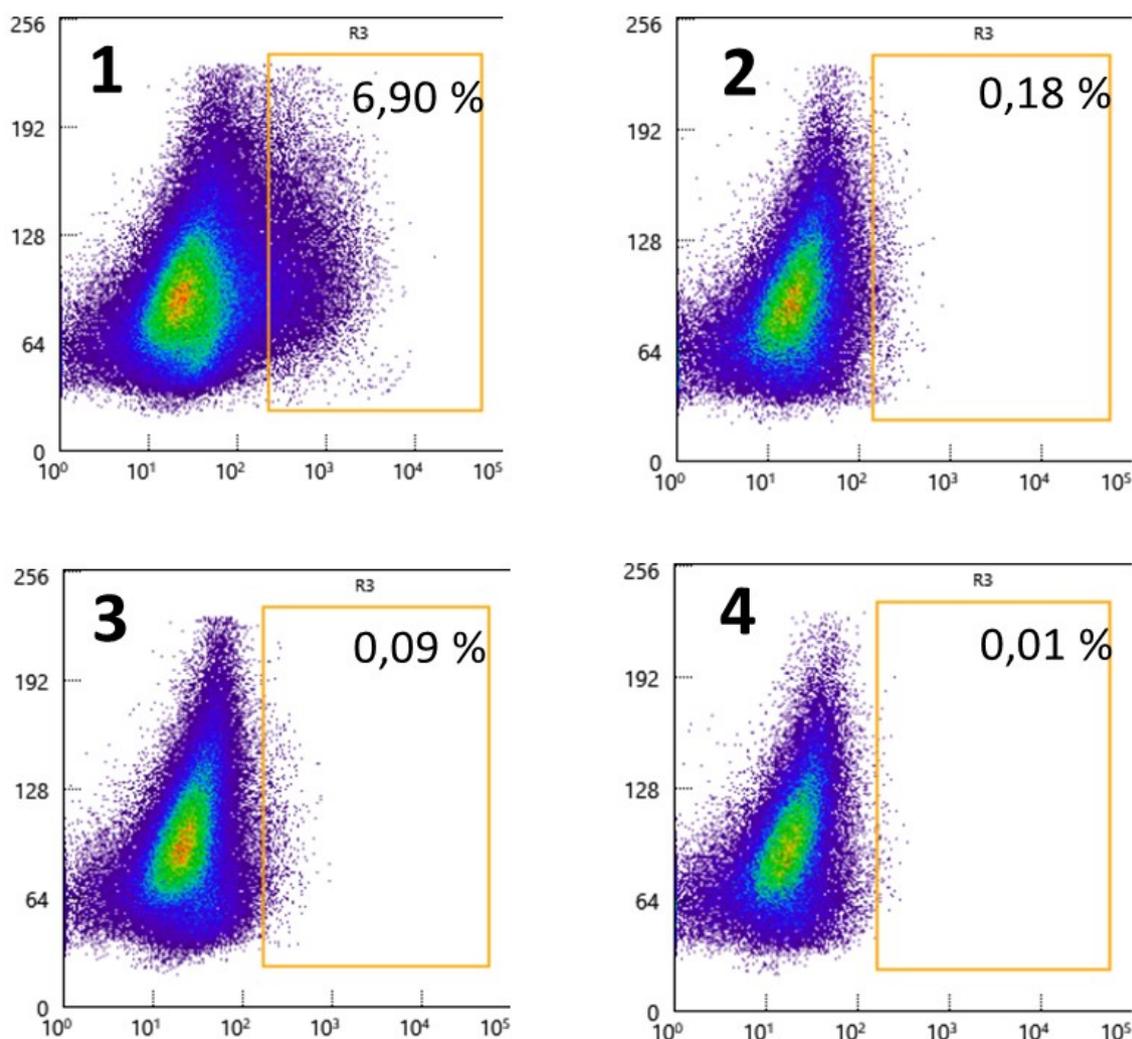


Рисунок 4 – Результаты проточной цитофлуориметрии. 1 – комплекс РНК-зонды с Lipofectamine Messenger Max; в качестве контроля: 2 – комплекс РНК-зонды, 3 – зонд 3'-UTR с Lipofectamine Messenger Max, 4 – чистые клетки.

Было показано, что доставка РНК в клетки происходит только в случае опытного образца (№1) и, соответственно, данную методику можно использовать для изучения эффективности проникновения РНК в клетки. Далее планируется использовать данный подход для исследования эффективности других способов доставки РНК в клетки.

Заключение

Было показано, что мРНК GFP со 100% заменой уридина на N1-метилпсевдоуридин наиболее эффективно транслируется в эукариотических клетках. Также показано, что наиболее эффективный синтез белка GFP обеспечивается при использовании ДНК-конструкции pVAX-Cassette3 с 5'- и 3'-нетранслируемыми областями гена β-глобина человека, фланкирующими целевой ген в составе мРНК. Далее была отработана методика изучения эффективности проникновения РНК в эукариотические клетки с помощью олигодезоксирибонуклеотидных зондов с 6-карбоксихлорофлуоресцеином.

Работа была выполнена в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Библиографический список

1. Ильичев А. А. и др. Технология мРНК как одна из перспективных платформ для разработки вакцины против SARS-CoV-2 // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2020. – Т. 24. – №. 7. – С. 802-807.
2. Starostina E. V. et al. Construction and immunogenicity of modified mRNA-vaccine variants encoding influenza virus antigens // Vaccines. – 2021. – Т. 9. – №. 5. – С. 452.
3. Starostina E. V. et al. Immune response against DNA-and mRNA vaccines encoding artificial influenza virus immunogens // Russian Journal of Immunology. – 2022. – Т. 25. – №. 3. – С. 321-326.
4. Youn H., Chung J. K. Modified mRNA as an alternative to plasmid DNA (pDNA) for transcript replacement and vaccination therapy // Expert opinion on biological therapy. – 2015. – Т. 15. – №. 9. – С. 1337-1348.
5. Freund I. et al. RNA modifications modulate activation of innate toll-like receptors // Genes. – 2019. – Т. 10. – №. 2. – С. 92.
6. Linares-Fernández S. et al. Tailoring mRNA vaccine to balance innate/adaptive immune response // Trends in molecular medicine. – 2020. – Т. 26. – №. 3. – С. 311-323.
7. Kwon H. et al. Emergence of synthetic mRNA: In vitro synthesis of mRNA and its applications in regenerative medicine // Biomaterials. – 2018. – Т. 156. – С. 172-193.
8. Gómez-Aguado I. et al. Nanomedicines to deliver mRNA: state of the art and future perspectives // Nanomaterials. – 2020. – Т. 10. – №. 2. – С. 364.
9. Sahin U., Karikó K., Türeci Ö. mRNA-based therapeutics—developing a new class of drugs // Nature reviews Drug discovery. – 2014. – Т. 13. – №. 10. – С. 759-780.
10. Linares-Fernández S. et al. Combining an optimized mRNA template with a double purification process allows strong expression of in vitro transcribed mRNA // Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2021. – Т. 26. – С. 945-956.
11. Mitra M., Johnson E. L., Collier H. A. Alternative polyadenylation can regulate post-translational membrane localization // Trends in cell & molecular biology. – 2015. – Т. 10. – С. 37.
12. Karpenko L. I. et al. Delivery of mRNA vaccine against SARS-CoV-2 using a polyglucin: Spermidine conjugate // Vaccines. – 2021. – Т. 9. – №. 2. – С. 76
13. Boutorine A. S. et al. Fluorescent probes for nucleic acid visualization in fixed and live cells // Molecules. – 2013. – Т. 18. – №. 12. – С. 15357-15397.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ CHRISTENSENELLA MINUTA В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРОБИОТИКА И СРЕДСТВА ДЛЯ БОРЬБЫ С ОЖИРЕНИЕМ

Лихотворик Ю.Е., Лоркипанидзе А.Е., Каргалинина К.Г.

ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, Москва, Россия

Аннотация. Роль кишечной микробиоты в состоянии здоровья человека хорошо известна. В современных исследованиях микробиома выделяются два основных направления: изучение вклада отдельных групп микроорганизмов в здоровье или, напротив, в различные патологические процессы, и возможность использования данных микроорганизмов в профилактических и терапевтических целях. Настоящий обзор посвящен относительно недавно описанному семейству Christensenellaceae, интерес к которому в последние годы связан с полученными новыми данными и открывающимися перспективами практического применения.

Ключевые слова: микробиота, воспалительные заболевания кишечника, ожирение.

PROSPECTS FOR THE USE OF CHRISTENSENELLA MINUTA AS A POTENTIAL THERAPEUTIC PROBIOTIC AND MEANS TO FIGHT OBESITY

Likhotvorik Y.E. , Lordkipanidze A.E., Kargalinina K.G.

Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University), Moscow, Russia

Abstract. The role of the gut microbiota in human health is well known. In modern studies of the microbiome, two main areas are distinguished: the study of the contribution of certain groups of microorganisms to health or, on the contrary, to various pathological processes, and the possibility of using these microorganisms for preventive and therapeutic purposes. This review is devoted to the relatively recently described family Christensenellaceae, the interest in which in recent years is associated with the new data obtained and the prospects for practical application that are opening up.

Keywords: microbiota, inflammatory bowel disease, obesity

Возросший интерес к бактериям семейства Christensenellaceae обусловлен целым рядом данных об их роли в регулировании энергетического баланса, метаболического гомеостаза. Впервые был описан вид *Christensenella minuta* в 2012 г. Morotomi et al. [5]. На сегодня известно 5 видов, дифференцированных в метагеномных исследованиях. *Christensenella minuta* семейства Christensenellaceae относится к типу Bacillota классу Clostridia.

Christensenellaceae – семейство субдоминантных комменсальных бактерий, обнаруженных в фекалиях человека. Количественные показатели разнятся от 0,01% у

британских близнецов до 0,11-0,45% фекальных бактерий у различных групп населения в Китае [3]. Вид *Christensenella minuta* (*C. minuta*) назван в честь датского микробиолога Хенрика Кристенсена, видовое название «minuta» получил из-за размера клетки (0,8–1,9 мкм) и размера колоний диаметром около 0,1 мм. Это грамотрицательные облигатные неспорообразующие анаэробы. Позже из крови человека были выделены грамположительные *C. Minuta*, что свидетельствует о том, что среди представителей вида возможно различное отношение к окраске по Граму [5]. В целом, грамвариабельность присуща представителям Clostridiales. Бактерии имеют форму палочек с заостренными концами, расположенных беспорядочно или парами, неподвижны. Различные штаммы демонстрируют сходную биохимическую активность. На тест-системах ари 20А ферментативная активность выявлена только при окислении глюкозы, салицина, ксилозы, рамнозы и арабинозы. При этом конечными продуктами брожения были уксусная и в небольшом количестве масляная кислоты. Таким образом, продемонстрирована невысокая сахаролитическая активность, отсутствие протеолитической и уреазной активности [7]. Бактерии устойчивы к 20% желчи. Температурный диапазон роста от 25 до 43° С, максимальная скорость роста в диапазоне 37-40° С, при температурах ниже 20° С и выше 43° С роста не наблюдалось. Диапазон рН для роста рН 6,0–9,0, оптимальный рост при рН 7,5. Рост наблюдался при концентрациях NaCl от 1 до 3%, а 5%-ная концентрация соли полностью подавляла размножение. Выраставшие колонии были мелкими, приподнятыми, округлыми.

В состав клеточной стенки входят глутаминовая кислота, серин, аланин и диаминопимелиновая кислота. Респираторные хиноны, обеспечивающих аэробное или анаэробное дыхание не обнаружены, следовательно, основной путь получения энергии – брожение. Основные сахара клетки – рибоза, рамноза, галактоза и глюкоза.

Представители семейства Christensenellaceae обнаружены не только у млекопитающих, но и у птиц, рептилий. С учетом описанной выше ферментативной активности местом обитания служат дистальные отделы толстой кишки. У человека Christensenellaceae были обнаружены не только в фекалиях, но также в слизистой оболочке толстой кишки, подвздошной кишке и аппендиксе. Количественный показатель варьирует в зависимости от этнической принадлежности, пола, пищевых привычек. Влияние генетических факторов впервые доказали Гудрич и др. на исследовании монозиготных и дизиготных близнецов в Великобритании. Они показали, что *C. minuta* – наиболее наследуемый бактериальный таксон у человека, то есть у людей имеется генетическая предрасположенность к высокой или низкой относительной численности этих бактерий [9]. Они также предположили терапевтический потенциал *C. minuta* в борьбе с ожирением. В этой же работе была продемонстрирована причинно-следственная связь количества *C. minuta* с уровнем ожирения у людей и на животных моделях. Оценивался косвенный показатель ожирения – индекс массы тела (ИМТ): количество *C. minuta* было значительно выше у людей с нормальным ИМТ (18,5–24,9) по сравнению с людьми с ожирением (ИМТ \geq 30). С момента этого наблюдения связь нормального ИМТ с наличием семейства Christensenellaceae в микробиоме неоднократно подтверждалась. Кроме того, было показано, что их количество увеличивается после потери веса, вызванной диетой.

Исследования, в которых избыток массы тела измеряется более точными методами, также отмечают связь ожирения и уменьшение количества Christensenellaceae в кишечнике. Например, Бомонт и др. в исследовании 3666 британских близнецов определяли показатели ожирения с помощью денситометрии (DEXA) и подтвердили предыдущие утверждения. Была выявлена связь Christensenellaceae и с массой висцерального жира – кардиометаболическим

фактором риска. Семейство Christensenellaceae положительно связано с низким показателем кардиометаболического риска. Они также связаны с нормальным метаболизмом глюкозы, а у людей с диабетом 2 типа, как правило, снижены. Механизм, лежащий в основе негативной связи с метаболическим синдромом, еще предстоит выяснить [1].

В дополнение к перечисленному, значение имеют и липиды сыворотки крови. Сообщалось о связи Christensenellaceae с низким уровнем триглицеридов, общего холестерина, липопротеинов низкой плотности, апопопротеином В и повышенным уровнем липопротеинов высокой плотности.

Christensenellaceae снижены у людей с метаболическим синдромом. В дополнение к избытку висцерального жира метаболический синдром также включает и другие факторы риска: нарушение метаболизма глюкозы, и вследствие этого является фактором риска развития диабета 2 типа и сердечно-сосудистых заболеваний. Нарушения обмена веществ часто связаны с особенностями питания. Christensenellaceae, по-видимому, реагируют на диету, а имеющиеся данные указывают на их роль в ферментации белка и клетчатки. Крупномасштабные исследования связывают данных микроорганизмов с полезными пищевыми привычками: с низким потреблением рафинированного сахара и высоким потреблением фруктов и овощей. Сообщается, что Christensenellaceae относительно выше у людей с всеядной диетой по сравнению с вегетарианцами. Было показано, что они быстро реагируют на увеличение продуктов животного происхождения в рационе и положительно связаны с метаболитами, типичными для катаболизма белка (в основном животного).

Чтобы проверить причинную роль бактерий в метаболических заболеваниях, Goodrich и др. выполнили пересадку фекалий, взятых у человека с ожирением (Christensenellaceae практически не определялись) стерильным мышам, которых кормили одним и тем же кормом, богатым клетчаткой, но в остальном они отличались только тем, содержал ли инокулят человека *C. minuta*. Эти эксперименты показали, что добавление *C. minuta* уменьшало прирост ожирения у мышей по сравнению с теми, кто получал неизменный стул (или стул с добавлением убитых нагреванием *C. minuta*). Активность *C. minuta* в микробиоме кишечника может влиять на состав тела хозяина, даже если диета контролируется, возможно, посредством взаимодействия с другими членами микробиоты [4].

При исследовании активности *C. minuta* в отношении борьбы с ожирением получили положительный результат на модели мышей. Полученные данные позволили предположить, что *C. minuta* штамм DSM33407 метаболически регулирует расход энергии, снижает накопление липидов в печени у животных, что было связано с репрессией *Gck* гена, ответственного за синтез печеночной глюкокиназы [6]. Параллельно со снижением массы тела шло уменьшение жировой массы без уменьшения мышечной массы, и бактерии способствовали здоровой активности брыжеечной жировой ткани. В этой же работе было показано, что ежедневное введение *C. minuta* штамм DSM33407 существенно улучшало микробный пейзаж в дистальном отделе толстой кишки и восстанавливало соотношение Firmicutes/Bacteroidetes [6].

Семейство Christensenellaceae вошло в пять таксонов, считающихся признаком здорового кишечника, в метаанализе воспалительных заболеваний кишечника (ВЗК), который включал более 3000 человек [5]. Основные формы ВЗК – язвенный колит (ЯК) и болезнь Крона (БК). В целой серии работ показано, что у таких пациентов *C. Minuta* отсутствует или резко снижена. Кроме воспалительных процессов снижение Christensenellaceae коррелирует со временем транзита. Действительно, семейство связано с аффективными расстройствами, влияющими на моторику кишечника [6]. Предположение о возможном терапевтическом

применении штаммов *C. minuta* нашло подтверждение при обнаружении их противовоспалительного действия на эпителиальные клетки человека. С этой целью был проведен скрининг коллекции, состоящей из 32 штаммов *C. Minuta*, на основе строгих критериев отбора с использованием анализов *in vitro* и *in vivo* [8]. Для оценки защитного действия штаммов на эпителий кишечника было выполнено заражение провоспалительным цитокином TNF- α монослоя клеток Caco-2 человека, которые представляют собой золотой стандарт имитации кишечного барьера человека. В результате все протестированные штаммы *C. minuta* оказывали значительное защитное действие на целостность кишечного барьера.

Для оценки противовоспалительного потенциала штаммов *C. minuta*, использовалась линия клеток кишечника человека HT-29 и РВМС человеческого происхождения, путем количественной оценки продукции соответствующих цитокинов. Клетки HT-29, полученные из колоректальной аденокарциномы человека, были выбраны за их способность секретировать большое количество IL-8 при воздействии TNF- α . ИЛ-8 является сильным хемоаттрактантом нейтрофилов, продуцируемым эпителиальными клетками кишечника, который, как было обнаружено, избыточно экспрессируется в слизистой оболочке всех сегментов кишечника от подвздошной до прямой кишки у пациентов с активной болезнью Крона, а также в сыворотке пациентов с БК и ЯК. Поэтому штаммы с сильной способностью предотвращать высвобождение IL-8 будут иметь высокий терапевтический потенциал.

Для оценки эффектов заживления, вызванных штаммом DSM 33715 было изучено две модели химически индуцированного колита у мышей. Индикатором активности кишечной микробиоты было выбрано количество короткоцепочечных жирных кислот (КцЖК), в содержимом слепой кишки, которое снижалось при воспалении и в значительной степени восстанавливалось при лечении DSM 33715. КцЖК, обладают сильными иммуномодулирующими свойствами. Соответственно, стимуляция рецепторов КцЖК снижает восприимчивость к развитию колита на модели мышей, что хорошо коррелирует с клиническими показателями. Полученные результаты позволяют рассматривать штаммы *C. Minuta* как перспективные терапевтические агенты для профилактики и терапии воспалительных заболеваний кишечника [2].

Связь семейства Christensenellaceae со здоровьем хозяина считается доказанной, хотя предстоит дальнейшее изучение его характеристик. Но полученные данные позволяют рассматривать *C. minuta* в качестве потенциального терапевтического пробиотика.

Библиографический список

1. Alonso, B. L. et al (2017). First report of human infection by *Christensenella minuta*, a gram-negative, strictly anaerobic rod that inhabits the human intestine. *Anaerobe*, 44, 124–125.
2. Beaumont Michelle et al, Heritable components of the human fecal microbiome are associated with visceral fat. *Genome Biology*, 2016, v.17, Article number: 189
3. Ferrario C, Statello R, Carnevali L, Mancabelli L, Milani C, Mangifesta M, et al. How to feed the mammalian gut microbiota: bacterial and metabolic modulation by dietary fibers. *Front Microbiol.* 2017;8:1749.
4. Goodrich J.K., Waters J.L., Poole A.C., Sutter J.L., Koren O., Blekhman R., Beaumont M., Van Treuren W., Knight R., Bell J.T., et al. Human Genetics Shape the Gut Microbiome. *Cell.* 2014;159:789–799

5. Li Xiang et al. Regional distribution of Christensenellaceae and its associations with metabolic syndrome based on a population-level analysis. J.Peer, 8, 2020 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7413085/>
6. Mazier W et al. A New Strain of Christensenella minuta as a Potential Biotherapy for Obesity and Associated Metabolic Diseases. J.Cells.2021, v.10(4): 823
7. Morotomi M, Nagai F, Watanabe Y. Description of Christensenella minuta gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2011;62:144–9.
8. Relizani Karima et al, Selection of a novel strain of Christensenella minuta as a future biotherapy for Crohn’s disease. Nature, Scientific Reports, 2022, v.12, 6017
9. Waters J.L. and Ruth E. Ley. The human gut bacteria Christensenellaceae are widespread, heritable, and associated with health. BMC Biology, 2019, v.17, Article number: 83

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ БЕРЕМЕННОСТИ, НА ЭКСПРЕССИЮ КИ-67 И CD127 ТИМОЦИТАМИ

Логинова О.А., Орлова Е.Г., Ширшев С.В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия*

Аннотация. Изучено влияние метаболических гормонов, лептина и грелина, в концентрациях, отражающих их уровень в периферической крови при беременности, на пролиферативный потенциал тимоцитов человека. Установлено, что оба гормона снижают экспрессию маркера пролиферации Ки-67 и рецептора к интерлейкину 7 (CD127) на тимоцитах. Таким образом, изученные гормоны играют значимую роль в контроле пролиферации тимоцитов.

Ключевые слова: лептин, грелин, тимоциты, пролиферация, беременность.

INFLUENCE OF METABOLIC HORMONES LEPTIN AND GHRELIN IN CONCENTRATIONS CORRESPONDING FOR PREGNANCY ON THE EXPRESSION Ki-67 AND CD127 IN THYMOCYTES

Loginova O.A., Orlova E.G., Shirshev S.V.

Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – branch of PFRC UB RAS, Perm, Russia

Abstract. The influence of metabolic hormones, leptin and ghrelin, in concentrations reflecting their level in peripheral blood during pregnancy, on the proliferative potential of human thymocytes was studied. It was found that both hormones reduce both the expression of the proliferation marker Ki-67 and the receptor for interleukin 7 (CD127) on thymocytes. Thus, the studied hormones play a significant role in the control of thymocyte proliferation.

Keywords: leptin, ghrelin, thymocytes, proliferation, pregnancy.

Беременность характеризуется гормон-зависимой инволюцией тимуса и супрессией клеточно-опосредованных иммунных реакций, где ведущую роль играют половые стероидные гормоны [1-3]. Лептин и грелин – метаболические гормоны, основная функция которых состоит в регуляции пищевого поведения и метаболизма [1]. Оба гормона обладают выраженной иммуномодулирующей активностью и играют важную роль на всех этапах гестации [4,5]. Ранее в наших работах показано, что лептин и грелин, в концентрациях, характерных для беременности, оказывают влияние на тимический этап дифференцировки Т-клеток [6-10], а также пролиферацию лимфоцитов периферической крови [11-15]. Целью данного исследования было изучение влияния лептина и грелина в концентрациях, характерных для беременности, в регуляции пролиферативного потенциала тимоцитов.

Материалы и методы.

Исследование проводилось с разрешения локального этического комитета ИЭГМ УрО РАН в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации, с изменениями 2013 г. и Конвенцией о защите прав и достоинства человека в связи с применением достижений биологии и медицины, 1999 г. В работе использовали клеточные суспензии, получаемые из фрагментов тимусов, удаляемых в ходе хирургических операций при коррекции врожденных пороков сердца (ВПС) у детей до 1 года в ФГБУ «Федеральном центре сердечно-сосудистой хирургии им. С.Г. Суханова» Минздрава России, г. Пермь. Обязательным критерием включения являлось наличие добровольного согласия со стороны законных представителей несовершеннолетних. Тимэктомия проводилась для обеспечения доступа в грудную полость при хирургической коррекции ВПС.

В исследовании были использованы фрагменты 5 тимусов детей без признаков цианоза (без гипоксии и цианоза слизистых оболочек и кожи на основании диагноза). Тимоциты получали из фрагмента органа методом пипетирования. По необходимости, из клеточной суспензии тимоцитов проводили удаление эритроцитов с использованием лизирующего буфера.

Исследование влияния гормонов лептина и грелина на спонтанную и стимулированную пролиферацию тимоцитов проводилось в условиях *in vitro*. Тимоциты, 1×10^5 кл/мл инкубировали в 100 мкл ППС (среда RPMI-1640, 10% ЭТС, 1 мМ НЕРЕС, 2 мМ L-глутамин, пенициллина G (100 ЕД/мл)-стрептомицина (0,1 мг/мл) в 96-луночных полистироловых планшетах («Erpendorf», Германия) 5 сут при 37°C в условиях 5% CO₂. Гормоны использовали в концентрациях, отражающих их содержание в периферической крови при беременности. Грелин («Sigma», Израиль) вносили в концентрации 1,25 нг/мл, что сопоставимо с уровнем гормона в I–II триместрах беременности [5]. Лептин («Sigma», США) использовали в концентрации 35 нг/мл, которая соответствует содержанию в периферической крови во II–III триместрах беременности [4].

Оценку влияния лептина и грелина на стимулированную пролиферацию тимоцитов проводили в аналогичных условиях; а в качестве активатора пролиферации использовали микрочастицы, покрытые антителами к CD3/CD28 (Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation, Thermo Fisher scientific, Lithuania), обеспечивающие стимуляцию и костимуляцию T-клеточного рецептора.

Пролиферативную активность тимоцитов оценивали после 5 сут инкубации по экспрессии Ki-67-белка, присутствующего во всех делящихся клетках, а также по экспрессии α-цепи рецептора IL-7 (CD127), методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител (Alexa Fluor® 700 anti-human CD4 (clone SK3, isotype mouse IgG1, κ), «BioLegend», США; Brilliant Violet 421™ anti-human Ki-67 (clone Ki-67, isotype mouse IgG1, κ), «BioLegend», США Alexa Fluor® 488 anti-CD127 (IL-7Ra) (clone: 019D5, isotype mouse IgG1, κ), «BioLegend», США) на проточном цитометре «CytFlex S» («Beckman Coulter», США).

Стратегия гейтирования представлена на рисунке 1. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие изотипические и негативные контроли. При анализе учитывали не менее 10000 событий. Обработка данных цитофлюориметрии осуществлялась с использованием программы «CytExpert 2.0».

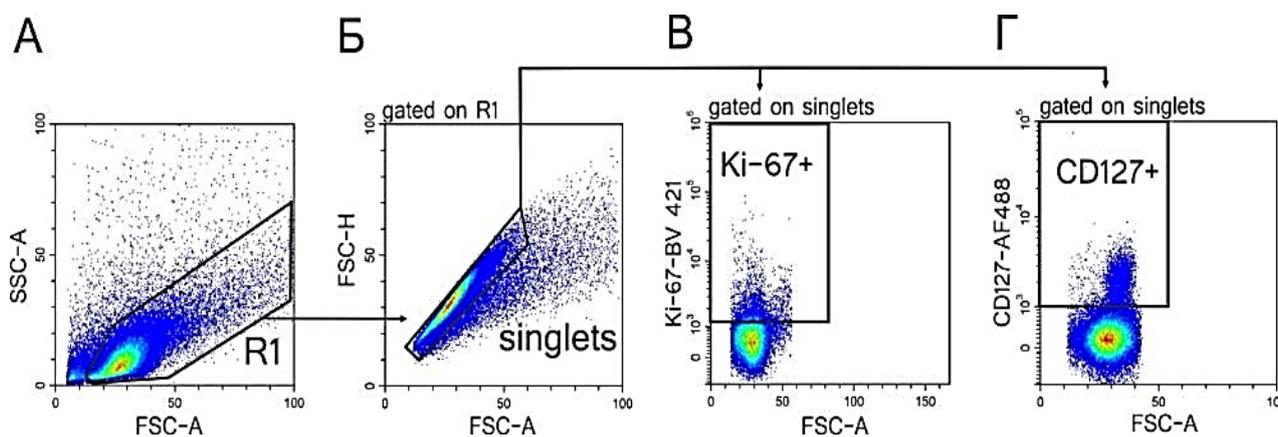


Рисунок 1 – Стратегия гейтирования, используемая для анализа экспрессии Ki-67 и CD127 тимоцитами. Определение гейта пролиферирующих лимфоцитов (R1) на основе прямого и бокового светорассеивания (FSC-A/SSC-A); (Б) Выделение жизнеспособных клеток (singlets) путем исключения дублетов и мертвых клеток по соотношению площади и высоты бокового светорассеивания (FSC-A/ FSC-H); (В) и (Г) определение Ki-67⁺ и CD127⁺ клеток в исследуемом гейте.

Статистический анализ проводили с помощью программы «STATISTICA 11.0» (StatSoft, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между группами спонтанной и стимулированной пролиферации определяли с использованием критерия Вилкоксона для парных независимых выборок. Влияние гормонов оценивали по парному критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок. Контролем служили соответствующие пробы без внесения гормонов. Для корреляционного анализа использовали критерий ранговой корреляции Спирмена (r). Данные представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних квартилей (UQ). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение.

Установлено, что оба гормона оказывают угнетающее влияние на пролиферативный потенциал тимоцитов в исследуемой культуре. Полученные результаты представлены на рисунке 2А,Б. Так, лептин снижает процент Ki-67⁺ клеток в нестимулированной культуре тимоцитов (спонтанная пролиферация), а также после внесения антиCD3/CD28-частиц (стимулированная пролиферация). Грелин не влиял на количество Ki-67⁺ клеток в нестимулированной культуре тимоцитов, но снижал экспрессию Ki-67⁺ в стимулированной антиCD3/CD28-частицами культуре тимоцитов.

Для оценки механизмов влияния гормонов на пролиферацию тимоцитов, изучали экспрессию α -цепи рецептора к IL-7 (CD127) тимоцитами. IL-7 вырабатывается тимическими эпителиальными клетками и является основным цитокином, стимулирующим пролиферацию тимоцитов, аналогично действию IL-2 лимфоциты. Показано, что оба гормона не влияют на экспрессию CD127 тимоцитами, но снижают количество CD127⁺Т-клеток после стимуляции анти-CD3/CD28-частицами.

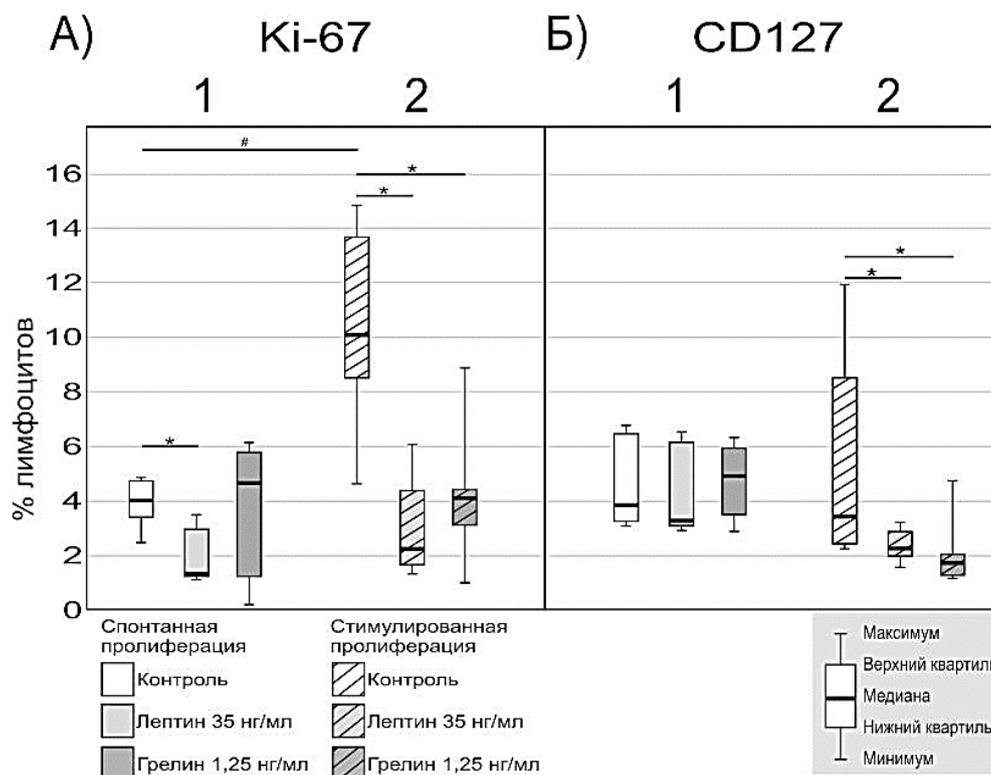


Рисунок 2 – Оценка влияния лептина и грелина на уровень экспрессии Ki-67 (А) и CD127 (Б) тимоцитами в ходе изучения спонтанной (А1, Б1) и стимулированной (А2, Б2) пролиферации тимоцитов. * – $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона для парных зависимых выборок. # – $p < 0,05$ по критерию Вилкоксона для независимых выборок

Таким образом, можно полагать, что угнетающий эффект гормонов на пролиферацию тимоцитов может быть опосредован снижением экспрессии рецептора к IL-7(CD127) в условиях стимуляции CD3/CD28-частицами. Следует отметить, что CD3/CD28-стимуляция происходит на этапах селекции тимоцитов. Можно заключить, что при физиологически протекающей беременности исследуемые гормоны препятствуют пролиферации тимоцитов на этапах селекции в тимусе. Полученные результаты дополняют ранее полученные результаты о том, что грелин, в аналогичной концентрации, снижает экспрессию Ki-67 в T-bet⁺ и GATA-3⁺CD4⁺ тимоцитах, что отражает дифференцировку Th1 и Th2 [16], в T-регуляторных лимфоцитах (Treg), интерлейкин (IL)-17-продуцирующих лимфоцитах (Th17) и инвариантных T-лимфоцитах с функциями натуральных киллеров (iNKT) [17], а также уменьшает интенсивность пролиферации тимоцитов в целом [9].

Полученные результаты расширяют имеющиеся на настоящее время представления о механизмах гормонального контроля, индуцирующих инволюцию тимуса при беременности.

Работа выполнена в рамках НИОКТР АААА–А19–119112290007–7 «Механизмы регуляции иммунной системы».

Библиографический список

1. Tena-Sempere M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function // Neuroendocrinology. – 2007. – V.86. – P.229-241.

2. Ширшев, С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С.В. Ширшев // УрО РАН. – Екатеринбург. – 2009. – 582 с.
3. Zenclussen AC. Adaptive immune responses during pregnancy. *Am J Reprod Immunol.* – 2013. – V.69(4). – P.291-303.
4. Hardie L. and Trayhurn P. Circulating leptin in women: longitudinal study in menstrual cycle and during pregnancy // *Clin. Endocrinol.* – 1997. – V.47. – P.101 – 106.
5. Fuglsang J. et al. Ghrelin and its relationship to growth hormones during normal pregnancy // *Clin. Endocrinol.* – 2005. – V.62. – P.554- 559.
6. Ширшев С.В., Орлова Е.Г., Заморина С.А., Некрасова И.В. Гормональная регуляция тимического этапа дифференцировки IL-17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Доклады академии наук. 2014. Т.454. С.103–106.
7. Shirshev S.V. et al. Hormonal regulation of thymic–stage differentiation of IL-17-producing and T-regulatory lymphocytes // *Doklady Biological Sciences.* – 2014. – V.454, Is. 1. – P.65-68.
8. Shirshev S.V. et al. I.L. Hormonal regulation of dendritic cell differentiation in the thymus // *Bulletin of Experimental Biology and medicine.* – 2018. – V.165, N.2. – P.230-234.
9. Ширшев С.В. и др. Гормональная регуляция апоптоза и пролиферации тимоцитов // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2014. № 3 (49). – С.49-50.
10. Орлова Е.Г. и др. Роль дендритных клеток тимуса в регуляции формирования Treg // Материалы II Международной научной конференции. – 2018. – С.251-253.
11. Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ17-продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // БЭБИМ – 2013. -Т.156, №12.- 786-791.
12. Орлова Е.Г. и Ширшев С.В. Роль лептина и грелина в индукции дифференцировки ИЛ–17–продуцирующих и Т-регуляторных лимфоцитов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.156. № 12. – С.786-790.
13. Орлова Е.Г. и др. Лептин и грелин регулируют созревание дендритных клеток, индуцирующих формирование регуляторных Т-лимфоцитов // Доклады Академии наук. – 2015. – Т. 462. № 6. – С. 723.
14. Ширшев С.В. и др. Роль лептина и грелина в регуляции фенотипа и продукции цитокинов НК-клетками периферической крови // Доклады Академии наук. – 2016. – Т. 470. №5. – С.603-606.
15. Орлова Е.Г. и др. Механизмы влияния лептина и грелина на созревание и функциональную активность дендритных клеток // Биохимия. – 2019. – Т. 84. № 1. – С.63-73.
16. Логинова О.А., Орлова Е.Г., Ширшев С.В. Изучение влияния метаболических гормонов лептина и грелина, в концентрациях характерных для беременности, в регуляции экспрессии транскрипционных факторов T-bet и GATA-3 Т-лимфоцитами // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – 2020. – С. 157-162.
17. Орлова Е.Г., Логинова О.А., Ширшев С.В. Роль метаболических гормонов в контроле пролиферации и апоптоза натуральных регуляторных клеток (nTh17, Treg, iNKT) тимуса // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием. – 2020. – С. 192-196.

ВЛИЯНИЕ ПОЛА И ВОЗРАСТА НА РАЗВИТИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЖИТЕЛЕЙ КУЗБАССА

Марущак А. В.¹, Елисейкин А. М.¹, Яковлева А. А.²

¹ *Институт экологии человека Федерального исследовательского центра угля и углехимии Сибирского отделения Российской академии наук, Кемерово, Россия*

² *Кемеровский государственный университет, Кемерово, Россия*

Аннотация. В работе представлены результаты исследования влияния пола и возраста на развитие цитогенетических нарушений у жителей Кемеровской области. Рассматриваются различия в нарушениях между женской и мужской выборками в количестве 40 человек. Каждая группа была разделена в соответствии с возрастом на подгруппы, которые были сравнены как между собой, так и внутри выборок.

Ключевые слова: микроядерный тест, жители Кузбасса, цитотоксичность, пол, возраст.

INFLUENCE OF GENDER AND AGE ON THE DEVELOPMENT OF CYTOGENETIC DISORDERS IN KUZBASS RESIDENTS

Marushchak A. V.¹, Eliseikin A. M.¹, Yakovleva A. A.²

¹ *Institute of Human Ecology, Federal Research Center for Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russia*

² *Kemerovo State University, Kemerovo, Russia*

Abstract. The paper presents the results of a study of the influence of gender and age on the development of cytogenetic disorders in residents of the Kemerovo region. Differences in violations between female and male samples of 40 people are considered. Each group was divided according to age into subgroups, which were compared both among themselves and within the samples.

Keywords: micronucleus test, residents of Kuzbass, cytotoxicity, gender, age.

Кемеровская область является одним из районов экологического бедствия России за счёт своего лидерства в угледобывающем и металлургическом производстве. Загрязнённость воздуха городов Кемеровской области во многом зависит от содержащихся в нём элементов добычи, транспортировки и переработки угля. При сгорании угля образуются летучие золы, пыль, оксиды углерода, азота, активные формы кислорода, полициклические ароматические углеводороды, тяжёлые металлы, а также радиоактивные соединения и продукты их распада, являющиеся канцерогенами. Вследствие этого целесообразно определить уровень геномной стабильности жителей, проживающих на территории Кемеровской области, но не работающих на угольном производстве.

Исследовательскую выборку составили 80 мужчин и женщин, проживающих в Кузбассе. Средний возраст мужской и женской групп примерно совпадал – лет соответственно. Каждая из выборок была поделена на две подгруппы в соответствии с возрастом – 25 и 40 лет. Изучались как половые и возрастные различия в целом, так и внутри каждой группы.

Методом исследования являлся микроядерный тест на лимфоцитах периферической крови человека. Данный метод определяется как универсальный метод цитогенетики, основной задачей которого является выявление цитогенетических повреждений [1].

Регистрировались такие показатели, как частота микроядер, нуклеоплазменных мостов и протрузий, а также параметры пролиферативной активности клеток: частота лимфоцитов на стадии митоза и клеточной гибели. Индекс пролиферации и репликации рассчитывался для определения скорости противодействия клеток к генотоксическому воздействию.

Цитогенетические параметры и показатели пролиферативной активности клеток и их различия по полу представлены в таблице 1. Так, в женской выборке повышены почти все параметры микроядерного теста за исключением клеток на стадии апоптоза ($p > 0.08$). Частота клеток с микроядрами в женской выборке (13,7 %) значительно повышена ($p < 0.0002$) по сравнению с мужской группой (6,2 %). Микроядра способны образовываться спонтанно [2] или быть результатом воздействия внешних эффектов [3].

На формирование микроядер могут влиять как детерминанты физической, так и химической природы, вследствие чего выделяются анеугенные и кластогенные явления в зависимости от механизма активности [4]. Кластогенные факторы способствуют разрывам ДНК и образованию микроядер, которые содержат центрические элементы хромосом, не обладающие механизмами перемещению к полюсам и сегрегации. Анеугенные явления воздействуют на распределение интактных хромосом и способствуют формированию микроядер, которые содержат целые хромосомы [3].

Также химическими детерминантами, способными влиять на формирование микроядер, относятся повреждения концентрации кислорода при оксидативном стрессе или гипоксии, а также индуцирование активных типов кислорода при разных стрессовых влияниях [5].

На формирование микроядер при нарушении ДНК также влияют и физические элементы, такие как: радиационное излучение, ультрафиолетовое облучение, модифицирование давления и температуры. Большая часть данных эффектов обладает кластогенным механизмом действия.

Частоты нуклеоплазменных мостов и протрузий также существенно выше ($p < 0.03$ и $p < 0.000001$) у женщин (9,3 % и 13,5 % соответственно) по сравнению с мужчинами (5,2 % и 5,4 % соответственно). Доказано, что микроядра и протрузии экспрессируются одновременно после генотоксической экспозиции в лимфоцитах человека с факторами положительной корреляции между этими двумя биомаркерами [6].

Анафазный мост является дицентрической хромосомой в сочетании с микротрубочками митотического веретена, которые соединяют её одновременно с обоими клеточными полюсами. Ядерная оболочка может охватывать совместно дочерние ядра и анафазный мост при условии, что клетка не останавливает митотическое деление [4]. В основном, клетки относительно быстро проходят этапы анафазы и телофазы, вследствие чего происходит распределение хромосомы моста анафазы. Подобные аномалии способствуют развитию из хромосомных компонент микроядерных структур [7]. Ключевой особенностью образованных на этапе моста анафазы клеточных структур типа микроядро является их однонаправленная расположенность [8].

Таблица 1 – Цитогенетические и пролиферативные параметры микроядерного теста в мужской и женской группах, ‰

Показатели	Женская группа		Мужская группа	
	μ	\pm	μ	\pm
Частота микроядер	13,7*	9,2	6,2	2,1
Частота мостов	9,3*	8,4	5,2	7,0
Частота протрузий	13,5*	5,9	5,4	5,8
Частота митозов	24,1*	9,8	17,8	9,8
Частота апоптозов	5,8	3,8	4,2	3,9
Индекс пролиферации	16,9*	1,2	15,8	1,0
Индекс репликации	20,3*	1,3	19,4	1,5

Примечание. μ – среднее значение; \pm – стандартное отклонение; * – при U-критерии Манна-Уитни.

Протрузии схожи по механизмам образования с микроядрами, они способны формироваться как результат отрыва цепей ДНК или же из хромосом, которые отстали во время дисфункции веретена деления. Некоторые протрузии могут являться хроматидными или хромосомными мостами, разорвавшимися на стадии анафазы и формирующимися в процессе хромосомных aberrаций [9].

В женской группе показатели пролиферативной активности, такие как частота митозов (24,1 ‰), индекс пролиферации (16,9 ‰), индекс репликации (20,3 ‰) статистически значимо выше ($p < 0.007$, $p < 0.00003$ и $p < 0.02$ соответственно) по отношению к показателям в мужской группе (17,8 ‰, 15,8 ‰ и 19,4 ‰ соответственно). Апоптозы могут быть вызваны специфическими стимулами, такими как негативные факторы, повреждающие ДНК, лекарственные препараты, облучение, активация клеточной гибели, отсутствие рецепторов роста [11].

Таблица 2 – Возрастные различия показателей микроядерного теста в женской подгруппе, ‰

Показатели	Старше 51 года		Моложе 50 лет	
	μ	\pm	μ	\pm
Частота микроядер	22,1*	5,3	10,9	8,4
Частота мостов	15,4*	5,5	7,2	8,3
Частота протрузий	11,6	7,1	14,2	5,4
Частота митозов	14,0	5,6	27,4*	8,5
Частота апоптозов	3,3	2,0	6,6*	3,9
Индекс пролиферации	15,8	0,4	17,2*	1,1
Индекс репликации	20,8	0,8	20,1	1,3

Примечание. μ – среднее значение; \pm – стандартное отклонение; * – при U-критерии Манна-Уитни.

Женская группа была разделена на две подгруппы в соответствии с возрастом: 1) моложе 50 лет – 11 человек; 2) старше 51 года – 29 человек. Подобное разделение соответствует возрастной классификации советского антрополога В. В. Гинзбурга, где возраст от 40 до 50 лет считается зрелостью, а после 51 года – старостью.

Так, согласно полученным данным, представленным в таблице 2, женщины моложе 50 лет обладают повышенными ($p < 0.0004$, $p < 0.01$ и $p < 0.001$) пролиферативными параметрами (частота митозов: 27,4 %, апоптозов: 6,6 % и индекс пролиферации: 17,2 %) по сравнению с женщинами старше 51 года (14,0 %, 3,3 % и 15,8 % соответственно). И, наоборот, у более молодой подгруппы выявлены статистически значимо ($p < 0.002$, $p < 0.005$) пониженные показатели частоты микроядер (10,9 %) и нуклеоплазменных мостов (7,2 %) по отношению к старшей подгруппе (22,1 % и 15,4 % соответственно).

Предполагается, что повышенные частоты микроядер с возрастом определяются рядом детерминант: накопительная особенность приобретённых модификаций в генетическом материале, которые принимают непосредственное участие при репарации ДНК, а также отделение хромосом в контрольных точках на стадии анафазы; количественные и морфологические повреждения в хромосомном наборе, которые обусловлены воздействием как внутренних генотоксинов, так и негативным влиянием мутагенных и канцерогенных эффектов окружающей и производственной сред, а также немалого списка критериев, связанных с неправильным образом жизни [10].

Аналогично женской группе мужская выборка была разделена по возрасту и изучена в соответствии с различиями параметров микроядерного теста по возрастному критерию. Подгруппу моложе 50 лет составило 8 человек, подгруппу старше 51 года – 32 человека. Однако, в мужской группе статистически значимых отличий среди подгрупп моложе 50 лет и старше 51 года выявлено не было ($p > 0.05$). В соответствии с этим был проведён анализ различий в мужской и женской выборках в возрасте до 49 лет и старше 50 лет. Данные представлены на рисунке.

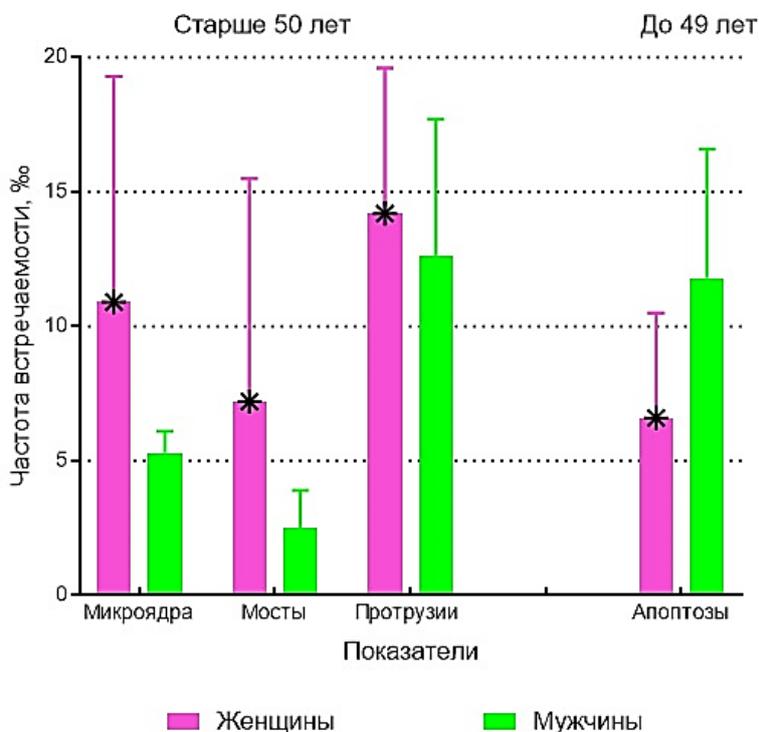


Рисунок – Различия параметров микроядерного теста в мужской и женской группах, разделённых по возрасту.

Согласно диаграмме, молодые подгруппы в обеих выборках имеют статистически значимые различия ($p < 0.02$) только в показателе частоты клеток на стадии апоптоза: у

женщин этот показатель выше (6,6 %о против 1,3 %о). Сравнивая мужскую и женскую выборки в возрасте старше 51 года, установлено существенное повышение ($p < 0.000001$, $p < 0.0001$, $p < 0.01$) показателей микроядер (22,1 %о против 6,1 %о), нуклеоплазменных мостов (15,3 %о против 4,3 %о) и протрузий (11,5 %о против 4,8 %о) в женской группе. Существует предположение, что увеличенная частота микроядер возникает при возрастной потере X-хромосомы, обычно встречающейся у женщин [11]. Другие исследования предполагают, что при поздней репликации неактивная X-хромосома у самок преимущественно теряется в анафазе, возможно, из-за преждевременного центромерного деления [12].

Многие исследования, изучающие связь между полом и частотой микроядер, предоставили убедительные доказательства того, что частота микроядер значительно выше у женщин, чем у мужчин [13;14], в то время как имеется несколько публикаций, согласно которым пол не влиял на повышенные частоты микроядер [15].

Что касается цитотоксичности, у женщин значительно более высокая частота апоптотических клеток, чем у мужчин в контрольной группе, в то время как в рабочей группе существенные различия не были обнаружены. В целом, наши выводы коррелируют с выводами Donmez и Bitgen [16], в которых сообщается, что пол может влиять на частоту апоптотических и митотических клеток.

В ряде исследований оценивали возможное влияние возраста и пола на частоту микроядер. Несколько исследований выявили увеличение частоты микроядер с возрастом [14;17], хотя другие не показали никакой корреляции между показателями микроядер и возрастом [18].

В проекте HUMN проводился анализ, в котором были объединены результаты из 25 баз данных (около 7000 человек), где сообщалось о более высоких уровнях частоты микроядер у женщин, при этом показывая увеличение количества клеток с цитогенетическими нарушениями с возрастом у обоих полов [19].

Полученные данные предоставляют расширенное представление о цитогенетических нарушениях у жителей Кемеровской области, где воздух загрязнён промышленными продуктами сгорания угля. Установлены повышенные значения цитогенетических повреждений у женщин по сравнению с мужчинами. Кроме того, результаты исследования женщин демонстрируют увеличение цитогенетических нарушений с возрастом.

Библиографический список

1. Ингель, Ф. И. Перспективы использования микроядерного теста на лимфоцитах крови человека, культивируемых в условиях цитокинетического блока. Часть 1. Пролиферация клеток / Ф. И. Ингель // Экологическая генетика. – 2006. – 4 (4). – С. 7-19.
2. Fenech, M. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes / M. Fenech, S. Bonassi // *Mutagenesis*. – 2011. – V. 26(1). – P. 43-49.
3. Кисурина-Евгеньева, О. П. Биогенез микроядер / О. П. Кисурина-Евгеньева, О. И. Сутягина, Г. Е. Онищенко // *Биохимия*. – 2016. – Т. 81. – № 5. – С. 612-624.
4. Fenech, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay / M. Fenech // *Nat Protoc*. – 2007. – V. 2. – № 5. – P. 1084-1104.
5. Snyder, R. D. Hypoxia-induced micronucleus formation in mice, *Drug Chem* / R. D. Snyder, M. S. Diehl // *Toxicol*. – 2005. – V. 28(4). – P. 373-358.

6. Serrano-Garcia, L. Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events / L. Serrano-Garcia, R. Montero-Montaya // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2001. – V. 38. – P. 38-45.
7. Hoffelder, D. R. of anaphase bridges in cancer cells / D. R. Hoffelder et al. // *Chromosoma.* – 2004. – V. 112. – № 8. – P. 389-397.
8. Utani, K. Emergence of micronuclei and their effects on the fate of cells under replication stress / K. Utani et al. // *PLoS One.* – 2010. – V. 5. – №4. – e10089.
9. Кузоватов, С. Н. Межъядерные хромосомные мосты и ядра с протрузиями в клеточных популяциях рабдомиосаркомы РА-23 крыс / С. Н. Кузоватов и др. // *Цитология.* – 2000. – Т. 42. – № 11. – С. 1097-1102.
10. Mesic, A. Assessment of the genotoxicity and cytotoxicity in environmentally exposed human populations to heavy metals using the cytokinesis-block micronucleus cytome assay / A. Mesic, H. Nefic // *Environmental Toxicology.* – 2015. – V. 30(11). – P. 1331-13342.
11. Galloway, S. M. Aneuploidy and ageing: chromosome studies on a random sample of the population using G-banding / S. M. Galloway, K. E. Buckton // *Cytogenet Cell Genet.* – V. 20. – P. 78-95.
12. Fitzgerald, P. H. Premature centromere division: a mechanism of non-disjunction causing X chromosome aneuploidy in somatic cells of man / P. H. Fitzgerald et al. // *Am. J. Hum. Genet.* – V. 38. – P. 417-428.
13. Battershill, J. M. Factors affecting the incidence of genotoxicity biomarkers in peripheral blood lymphocytes: Impact on design of biomonitoring studies / J. M. Battershill, K. Burnett, S. Bull // *Mutagen.* – 2008. – V. 23. – P. 423-437.
14. Kopjar, N. Micronucleus assay in Croatian general population / N. Kopjar et al. // *Arh Hig Rada Toksikol.* – 2010. – V. 61. – P. 219-234.
15. Duan, H. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons / H. Duan et al. // *Mutat. Res.* – 2009. – V. 677(1-2). – P. 93-99.
16. Donmez-Altuntas, H. Evaluation of the genotoxicity and cytotoxicity in the general population in Turkey by use of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay / S. Donmez-Altuntas, N. Bitgen // *Mutat Res.* – V. 748. – P. 1-7.
17. Kirsch-Volders, M. Micronuclei, inflammation and auto-immune disease / M. Kirsch-Volders // *Mutat Res.* – 2020. – V. 786(202). – p. 108335.
18. Coskun, M. Frequencies of micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), and nuclear buds (NBUDs) in farmers exposed to pesticides in Canakkale, Turkey / M. Coskun, A. Cayir, O. Ozdemir // *Environ Int.* – 2011. – V. 37. – P. 93-96.
19. Bonassi, S. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micro Nucleus project / S. Bonassi et al. // *Mutat. Res.* – 2003. – V. 543. – P. 155-166.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС WISTAR ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И СЕЛАНКА

Молчанов И.П., Медведева О.А., Ворвуть А.О.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия.

Аннотация. Стресс может опосредованно влиять на состав микробиоты кишечника, вызывая дисбиоз. Для разрешения подобных состояний возможно использование стресслимитирующих препаратов, таких как Селанк. В ходе исследования проводилось изучение микробиологического профиля толстой кишки крыс Wistar на фоне применения Селанка в условиях хронического иммобилизационного стресса. По результатам наблюдалось нарушение состава микробиоценоза при стрессе и его восстановление при применении гептапептида Селанка.

Ключевые слова: микробиота, стресс, толстая кишка, кишечно-мозговая ось, Селанк.

MICROBIOLOGICAL PROFILE OF THE COLON OF WISTAR RATS UNDER THE INFLUENCE OF CHRONIC IMMOBILIZATION STRESS AND SELANK

Molchanov I.P., Medvedeva O.A., Vorvul A.O.

Kursk State Medical University, Kursk, Russia

Abstract. Stress can indirectly affect the composition of the gut microbiota and lead to dysbiosis. It may be possible to resolve such conditions using stress-limiting drugs, such as Selank. In the research, we study microbiological profile of the Wistar rat's colon when Selank administered under conditions of chronic immobilization stress. The study demonstrated that there was a disruption in the microbiocenosis composition in stress and its recovery when Selank was used.

Keywords: microbiota, stress, colon, gut-brain axis, Selank.

Актуальность. Современные концепции взаимодействия нервной системы и кишечной микробиоты описываются понятием «кишечно-мозговая ось». Реализация сложных межсистемных связей осуществляется посредством автономной нервной системы, секреции молекул «микробной сигнализации». Недостаточность бинаправленного сообщения между нервной и пищеварительной системами может привести к тяжелым расстройствам, таким как дисбиоз кишечника, а в дальнейшем воспалительным процессам, аллергическим реакциям, интоксикациям. Как острое, так и хроническое состояние стресса способно приводить к сдвигам кишечно-мозговой оси, что проявляется снижением барьерной функции кишечника и качественными и количественными изменениями в составе микробиоценоза толстой кишки, повышению уязвимости организма к стрессорным факторам, тем самым замыкая «порочный круг», разорвать который можно с помощью фармакологической модуляции стресса [1,2,3].

Так, на первый план выходит поиск подходов к коррекции дисбиотических состояний толстой кишки посредством стресслимитирующих препаратов. В частности,

характеризующийся высокой биодоступностью и отсутствием выраженных побочных эффектов, Селанк представляет собой гептапептид Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro, обладающий антидепрессивным и психомодулирующим действием. Местный иммунотропный эффект Селанка реализуется через подавление экспрессии генов хемокинов, IL-6, которые оказывают существенное влияние на течение воспалительных реакций [4,5].

Цель исследования – изучить количественные и качественные изменения состояния пристеночной микробиоты толстой кишки крыс Wistar на фоне применения гептапептида Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro в концентрации 80 мкг/кг в условиях хронического иммобилизационного стресса.

Материалы и методы исследования. В качестве экспериментальной модели были выбраны животные (крысы Вистар), разделенные на три групп по 13 особей в каждой. Первая группа представлена животными, которым вводили физиологический раствор, животным второй группы вводили физиологический раствор и моделировали четырехнедельный иммобилизационный стресс, третья группа также подвергалась действию ХИС и инъекционному (внутрибрюшинному) введению пептида Селанка в концентрации 80 мкг/кг массы тела. Введение действующих веществ осуществлялось за 15 минут до начала стрессового воздействия. Воспроизведение хронического иммобилизационного стресса реализовывалось с применением индивидуальных пластиковых боксов для крыс, снабженных отверстиями для вентиляции. Продолжительность иммобилизации составила 2 часа на протяжении 28 дней, ежедневно. Условия содержания экспериментальных животных соответствовали Международным рекомендациям Европейской конвенции. По истечении сроков моделирования иммобилизационного стресса крысы выводились из эксперимента путем обескровливания. Из образцов мукозной микробиоты готовились разведения, засеваемые на питательные среды (SSA-агар, Эндо, Сабуро, ЦПХ-агар, желточно-солевой агар, висмут-сульфит агар, агар лактоагар MRS, бифидоагар, селективный для стрептококков) и инкубировали в строго нормированных условиях. С помощью масс-спектрографа производилась идентификация микроорганизмов на засаженных средах. Выражение количества микроорганизмов осуществлялось после расчёта выросших на средах колоний в lg КОЕ/г. Статистическая обработка данных мы проводили, применяя t-критерий Стьюдента, при нормальном распределении данных.

Результаты. В ходе исследования мы провели сравнительный анализ качественного и количественного состава облигатных и факультативных микроорганизмов толстой кишки крыс Wistar после моделирования хронического иммобилизационного стресса и внутрибрюшинного введения Селанка в концентрации 80 мкг/кг (таблица).

В первую очередь мы оценивали между собой две исходные группы, животным первой – инъекционно вводился физиологический раствор, животным второй – вводили физиологический раствор и моделировали ХИС.

При этом содержание бифидобактерий во второй группе снизилось в 1,1 раз и составило $\lg 9,33 \pm 1,08$ против $\lg 10,30 \pm 0,67$ в первой группе с животными без стресса.

Количественный показатель кишечных палочек с нормальной ферментативной активностью снизился в 1,6 раза и составило $\lg 3,64 \pm 1,25$. Следует отметить, что число эшерихий со сниженной ферментативной ($\lg 4,30 \pm 0,94$) также несколько снизилось во второй группе по сравнению с первой группой, на которой стресс не моделировался.

В ходе работы были выявлены значительные сдвиги в количественном соотношении по следующим микроорганизмам: *Candida* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp. Так содержание грибов *Candida* во второй группе («физиологический раствор +

иммобилизационный стресс») достоверно увеличилось в 1,35 раза по сравнению с количественным показателем данных микроорганизмов в первой группе (с животными без стресса) и составило $\lg 7,23 \pm 0,22$.

После введения физиологического раствора и формирования иммобилизационного стресса в составе микробиоценоза толстой кишки крыс количество золотистого стафилококка увеличилось в 1,6 раза и составило $\lg 4,53 \pm 1,17$ против $\lg 7,27 \pm 0,24$ в первой группе.

Содержание микроорганизмов рода *Morganella* после введения физиологического раствора и формирования иммобилизационного стресса во второй группе уменьшилось в 1,8 раз, а рода *Enterococcus* увеличилось в 3,25 раза и составило $\lg 3,96 \pm 1,07$ против $1,22 \pm 0,81$ в первой группе.

Таблица – Количественный состав мукозной микробиоты кишечника крыс после введения Селанка в условиях ХИС (\lg КОЕ/г, $M \pm m$)

	Контроль (введение физиологического раствора)	Контроль (введение физиологического раствора стрессированным животным)	Введение Селанка в дозе 80 мкг/кг стрессированным животным
<i>Lactobacillus</i> spp.	$7,53 \pm 1,29$	$10,10 \pm 0,73$	$9,25 \pm 1,20$
<i>Bifidobacterium</i> spp.	$10,30 \pm 0,67$	$9,33 \pm 1,08^*$	$11,25 \pm 0,19^{**}$
<i>E.coli</i> с нормальной ферментативной активностью	$5,89 \pm 0,79$	$3,64 \pm 1,25^{**}$	$5,48 \pm 0,20^{**}$
<i>E.coli</i> со сниженной ферментативной активностью	$4,50 \pm 0,86$	$4,30 \pm 0,94$	$4,48 \pm 0,38$
<i>Enterobacter</i> spp.	$5,92 \pm 0,77$	$4,48 \pm 1,24^*$	$4,80 \pm 0,97$
<i>Proteus</i> spp.	$4,02 \pm 1,28$	$0,57 \pm 0,64^{**}$	$1,40 \pm 0,89^*$
<i>Klebsiella</i> spp.	$4,16 \pm 1,06$	$1,36 \pm 1,01^*$	$4,83 \pm 0,22^{**}$
<i>Morganella</i> spp.	$2,67 \pm 1,08$	$1,47 \pm 1,10^*$	$1,32 \pm 0,84$
<i>Enterococcus</i> spp.	$1,22 \pm 0,81$	$3,96 \pm 1,07^{**}$	$4,48 \pm 0,38$
<i>Staphylococcus</i> (коагулазоотрицательные)	$4,10 \pm 1,31$	$0,92 \pm 0,69^*$	$5,68 \pm 0,22$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$4,53 \pm 1,17$	$7,27 \pm 0,24^{**}$	$0,84 \pm 0,84^{**}$
<i>Candida</i> spp.	$5,36 \pm 1,05$	$7,23 \pm 0,22^{**}$	$5,48 \pm 0,20^*$
<i>Pseudomonas</i> spp.	$3,82 \pm 0,97$	$1,96 \pm 0,88^*$	$2,00 \pm 0,90$

Примечание: x- $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «физиологический раствор», xx- $p \leq 0,01$ по сравнению с группой «физиологический раствор», * – $p \leq 0,05$ по сравнению с группой «физиологический раствор + иммобилизационный стресс», ** - $p \leq 0,01$ по сравнению с группой «физиологический раствор + иммобилизационный стресс».

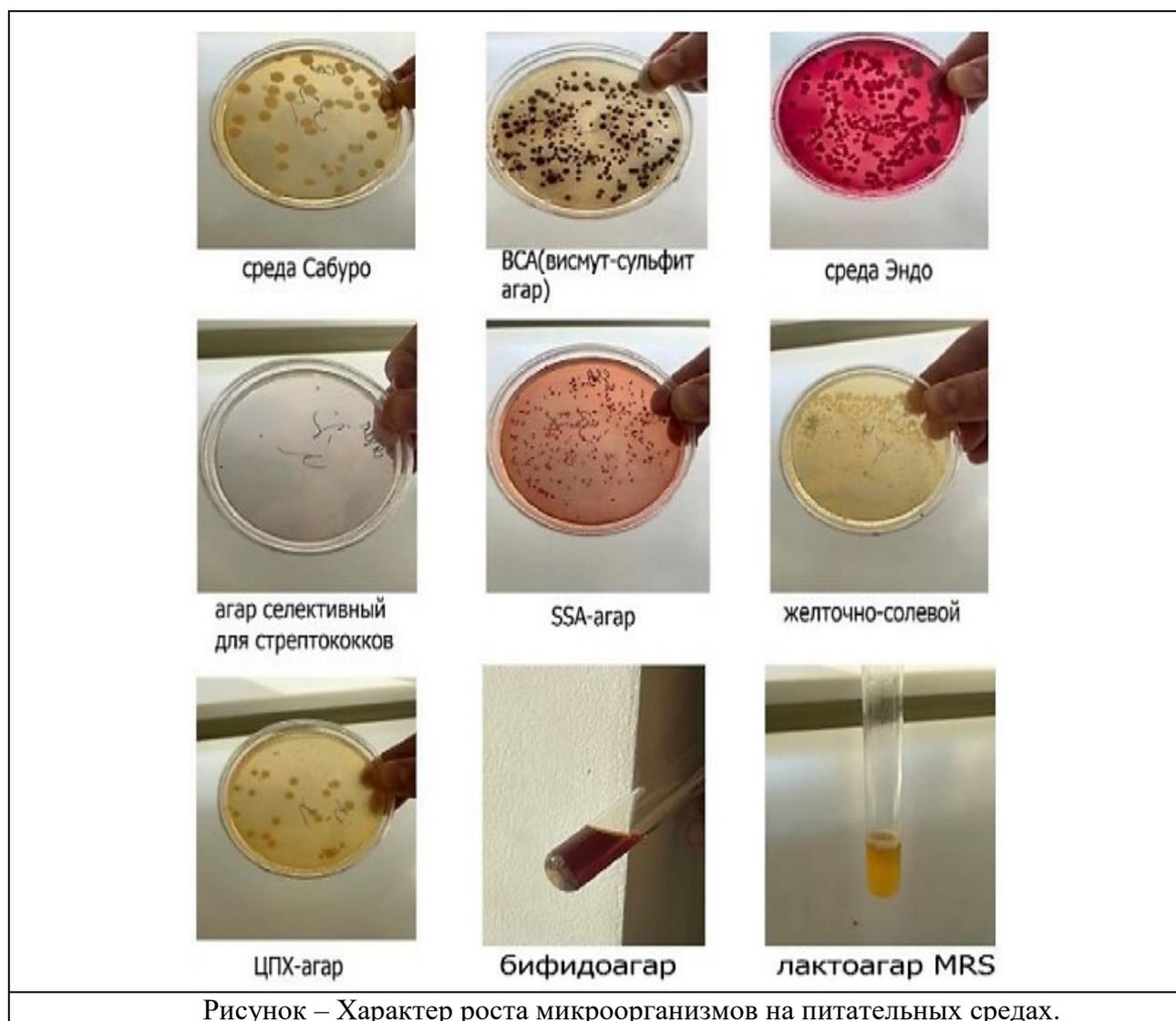
Во второй группе, подвергшейся введению физиологического раствора и влиянию ХИС, наблюдалось снижение *Enterobacter* в 1,3 раза по сравнению с контрольной (соответственно $\lg 5,92 \pm 0,77$ и $\lg 4,48 \pm 1,24$).

По ряду микроорганизмов отмечалось снижение количественных показателей \lg КОЕ/г в группе введения физиологического раствора стрессированным животным: *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Pseudomonas* spp. Так в 7 раз – по протею, в 3 раза – по клебсиеллам и в 1,9 раз – по псевдомонадам.

При введении Селанка в дозе 80 мкг/кг и последующем моделировании стресса (третья группа – «Селанк 80 мкг/кг + иммобилизационный стресс») производился сравнительный анализ со второй группой, подвергавшейся только воздействию ХИС.

Содержание лактобактерий снизилось в третьей группе и составило $\lg 9,25 \pm 1,20$ против $10,10 \pm 0,73$ во второй группе. Содержание бифидобактерий в третьей увеличилось в 1,2 раза и составило $\lg 11,25 \pm 0,19$ против $9,33 \pm 1,08$ во второй группе.

В третьей группе фиксировалось изменение количественного показателя по кишечной палочке с нормальной ферментативной активностью в сторону увеличения в 1,5 раза ($\lg 5,48 \pm 0,20$). При этом прослеживалось восстановление исходного числа эшерихий со сниженной ферментативной активностью ($\lg 4,50 \pm 0,86$ – в первой группе, $\lg 4,48 \pm 0,38$ – в третьей группе).



Содержание условно-патогенного золотистого стафилококка во второй группе («физиологический раствор + иммобилизационный стресс») составляло $\lg 7,27 \pm 0,24$, а в третьей группе (после воздействия Селанка в дозе 80 мкг/кг) их количество уменьшилось в 8,7 раз и составило $\lg 0,84 \pm 0,84$.

В составе микробиоценоза третьей экспериментальной группы выявлены грибы рода *Candida*, численность которых уменьшилась в 1,3 раза и стала составлять $\lg 5,48 \pm 0,20$.

Количество энтерококков в третьей группе увеличилось в 1,13 раза по сравнению со стрессированными животными второй группы и составило $\lg 3,96 \pm 1,07$ против с $\lg 4,48 \pm 0,38$ после введения препарата.

Количественный состав некоторых микроорганизмов при введении Селанка в дозе 80 мкг/кг вернулся к исходным значениям, зафиксированным в первой группе с введением физиологического раствора. Также прослеживалось увеличение коагулазоотрицательных стафилококков в 6,2 раза ($\lg 5,68 \pm 0,22$) и клебсиелл в 3,55 раза ($\lg 4,83 \pm 0,22$).

По другим микроорганизмам применение Селанка в дозе 80 мкг/кг имело менее прослеживаемый корригирующий эффект. К ним относятся псевдомонады, энтеробактерии, морганеллы. Низкая достоверность не позволяет оценить влияние препарата на кишечную микрофлору по показателям вышеприведенных микробов.

По результатам проведенной исследовательской работы можно отметить негативное влияние иммобилизационного стресса на состав мукозной микробиоты толстой кишки, стрессиндуцированное создание неблагоприятных условий для существования представителей нормальной микрофлоры (*Bifidobacterium*, *E. coli* с нормальной ферментативной активностью) и выгодных для интенсификации роста и размножения условно-патогенных микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, дрожжеподобные грибы рода *Candida*). Полученные в ходе эксперимента данные демонстрируют, что нейропептид Селанк оказывает корректирующее воздействие на качественный и количественный состав микробиоты толстой кишки при дисбиотических состояниях. При введении Селанка животным, подвергавшимся стрессу, наблюдалось увеличение численности доминантных представителей микрофлоры изучаемых животных, а также уменьшение числа условно-патогенных микроорганизмов (неоднозначные результаты прослеживались по численности энтерококка – увеличение при введении Селанка в дозе 80 мкг/кг, что может объясняться сезонными особенностями содержания животных, а также спецификой рецепторных механизмов влияния препарата в данной концентрации). Однако в целом полученные данные свидетельствуют о повышении устойчивости организма крыс к стрессу и его последствиям под воздействием Селанка. Так, состав микрофлоры стрессированных животных после введения Селанка в дозе 80 мкг/кг численно приблизился к составу микробиоты животных, не подвергавшихся воздействию стресса, за исключением ряда микроорганизмов, на которых введение препарата не оказало достоверно значимого эффекта (морганеллы, псевдомонады) или оказало негативный эффект (энтерококки). Исходя из полученных результатов, можно сделать вывод, что нейропептид Селанк в дозе 80 мкг/кг может успешно применяться не только для повышения устойчивости к стрессу, но и для коррекции стресс-индуцированного дисбиоза толстой кишки по определенным группам микроорганизмов.

Библиографический список

1. Морфологические изменения толстой кишки крыс при применении селанка в условиях хронического иммобилизационного стресса / А. Ю. Мухина, Е. С. Мишина, И. И. Бобынцев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 2. – С. 247-251.
2. Состав микробиоты толстой кишки крыс на фоне применения пептида АКТГ(4-7)-PGP (Семакс) в условиях иммобилизационного стресса / М. В. Свищева, А. Ю. Мухина, О. А. Медведева [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169. – № 3. – С. 330-333.

3. Молчанов И.П. Изменения нормофлоры толстой кишки крыс под воздействием хронического иммобилизационного стресса // Молодежная наука и современность: Материалы 87-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых. – К.: Курский государственный медицинский университет, 2022. – С. 72-74.
4. Влияние селанка на морфологическое состояние гепатоцитов крыс при остром иммобилизационном стрессе / Е. В. Фоменко, А. В. Иванов, И. И. Бобынцев [и др.] // Человек и его здоровье. – 2017. – № 4. – С. 108-114. – DOI 10.21626/vestnik/2017-4/19.
5. Morphofunctional State of the Large Intestine in Rats under Conditions of Restraint Stress and Administration of Peptide ACTH(4-7)-PGP (Semax) / M. V. Svishcheva, Y. S. Mishina, O. A. Medvedeva [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Vol. 170. – No 3. – P. 384-388.

ПЕРСИСТЕНЦИЯ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА

Москвина Е.В., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Были проанализированы научные статьи и исследования различных научных организации, исследующих, как сахарный диабет и причины его возникновения, так и патогенность золотистого стафилококка и его особенности, для исследования возможности становления золотистого стафилококка фактором риска развития сахарного диабета II типа.

Ключевые слова: золотистый стафилококк, сахарный диабет II типа.

THE PERSISTENCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS IN THE HUMAN BODY AS A RISK FACTOR FOR THE DEVELOPMENT OF TYPE II DIABETES

Moskvina E. V., Soboleva O. M.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. Have been analyzed scientific articles and studies of various scientific organizations investigating both diabetes mellitus and its causes, and the pathogenicity of Staphylococcus aureus and its features were analyzed to investigate the possibility of Staphylococcus aureus becoming a risk factor for type II diabetes mellitus.

Keywords: Staphylococcus aureus, type II diabetes.

Сахарный диабет является одним из самых распространенных хронических заболеваний, причины возникновения которого до сих пор до конца неизвестны. Сам по себе он представляет собой гетерогенное первичное нарушение углеводного обмена, включающее в себя дефицит инсулина или инсулинорезистентность, или и то, и другое. Выделяют два основных типа сахарного диабета: диабет I типа (так называемый ювенильный диабет, развивающийся в основном у лиц молодого возраста), или инсулинозависимый сахарный диабет, характеризующейся недостаточным синтезом (или полным его отсутствием) эндогенного инсулина в β -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы, приводящим к накоплению глюкозы в кровяном русле – гипергликемии, одними из причин сахарного диабета I типа на данный момент выделяют различного рода аутоиммунные поражения β -тропными вирусами; диабет II типа, или инсулиннезависимый сахарный диабет, представляющий собой инсулинорезистентность, обусловленную недостаточной экспрессией инсулиновых рецепторов, снижением сродства к связыванию инсулина, или другим эндогенным фактором, напрямую влияющим на передачу сигнала инсулина. Также больные сахарным диабетом II типа могут страдать и от относительного дефицита инсулина в крови.

На данный момент, по разным данным, сахарным диабетом болеет около 400 миллионов людей по всему миру. В России, по данным государственного регистра больных сахарным диабетом, зарегистрировано около 5,2 миллионов. Наиболее распространен сахарный диабет II типа, им в России болеет около 5 миллионов человек, число больных сахарным диабетом I типа составляет около 400-500 тысяч человек, при этом около 50% больных сахарным диабетом в России не подозревают о наличии у себя данного заболевания. Средняя продолжительность жизни больных сахарным диабетом I типа: мужчины до 56 лет, женщины до 60 лет; сахарным диабетом II типа: мужчины до 72, женщины до 75 лет. Диабет занимает 4 место среди болезней, которые становятся причинами летального исхода, по разным данным в год умирает около 4 миллионов человек. Почти половина больных диабетом находится в возрастной категории 40-59 лет.

В процессе прогрессирования, сахарный диабет может привести к серьезным осложнениям, включая сердечную недостаточность, почечную недостаточность, слепоту, артериальные заболевания и язвы диабетической стопы, к нарушению обмена веществ, повреждению кровеносных сосудов, в том числе ишемическая болезнь сердца (инфаркты и стенокардия), инсульты, заболевания периферических сосудов, которые приводят к онемению, покалыванию и боли в ногах. Стоит еще отметить повышение привлекательности лиц, болеющих диабетом, для микробов и грибов, из-за высокой концентрации сахара в тканях и жидкостях организма. Сочетание сосудистых, нейропатических и кожных эффектов повышает риск развития инфекций, связанных с сахарным диабетом, включая синдром диабетической стопы, который может привести к ампутациям и смерти.

При появлении у человека такого заболевания, как сахарный диабет, стоит отметить, что болеть начинает весь организм. Выше перечисленные осложнения являются проявлением следующих синдромов: нефропатия – нарушение эндотелия клубочков, ведущее к почечной недостаточности; макроангиопатия – формирование атеросклероза, и как следствие ИБС; микроангиопатия; нейропатия; ретинопатия. В этиологии сахарного диабета среди факторов, способствующих развитию и влияющих на его течение, отмечают вирусные инфекции, к примеру, вирус Коксаки, вирус кори и так далее. Также факторами риска выделяют наличие сахарного диабета в анамнезе, возраст пациента, масса новорожденного более 4 кг для женщин, артериальная гипертензия, гипертриглицеридемия, снижение холестерина ЛПВП, повышение ЛПНП, ожирение [1].

Так называемое «лечение» сахарного диабета I типа, и для многих больных сахарным диабетом II типа, на данный момент представляет собой инсулинотерапию, в которой, в зависимости от числа инъекций в день и типов применяемого инсулина, формируется различная схема лечения, индивидуальная для каждого больного сахарным диабетом с различной интенсивностью приема инсулина. Для больных сахарным диабетом II типа могут быть эффективны пероральные гипогликемические лекарственные средства, лекарственные средства, влияющие на секрецию инсулина поджелудочной железой, или снижающие её инсулинорезистентность, однако, около 50% больных не реагируют на данные лекарственные средства или перестают реагировать через 1-2 года после начала приема. Эффективного контроля за уровнем глюкозы трудно достичь даже в случае тщательной инсулинотерапии. В качестве возможного лечения продолжает исследоваться возможность трансплантации поджелудочной железы или островковых клеток, продуцирующих инсулин [2].

Одним из основных и самых главных методов поддержания здоровья собственного организма при данном заболевании служит строгое соблюдение диеты – 9 стол. Режим

физических нагрузок является важной частью с борьбой с абдоминальным ожирением, почти всегда возникающим при сахарном диабете, и несущем для больного организма тяжелые последствия. Витаминотерапия, прием статинов и блокаторов кальциевых каналов – залог правильного терапевтического лечения сахарного диабета.

Что же может стать своеобразной профилактикой возникновения сахарного диабета? Контроль уровня глюкозы и холестерина по результатам ежегодных диспансеризаций, поддержание правильной физической формы, укрепление иммунитета, профилактика инфекционных заболеваний и контроль артериального давления.

Вернемся к возможной связи сахарного диабета со стафилококковой инфекцией. Около 80% пациентов с диагностированным диабетом II типа, также имеют диагноз ожирение. Само по себе ожирение означает избыточные жировые отложения в подкожной клетчатке, органах и тканях. Ожирение проявляется увеличением массы тела на 20 и более процентов от средних величин за счет жировой ткани, а также повышает риск развития атеросклероза, ИБС, гипертонии, инфаркта миокарда, инсульта, сахарного диабета, поражений почек, печени, а также инвалидности и смертности от этих заболеваний. При ожирении несоответствие между поглощением и окислением жирных кислот приводит к чрезмерному накоплению триацилглицерина и метаболитов жирных кислот в скелетных мышцах, что может привести к снижению скорости передачи сигналов инсулина и утилизации глюкозы. Кроме того, возможно усиление регуляции продукции воспалительных цитокинов адипоцитами после воздействия эндотоксина, к примеру, эндотоксинов золотистого стафилококка, и воздействия окружающей среды. Подобные длительные воздействия приводят к хронической форме воспаления, а также к инсулинорезистентности, что в конечном итоге может способствовать развитию СД. Микробиом также изменяется при ожирении. В кишечнике наблюдается преобладание грамположительных организмов, в том числе стафилококков.

У людей с избыточной массой тела, в том числе происходит избыточное потоотделение. Само по себе потоотделение необходимо для нормального функционирования организма, вместе с потом выделяется лишняя влага и вредные вещества – мочевая кислота, креатинин, соединения серы, холестерин, различные соли. Данный процесс регулируется продолговатым мозгом, передающим команды через нервную систему потовым железам. Стресс, волнение, повышение окружающей температуры, физическая нагрузка несомненно имеют влияние на потоотделение человека.

Избыточный вес и ожирение, как и потоотделение, также связаны с развитием сахарного диабета II типа у человека, несмотря на сильную взаимосвязь между наследственностью и СД 2 типа, представляя высокий риск колонизации золотистым стафилококком.

Увеличенное потоотделение же повышает колонизацию на кожи *S. Aureus*. *Staphylococcus aureus*, или же золотистый стафилококк – это условно-патогенная бактерия, представляющая собой грамположительные неподвижные кокки, принадлежащие к семейству микрококков.

Многие органы и системы могут быть пораженными золотистым стафилококком. Чаще всего золотистый стафилококк является возбудителем заболевания кожи и ее придатков. Инфекция в большинстве случаев ограничена областью поражения. Однако, данный микроорганизм способен попасть в кровоток и распространиться на отдаленные органы и ткани, вызывая нарушение толерантности к глюкозе, системные воспаления различного рода и повышенный уровень эндотоксина в кровотоке.

Примерно 11%-40% людей заражены стафилококковой инфекцией. В большей степени стафилококк передается при прямом контакте между людьми, однако, стафилококк также

остаётся жизнеспособным на различных поверхностях, контакт с которыми может вызвать инфекционное заболевание. Золотистый стафилококк имеет свойство ферментировать маннитол, продуцировать гемолизин, разнообразные токсины, проявляет наибольшую биохимическую активность, чем другие представители рода. Кроме того, стафилококки выделяют липазы (гидролазы сложного эфира глицерина), которые детоксицируют антимикробные липиды кожи. В ответ на инфекцию золотистого стафилококка в качестве быстрого реагирования, до формирования полноценного многоуровневого иммунного ответа, одними из первых активируются адипоциты. Адипоциты – округлые клетки жировой ткани, выполняющие множественные функции в организме человека: накопление жира, обеспечение теплоизоляции и защиты органов от механических повреждений, участие в эндокринной регуляции, путём синтеза целого ряда гормонов, называемых адипокинами (или адипоцитокинами), одним из представителей которых будет адипонектин (один из регуляторов уровней глюкозы и распада жирных кислот), а также участием в формировании антимикробных пептидов.

На вопрос о том, как именно адипоциты осуществляют защиту организма от стафилококковой инфекции, следует простой ответ: дело в том, что в ответ на инфекцию, возрастает количество полноценно созревших адипоцитов, в которых резко увеличено количество семейства антимикробных пептидов-кателицидинов, обладающих широким спектром антимикробной активности.

Вернемся немного назад к адипонектинам, синтезируемым адипоцитами. Мы уже знаем, что золотистый стафилококк стимулирует адипоциты к синтезу кателицидинов, при этом снижая уровень адипонектинов в адипоцитах, при помощи ТСТШ-1 (токсина синдрома токсического шока-1) (TSST-1), который является прототипом суперантигена, секретируемого непосредственно золотистым стафилококком. Впервые TSST-1 был описан в 1927 году Франклином Стивенсом как стафилококковая скарлатина, позднее другая группа ученых в 1978 г. дали синдрому привычное теперь название – синдром токсического шока, для помощи в описании системных заболеваний у детей, вызываемых неинвазивным *S. aureus*. Патогенез TSST-1 обусловлен цитокиновым штормом и системному воспалению, формирующимися вследствие массивной активации Т-клеток у лиц, не имеющих нейтрализующих антител. Данный синдром характеризуется лихорадкой, сыпью, гипотензией [3].

Стафилококковые суперантигены представляют собой большое семейство иммуностимулирующих экзотоксинов, продуцируемых золотистым стафилококком, с молекулярной массой от 26 до 34 кД, содержащие 239-296 аминокислотных остатков и имеющие одну дисульфидную связь. Стафилококковый суперантиген принято считать напрямую связанным с синдромом токсического шока, являясь одним из его возможных возбудителей. Стафилококковые суперантигены включают в себя и стафилококковые экзотоксины самого стафилококка, так и токсин синдрома токсического шока, а также энтеротоксиноподобные белки.

Стоит обозначить MRSA (метициллин-резистентный золотистый стафилококк). Это антибиотикорезистентный золотистый стафилококк, выделяемый как внутрибольничная инфекция. Ранее одним из основных препаратов для лечения заболеваний стафилококком считался пенициллин, до появления устойчивых к антибиотику штаммов. Резистентность к пенициллину обусловлен у данного штамма вырабатываемым им ферментом – β -лактамазой, в свою очередь разрушающей лактамное кольцо пенициллина, что делает его не способным к антимикробному действию. Принято считать, что около 80% штаммов *S. aureus* способны к

синтезу данного фермента. Для корректирования данной проблемы было использовано введение полусинтетических пенициллинов, устойчивых к ферменту, что, к сожалению, помогло ненадолго [4]. В конце XX века были установлены штаммы *Staphylococcus aureus*, нечувствительные к данной группе антибиотиков, в частности к оксациллину и метициллину. Это было связано продуцированием *S. aureus* пенициллин-связывающего белка (ПСБ). Лабораторная диагностика MRSA основывается на использовании маркерного антибиотика цефокситина, обладающего большей чувствительностью, чем оксациллин. Для разрешения проблемы метициллин-резистентного золотистого стафилококка необходимо проведение профилактических и противоэпидемических мероприятий, прежде всего внутрибольничных. На конец 2016 г. в России, из общего процента золотистого стафилококка, MRSA насчитывалось ниже 25% [5].

В процессе исследования, проводимого на кроликах, для создания предположительной модели влияния суперантигена стафилококка на разные структуры организма, было выявлено, что суперантиген (TSST-1), вырабатываемый золотистым стафилококком, вызывает усиление липолиза в жировой ткани, увеличение воспаления адипоцитов и, как следствие, повышение сахара в крови, а также инсулинорезистентность в тканях [6, 7]. В совокупности результаты показали, что длительное воздействие суперантигена, например, TSST-1 может привести к таким серьезным последствиям, как возникновение СД II типа. Это непосредственно можно проследить уже от начала возникновения инсулинорезистентности суперантигеном золотистого стафилококка, возбуждающего системные воспаления в организме больного [8].

S. aureus имеет широкий спектр факторов вирулентности и токсинов, позволяющих ему противостоять различным клеткам нашей иммунной системы, путем разрушения мембран клеток, отвечающих за иммунную защиту организма. Например, одними из часто описываемых токсинов выделяют: HlgAB и HlgCB, а также PVL. Токсичность HlgAB и HlgCB складывается из действия нескольких субъединиц (S- и F-субъединицы), которые действуют преимущественно на моноциты, макрофаги и нейтрофилы. К сожалению, полный механизм их действия до конца не изучен, поэтому на данный момент стоит опираться только на предположения о их действии. Сложности в установлении полной картины механизма действия токсинов и ферментов золотистого стафилококка на организм человека также затрудняют подбор эффективного терапевтического лечения, усложняют решение задачи множественной резистентности у данного вида бактерий. Существуют не только метициллин-резистентные, но и стафилококки резистентные к макролидам, бета-лактамам, ингибиторам, фторхинолонам и клиндамицину. При тяжелом течении стафилококковой инфекции врачи прибегают к использованию внутривенной инъекции ванкомицина, однако стоит отметить о существовании резистентных и к ванкомицину стафилококков (VRSA).

Подводя итоги исследования, хочется отметить его важность для настоящего времени. Как говорилось ранее, сахарный диабет становится одной из самых острых и наиболее часто встречающихся болезней современности, что делает его изучение и изучение его факторов риска актуальными темами для различного рода исследований. Отвечая на ранее поставленный мною вопрос о золотистом стафилококке, как факторе риска заболевания сахарным диабетом второго типа, можно смело сказать, что взаимосвязь действительно существует, и золотистой стафилококк может стать своеобразным «толчком» к приобретению сахарного диабета II типа. Стоит отметить, что с каждым годом возрастает внимание к проблеме возникновения сахарного диабета II типа, а также к взаимосвязи этого возникновения с патогенными и условно-патогенными микроорганизмами, что увеличивает число исследований, ведущимися многими современными учеными с целью установления

механизма развития сахарного диабета из-за различных факторов риска. Это дает нам надежду на возможность дальнейшего предотвращения развития сахарного диабета II типа, путем применения профилактических мер к патогенным и условно-патогенным микроорганизмам.

Библиографический список

1. Мухин Н.А., Моисеев В.С, Пропедевтика внутренних болезней. М.: ГЭОТАРМедиа, 2020. С.558–565
2. Н.Т. Старковой. Руководство по клинической эндокринологии. М.: Медицина, 1991. С.226-231
3. Kelly N Messingham, Michael P Cahill, Samuel H Kilgore, Ananya Munjal, Patrick M Schlievert, Janet A Fairley, TSST-1+Staphylococcus aureus in Bullous Pemphigoid, 2021; 142(4):1032-1039.e6. DOI: 10.1016/j.jid.2021.08.438.
4. Карташова Г.П., Метициллин-резистентный Staphylococcus aureus (MRSA). Механизмы резистентности. Чувствительность к антибиотикам. Лабораторная диагностика. 2017 [Электронный ресурс] <http://kkb.chita.ru/assets/files/documents/specialistam/mrsa-lkm.pdf>
5. Процент инвазивных изолятов Staphylococcus aureus, устойчивых к метицилину (MRSA) [Электронный ресурс] https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/amr_23-methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa/
6. Patrick Schlievert, Wilmara Salgado-Pabón, Aloysius J Klingelutz, Does Staphylococcus aureus have a role in the development of Type 2 diabetes mellitus? Future Microbiology. 2015; 10(10) DOI: 10.2217/fmb.15.95
7. Olivia N Chuang-Smith , Patrick M Schlievert , Staphylococcal Enterotoxin C Subtypes Are Differentially Associated with Human Infections and Immunobiological Activities, 2021; 6(1):e01153-20, DOI: 10.1128/mSphere.01153-20.
8. Bao G. Vu, Christopher S. Stach, Katarina Kulhankova, Wilmara Salgado-Pabón, Klingelutz Aloysius J., Schlievert Patrick M., Chronic superantigen exposure induces systemic inflammation, elevated bloodstream endotoxin, and abnormal glucose tolerance in rabbits: possible role in diabetes. mBio. 2015; 6 (2); DOI: 10.1128/mBio.02554-14

ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СТАФИЦИНА В КОМБИНАЦИИ С РИФАМПИЦИНОМ, ТИКАРЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНАТОМ И ФОСФОМИЦИНОМ В ОТНОШЕНИИ НЕКОТОРЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Никитина А.П., Панкратов Д.Л.

*Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия*

Аннотация. 35 антибиотиков, имеющих различные механизмы действия, были исследованы в комбинации с исследуемым антимикробным препаратом “Стафицин”, который выступает в качестве возможного потенциатора, против 5 грамотрицательных штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью. 18 исследуемых препаратов оказали антимикробную активность по отдельности по отношению к 5 грамотрицательным штаммам. 3 антибиотика, обладающие некоторой противомикробной активностью по отдельности, в комбинации с препаратом – кандидатом “Стафицин” усилили действие и показали высокий антимикробный эффект.

Ключевые слова: потенцирующее действие, стафицин, множественная лекарственная устойчивость.

TICARCILLIN+CLAVULANATE AND PHOSPHOMYCIN AGAINST SELECTED GRAM-NEGATIVE MICROORGANISMS

Nikitina A. P., Pankratov D. L.

First Pavlov State Medical University of St. Petersburg, St. Peterburg, Russia

Abstract. 35 antibiotics with different mechanisms of action were tested in combination with the investigational antimicrobial drug “Staphycin”, which acts as a possible potentiator, against 5 gram-negative multidrug-resistant strains. The 18 studied preparations showed antimicrobial activity individually against 5 Gram-negative strains. 3 antibiotics, having some antimicrobial activity separately, in combination with the candidate drug “Staphycin” enhanced the action and showed a high antimicrobial effect.

Keywords: potentiation effect, Staphycin, multidrug resistance.

Множественная лекарственная устойчивость – это пандемия в современном мире, которая угрожает своевременному развитию современной медицины. Из-за медленных темпов синтеза новых антибиотиков, высокой стоимости препаратов, отсутствия достаточно эффективных препаратов для монотерапии, проблема множественной лекарственной устойчивости растет с каждым днем. Так, например, в структуре внутрибольничных инфекций число случаев заболеваний, вызванных МЛУ, составляет от 16% до 20% [3]. Комбинированная терапия антибиотиками, которая активно используется в природных системах, но практически не изучена в области медицины, может обеспечить решение проблемы множественной устойчивости. Одним из новейших подходов в современной антибиотикотерапии является

создание комбинаций антибиотиков с веществами – потенциаторами. Под потенцирующим действием понимают способность препарата, не обладающего самостоятельным антимикробным эффектом или же обладающим низкой эффективностью, усиливать действие другого средства, также обладающего низкой эффективностью, что дает возможность расширить спектр действия препаратов без необходимости синтеза новых. Работы, опубликованные ранее, показывают положительный эффект синергетического действия различных препаратов в отношении как грамположительных, так и грамотрицательных микроорганизмов [1, 4 – 9].

Одним из препаратов, предположительно способным оказывать потенцирующее действие является стафицин. Стафицин представляет собой противомикробное средство, антимикробный эффект которого обусловлен подавлением синтеза бактериальной ДНК, и в основном направлен на борьбу с грамположительными микроорганизмами, в частности с *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., на грамотрицательные организмы оказываемый им эффект незначителен.

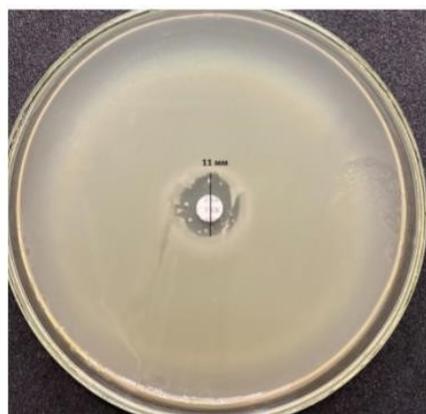
Для исследования были выбраны антибактериальные средства в концентрациях, не способных вызвать значительное подавление роста исследуемых штаммов грациликотных микроорганизмов. В исследовании изучался антибактериальный эффект 35 противомикробных средств. Были взяты: азитромицин, амикацин, амоксициллин + клавулановая кислота, ампициллин, ампициллин + сульбактам, бензилпенициллин, ванкомицин, гентамицин, доксицилин, имипенем, карбенициллин, кларитромицин, клиндамицин, левомицетин, левофлоксацин, линезалид, линкомицин, меропенем, неомицин, норфлоксацин, рифампицин, роскитромицин, спарфлоксацин, стрептомицин, тикарциллин + клавуланат, тобрамицин, триметаприм + сульфаметоксазол, фосфомицин, фузидин, цефазолин, цефатоксим, цефоперазон, цефтазидим, ципрофлоксацин, эритромицин.

Исследование проводилось в два этапа. На первом этапе методом серийных разведений определялась минимальная подавляющая концентрация (МПК) стафицина для 5 штаммов грамотрицательных бактерий: *Pseudomonas aeruginosa* VT-20, *Klebsiella pneumoniae* VT-124, *Escherichia coli* VT-25, *Escherichia coli* VT-47, *Escherichia coli* VT-XL blue. На втором этапе исследовалось потенцирующее действие стафицина в комбинации с выбранными антибиотиками. Синергетическое действие антимикробных средств оценивалось по чувствительности микроорганизмов диско-диффузионным методом согласно МУК 4.2.1890-04 и стандартам, рекомендуемым Институтом клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, США) [2] в двух категориях: с добавлением стафицина в среду в концентрации 50 мкг/мл и без добавления стафицина. Для получения статистически достоверных данных каждая экспериментальная точка повторялась трижды.

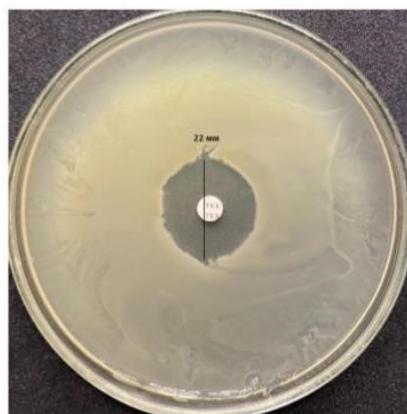
В ходе исследования были получены данные, согласно которым происходило увеличение диаметра зоны подавления роста микроорганизмов для исследуемых противомикробных средств в среде, содержащей стафицин в сравнении с контролем. Из 35 исследованных антибиотиков 18 препаратов показали достаточный самостоятельный эффект, 14 препаратов не изменили своей активности при добавлении стафицина в среду, но 3 препарата при добавлении стафицина продемонстрировали усиление своего эффекта. А именно: рифампицин, тикарциллин+клавуланат, фосфомицин. Так, увеличение диаметров зон подавления роста произошло для рифампицина и фосфомицина в отношении всех исследуемых микроорганизмов и тикарциллин+клавуланата в отношении *Klebsiella pneumoniae* VT-124. Данные представлены в Таблице. На рисунке наглядно продемонстрирован потенцирующий эффект стафицина (Рисунок).

Таблица – Диаметр зоны подавления роста микроорганизмов для исследуемых противомикробных средств

Микроорганизм	Антибиотик	Средний диаметр зон подавления роста в контроле, мм	Средний диаметр зон подавления роста в среде со стафицином, мм	T-критерий Стьюдента
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VT-20	Рифампицин	0	12	0.002306808147352
	Фосфомицин	8	18	0.023387851018782
<i>Klebsiella pneumoniae</i> VT-124	Рифампицин	0	10	0.003316758722357
	Тикарциллин + клавуланат	11	22	0.041361725272691
	Фосфомицин	8	18	0.008810744433296
<i>Escherichia coli</i> VT-25	Рифампицин	12	17	0.013072457560347
	Фосфомицин	16	22	0.041576782619895
<i>Escherichia coli</i> VT-47	Рифампицин	7	12	0.003883509816495
	Фосфомицин	11	17	0.002758625945192
<i>Escherichia coli</i> VT-XL blue	Рифампицин	12	20	0.034090791198642
	Фосфомицин	10	17	0.010899508038828



а



б

Рисунок – Диаметр зон подавления роста *Klebsiella pneumoniae* VT-124 препаратом Тикарциллин + клавуланат, без добавления в среду стафицина (а) – 11 мм, и с добавлением (б) – 22 мм.

Согласно полученным данным, можно сделать вывод о том, что стафицин может быть рассмотрен как препарат – кандидат для потенцирования действия антимикробных средств, однако требуются дальнейшие исследования *in vitro* и *in vivo*.

Библиографический список

1. Baker KR, Jana B, Hansen AM, Nielsen HM, Franzyk H, Guardabassi L. Repurposing Azithromycin and Rifampicin Against Gram-Negative Pathogens by Combination With Peptidomimetics // *Front Cell Infect Microbiol*. 2019 Jul 2; 9 : 236.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 978-1-68440-066-9 [Print]; ISBN 978-1-68440-067-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020
3. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections – an overview. *Infect Drug Resist.* 2018 Nov 15; 11: 2321- 2333.
4. Klastersky J, Meunier-Carpentier F, Prevost JM, Staquet M. Synergism between amikacin and cefazolin against *Klebsiella*: in vitro studies and effect on the bactericidal activity of serum // *J Infect Dis.* 1976 Sep; 134 (3): 271 – 6.
5. Montgomery AB, Rhomberg PR, Abuan T, Walters KA, Flamm RK. Potentiation effects of amikacin and fosfomycin against selected amikacin-nonsusceptible Gram-negative respiratory tract pathogens // *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Jul; 58(7): 3714 – 9.
6. Mood EH, Goltermann L, Brolin C, Cavaco LM, Nejad AJ, Yavari N, Frederiksen N, Franzyk H, Nielsen PE. Antibiotic Potentiation in Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogenic Bacteria by a Synthetic Peptidomimetic // *ACS Infect Dis.* 2021 Aug 13;7(8):2152-2163.
7. Ni W, Shao X, Di X, Cui J, Wang R, Liu Y. In vitro synergy of polymyxins with other antibiotics for *Acinetobacter baumannii*: a systematic review and meta-analysis // *Int J Antimicrob Agents.* 2015 Jan;45(1):8-18.
8. Panlilio H, Lam AK, Heydarian N, Haight T, Wouters CL, Moen EL, Rice CV. Dual-Function Potentiation by PEG-BPEI Restores Activity of Carbapenems and Penicillins against Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae // *ACS Infect Dis.* 2021 Jun 11;7(6):1657-1665.
9. Zusman O, Avni T, Leibovici L, Adler A, Friberg L, Stergiopoulou T, Carmeli Y, Paul M. Systematic review and meta-analysis of in vitro synergy of polymyxins and carbapenems // *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Oct;57(10):5104-11.

ОСОБЕННОСТИ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ *NEISSERIA GONORRHOEAE* В МИКРОБИОТЕ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА

Оборин Д.А.¹, Годовалов А.П.²

¹ГКУЗ «Пермский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Пермь, Россия

²Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А. Вагнера Минздрава России, Пермь, Россия

Аннотация. В данном исследовании с помощью секвенирования участков гена 16S рРНК показано, что микробное разнообразие при острой генитальной гонококковой инфекции достаточно широко, а возбудитель формирует сложные отношения с другими бактериями в биотопе. Предполагаем, что в основе этих взаимоотношений лежит зависимость как *N. gonorrhoeae*, так и других ассоциантов от субстратов, по составу которых женские и мужские половые пути существенно различаются.

Ключевые слова: симбиотические взаимоотношения, *N. gonorrhoeae*, секвенирование гена 16S рРНК, острая генитальная гонококковая инфекция, лабораторная диагностика.

FEATURES OF NEISSERIA GONORRHOEAE SYMBIOTIC RELATIONSHIPS IN THE GENITAL TRACT MICROBIOTE

Oborin D.A.¹, Godovalov A.P.²

¹Perm Regional Center for the Prevention and Control of AIDS and Infectious diseases, Perm, Russia

²Acad. E.A. Wagner Perm State Medical University, Perm, Russia

Abstract. In this investigation, using sequencing of the 16S gene rRNA has shown that microbial diversity in acute genital gonococcal infection is widespread, and the pathogen forms complex relationships with other bacteria in the biotope. We assume that these relationships are based on the dependence of both *N. gonorrhoeae* and other associates on substrates, in the composition of which the female and male reproductive tracts differ significantly.

Keywords: symbiotic relationship, *N. gonorrhoeae*, sequencing 16S rRNA gene, acute genital gonococcal infection, laboratory diagnostics.

Согласно канонам классической медицинской микробиологии, выделение культуры патогенного микроорганизма является достаточным основанием для подтверждения диагноза инфекционного заболевания. Так, например, при предположительном диагнозе «острая генитальная гонококковая инфекция» (ОГГИ) осуществляют посев материала на селективные среды с последующим изучением стандартного набора свойств изолированного штамма.

Однако, рост числа нетипичных форм ОГГИ и ассоциированная с ним частота диагностических ошибок, очевидно, нуждается в разработке новых подходов к микробиологической расшифровке подобных состояний. Отчасти такая ситуация может быть связана с присутствующими в биотопе условно патогенными микроорганизмами, которые формируют разнонаправленные симбиотические отношения с гонококками. В результате этого меняется функциональная активность ассоциантов, спектр синтезируемых ими метаболитов и чувствительность к действию факторов внешней среды.

В исследованиях Płaczkiiewicz *et al.* [9] показано, что *L. crispatus* ингибируют рост *N. gonorrhoeae* и их прикрепление к клеткам человека. В других исследованиях показано, что спектр лактобактерий у женщин зачастую не включает этот вид, а среди доминантных видов могут быть – *L. johnsonii*, *L. gasseri*, *L. kunkeei* и *L. jensenii* [1], которые не оказывают на гонококк такого влияния [10]. Для генитального тракта мужчин установлено, что в присутствии *N. gonorrhoeae* в большом числе случаев изолируют облигатно анаэробные микроорганизмы [11], возможное участие которых в патогенезе не доказано. В то же время вопрос о значимости степени обсемененности материала детектируемым патогеном, в особенности на фоне микробного разнообразия при атипичной клинике, также остается дискуссионным. Авторы отмечают, что, присутствуя в микробном сообществе в меньшинстве, некоторые бактерии способны обуславливать клинически значимые состояния. Так, Lagier *et al.* [8] указывают, что при использовании молекулярно-генетических методов могут быть «пропущены» клинически значимые виды микроорганизмов. В проведенных нами ранее исследованиях [2] возникал вопрос об этиологической значимости моракселл, выявленных у многих пациентов в достаточно большом количестве при отсутствии каких-либо клинических признаков инфекционно-воспалительного процесса.

Целью исследования явилось изучение спектра сопутствующей микрофлоры и характера складывающихся с ней отношений *N. gonorrhoeae* при ОГГИ. В исследование включили 45 человек репродуктивного возраста с характерными клиническими проявлениями и предположительным клиническим диагнозом ОГГИ, от которых получали образцы эякулята, содержимого уретры и отделяемого заднего свода влагалища. Исследование проводилось с помощью метагеномного секвенирования гена 16S рРНК на платформе Illumina MiSeq с использованием набора MiSeq Reagent Kits v3 (600-Cycle Kit), согласно рекомендациям производителя. Для расшифровки участков V3-V4 гена 16S рРНК были использованы библиотеки согласно 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina.

Для оценки характера симбиотических отношений вычисляли коэффициент Жаккара, рассчитываемый по формуле: $q=c/(a+b-c) \times 100$, где a – число наблюдений с видом a , b – число наблюдений с видом b , c – число наблюдений, содержащих оба вида. При $q \leq 30\%$ – условия в биотопе антагонистические, при q от 30 до 70% бактерии способны к сосуществованию, а их экологическая общность велика (синергизм), $q \geq 70\%$ – возможно только совместное существование бактерий (мутуализм) [3]. Согласно полученным результатам, коэффициент альфа-разнообразия варьировал от 3 до 82. Для микрофлоры эякулята этот показатель составил $35,8 \pm 6,9$, а при исследовании содержимого влагалища – $27,7 \pm 5,9$ ($p < 0,05$).

В эякуляте мужчин совместно с *N. gonorrhoeae* во всех случаях присутствовали представители родов *Lactobacillus* и *Corynebacterium*. У этих же пациентов микроорганизмы родов *Enterococcus*, *Staphylococcus* и *Prevotella* обнаружены в 85,7% проб, а в 57,4% случаев детектировали *Psychrobacter* spp. и *Gardnerella* spp. Среди женщин с ОГГИ в отделяемом влагалища во всех пробах фиксировали *Lactobacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Staphylococcus* spp., *Psychrobacter* spp. Реже в этих же образцах (в 60%) выявляли *Enterococcus* spp. и *Peptoniphilus* spp. Маркеры других микроорганизмов были в незначительном количестве.

При анализе симбиотических отношений в группе мужчин выраженный мутуализм показан для *N. gonorrhoeae* и *Peptoniphilus* spp. (q=100), а также для *Psychrobacter* spp. (q=71). Симбиотические отношения в виде комменсализма *N. gonorrhoeae* формирует с *Prevotella* spp. (q=43), *Corynebacterium* spp. (q=41), *Lactobacillus* spp. (q=39). Антагонизм установлен в отношениях *N. gonorrhoeae* с *Enterococcus* spp. (q=25), *Gardnerella* spp. (q=17), *Atopobium* spp. (q=17), *Shewanella* spp. (q=12), *Porphyromonas* spp. (q=9), *Ureaplasma* spp. (q=8), *Streptomyces* spp. (q=6), *Mycoplasma* spp. (q=6). Гонококки вместе с *Morganella* spp., *Aerococcus* spp., *Bifidobacterium* spp. не встречали ни в одном случае.

У женщин *N. gonorrhoeae* ни с одним из выявленных микроорганизмов не формирует мутуалистические отношения. При этом гонококк оказался способным формировать симбиоз с *Prevotella* spp. (q=75), *Bifidobacterium* spp. (q=75), *Atopobium* spp. (q=60), *Gardnerella* spp. (q=60), *Corynebacterium* spp. (q=50), *Lactobacillus* spp. (q=50). Антагонистические свойства *N. gonorrhoeae* проявляет с *Psychrobacter* spp. (q=28), *Mycoplasma* spp. (q=12), *Enterococcus* spp. (q=5). Бактерии родов *Morganella*, *Shewanella*., *Peptoniphilus*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Streptomyces*, *Ureaplasma* совместно с *N. gonorrhoeae* у женщин не выделены ни в одном случае.

В ходе проведенных исследований установлено, что в эякуляте *N. gonorrhoeae* способны формировать мутуалистические взаимоотношения с пептонифилами и психробактерами, что может быть обусловлено синтрофией этих микроорганизмов. С другой стороны, оказалось, что в вагинальном биотопе сосуществование *N. gonorrhoeae* ни с одним из представителей условно патогенных микроорганизмов не является взаимовыгодным. Более того с психробактерами и пептонифилами они находятся в антагонизме. Такая, на первый взгляд, парадоксальная ситуация развивается в связи с разным составом субстратов в колонизируемых биотопах. Известно, что микроорганизмы рода *Peptoniphilus* способны образовывать уксусную кислоту, которая губительно действует на *N. gonorrhoeae* [4, 5], что и было подтверждено при изучении симбиотических отношений микроорганизмов в вагинальном биотопе. Для эякулята можно предположить, что образующийся ацетат расходуется другими мутуалистами гонококков – психробактерами, которые его утилизируют [7] и таким образом оказываются необходимыми друг для друга.

Микроорганизмы родов *Corynebacterium* и *Lactobacillus* являются комменсалами генитального тракта человека, особенно вагинального биотопа. Известно, что лактобактерии, продуцирующие молочную кислоту, оказывают негативное действие на свойства и жизнеспособность *N. gonorrhoeae* [5]. Однако нами ранее было установлено, что зачастую спектр лактобактерий, особенно у женщин с хроническими воспалительными заболеваниями, не содержит активных продуцентов лактата [1]. Коринебакетрии, в силу своей достаточно высокой способности адгезироваться к эпителию вагинального биотопа, могут использоваться гонококками для более успешной колонизации слизистой оболочки и формирования более массивных биопленок.

Аналогично описанным выше данным, гонококки формируют разнонаправленный симбиоз с гарднереллами и атопобиумами. Если в эякуляте это строго антагонистические отношения, то в вагинальном биотопе – синергические. Известно, что при бактериальном вагинозе, этиологическими агентами которого являются гарднереллы и атопобиумы, повышается содержание полиаминов. В свою очередь полиамины увеличивают резистентность гонококков к действию молочной и других кислот [6], что закономерно ведет к синергизму между этими микроорганизмами.

Таким образом, при внедрении в микросимбиоз генитального тракта *N. gonorrhoeae* регистрируются неоднозначные взаимоотношения с условно патогенными бактериями, что,

вероятно, определяется как составом субстратов в колонизируемом биотопе, так и биологическими особенностями ассоциантов. Очевидно, характер складывающихся при этом отношений может влиять на особенности клинических проявлений, что следует учитывать при лабораторной диагностике воспалительных заболеваний генитального тракта.

Библиографический список

1. Годовалов А.П., Карпунина Т.И. Состав микробиоты репродуктивного тракта женщин при бесплодии // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – Т. 97, № 1. – С. 77-85.
2. Годовалов А.П., Карпунина Н.С., Карпунина Т.И. *Moraxella osloensis* в микробиоте репродуктивного тракта при бесплодии: случайные находки или маркеры патологии? // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98, №1. – С. 28-35.
3. Захарова Е.А., Азизов И.С. Микрoэкологическая характеристика кишечного микробиоценоза часто болеющих детей // Журнал микробиологии. – 2012. – №2. – С. 63-68.
4. Aujoulat F., Mazuet C., Criscuolo A., Popoff M.R., Enault C., Diancourt L., Jumas-Bilak E., Lavigne J.P., Marchandin H. *Peptoniphilus nemausensis* sp. nov. A new Gram-positive anaerobic coccus isolated from human clinical samples, an emended description of the genus *Peptoniphilus* and an evaluation of the taxonomic status of *Peptoniphilus* species with not validly published names // Syst. Appl. Microbiol. – 2021. – Vol. 44(5). – P. 126235.
5. Breshears L.M., Edwards V.L., Ravel J., Peterson M.L. *Lactobacillus crispatus* inhibits growth of *Gardnerella vaginalis* and *Neisseria gonorrhoeae* on a porcine vaginal mucosa model // BMC Microbiol. – 2015. – Vol. 15. – P. 276.
6. Gong Z., Tang M.M., Wu X., Phillips N., Galkowski D., Jarvis G.A., Fan H. Arginine- and polyamine-induced lactic acid resistance in *Neisseria gonorrhoeae* // PLoS One. – 2016. – Vol. 11(1). – P. e0147637.
7. Hinsla-Leasure S.M., Koid C., Tiedje J.M., Schultzhaus J.N. Biofilm formation by *Psychrobacter arcticus* and the role of a large adhesin in attachment to surfaces // Appl. Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 79(13). – P. 3967-73.
8. Lagier J.C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C. Microbial culturomics: paradigm shift in the human gut microbiome study // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – Vol. 18(12). – P. 1185–93.
9. Płaczkiewicz J., Chmiel P., Malinowska E., Baćal P., Kwiatek A. *Lactobacillus crispatus* and its enolase and glutamine synthetase influence interactions between *Neisseria gonorrhoeae* and human epithelial cells // J. Microbiol. – 2020. – Vol. 58(5). – P. 405-414.
10. Pramanick R., Aranha C. Distinct functional traits of lactobacilli from women with asymptomatic bacterial vaginosis and normal microbiota // Microorganisms. – 2020. – Vol. 8(12). – P. 1949.
11. Rakhmatulina M.R., Boldyreva M.N., Lipova E.V., Chekmarev A.S., Galkina I.S. Evaluation of the composition of the microbiota of the urethra in men with sexually transmitted infections // Urologiia. – 2019. – Vol. (6). – P. 31-37.

ТРАНСФОРМАЦИЯ ФЕНОТИПА НК КЛЕТОК ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Орлова Е.Г., Логинова О.А., Ширшев С.В.

*Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия*

Аннотация. При беременности НК клетки приобретают регуляторный фенотип, мигрируют в матку и становятся там доминирующей субпопуляцией лимфоцитов. Децидуальные НК клетки с регуляторным фенотипом характеризуются сниженной цитотоксичностью к клеткам трофобласта и продукцией цитокинов, поддерживающих инвазивный рост синцитиотрофобласта. Трансформация фенотипа и функций НК клеток при беременности определяется эффекторами эндокринного и иммунного контроля, метаболическим статусом и децидуальным микроокружением.

Ключевые слова: НК клетки, регуляторный фенотип, беременность.

NK CELL PHENOTYPE TRANSFORMATION DURING PREGNANCY

Orlova E.G., Loginova O.A., Shirshov S.V.

«Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences» – branch of the PFRC of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

Abstract. During pregnancy NK cells shift to a regulatory phenotype, migrate to the uterus, and become the dominant subset of lymphocytes there. Decidual NK cells with a regulatory phenotype are characterized by reduced cytotoxicity against trophoblast and the production of cytokines that support the invasive syncytiotrophoblast growth. Transformation of NK cells phenotype and functions during pregnancy is determined by endocrine and immune control, metabolic status, and decidual microenvironment.

Keywords: NK cells, regulatory phenotype, pregnancy.

Беременность характеризуется изменением гормонального фона, основного обмена, и иммунореактивности, что приводит к формированию специфической иммунной толерантности к антигенам плода [1]. Помимо этого, клетки иммунной системы оказывают фетопротективную функцию, поддерживая инвазивный рост синцитиотрофобласта [1]. Важнейшая роль в изменениях иммунной реактивности при беременности и реализации фетопротективной функции принадлежит НК клеткам. НК клетки относятся к группе ИЛС (Innate Lymphoid Cells) и обладают выраженной цитотоксической активностью к вирус-инфицированным и опухолевым клеткам, а также способностью продуцировать цитокины. Более 90% НК клеток периферической крови имеют цитотоксический фенотип CD16⁺CD56^{dim}

[2, 3]. И лишь около 10% от общего числа НК клеток имеют фенотип CD16⁻CD56^{bright}, основной функцией которых является продукция цитокинов.

В периферической крови присутствуют как CD56^{dim}, так и CD56^{bright} НК клетки, секретирующие интерферон-гамма (IFN-gamma) и фактор некроза опухоли-альфа (TNF-alpha). При беременности количество цитотоксических CD16⁺CD56^{dim} НК клеток уменьшается, что необходимо для предотвращения реакций против антигенов плода. А количество НК клеток, продуцирующих интерлейкин-10 (IL-10) увеличивается, более чем в 20 раз [3]. При этом повышенное содержание цитотоксических CD16⁺CD56^{dim} НК клеток в периферической крови у женщин ассоциировано с привычным невынашиванием беременности [4]. В период ранней беременности НК клетки доминируют среди лимфоидных клеток децидуальной оболочки [4] и в течение первого триместра их количество увеличивается с 50 до 90%, главным образом, за счет миграции CD16⁻CD56^{bright} НК клеток из периферической крови [4]. Однако существуют и другие источники пополнения пула dNK, как их формирование из лимфоидных CD34⁺ предшественников в матке, а также пролиферации маточных НК *in situ*. Миграция CD16⁻CD56^{bright} НК из периферической крови в матку определяется ассоциированным с фазами менструального цикла или беременностью изменением гормонального фона и осуществляется посредством взаимодействия с хемокинами, продуцируемыми децидуальными клетками [4]. Периферические и децидуальные (d) CD56^{bright} НК клетки характеризуются сходным паттерном хемокиновых рецепторов [4]. Периферические CD56^{bright} НК клетки имеют высокий уровень экспрессии молекул L-селектина и CCR7, что ассоциировано как с хомингом к лимфатическим узлам, так и с их повышенным присутствием в плаценте во время беременности [5]. Однако дальнейшая трансформация и приобретение толерогенного фенотипа dNK находится под контролем факторов, продуцируемых децидуальным микроокружением.

dNK имеют фенотип CD9⁺CD49a⁺CD16⁻CD56^{bright}CD151^{bright}KIR⁺ [2,5] и отличаются от периферических CD16⁻CD56^{bright} НК клеток экспрессией CD9 и CD49a, продукцией цитокинов (TGF-beta 1, IL-10), хемокинов (IL-8, LIF), факторов роста сосудов (VEGF) и инсулиноподобного фактора роста (IGFBP-1) [2,5]. dNK обнаруживаются в непосредственной близости к спиральным артериям плаценты, что и определяет главенствующую роль dNK в формировании и моделировании роста спиральных артерий, регуляции инвазии трофобласта, имплантации и сохранении беременности [2,5]. В случае спонтанных абортс доля НК клеток, продуцирующих IFN-gamma и TNF-alpha, увеличивается. Однако при физиологически протекающей беременности IFN-gamma и TNF-alpha, продуцируемые dNK, участвуют в ангиогенезе.

dNK экспрессируют активационные (NKp46, NKp44, NKp30, NKG2D, CD94/NKG2C) и ингибиторные рецепторы (LILRB1, KIR2DL4, and CD94/NKG2A), имеют множество гранул, содержащих литические факторы (перфорин, гранулизин, гранзимы), однако характеризуются низкой цитотоксичностью в отношении клеток трофобласта [2,5].

dNK клетки играют значимую роль в обеспечении периферической иммунной толерантности в зоне маточно-плацентарного контакта, особенно на ранних сроках беременности, за счет контактного взаимодействия и продукции толерогенных цитокинов, индуцируют формирование регуляторных Т-лимфоцитов с супрессорной активностью (Treg), подавляя регуляторные Т-лимфоциты, продуцирующие IL-17 (Th17), активирующие провоспалительные реакции [4,5]. Снижение уровня dNK ассоциировано с преэклампсией, ранними спонтанными абортами, резорбцией плода и другими патологиями беременности [4].

К настоящему моменту известно, что гормональные и метаболические изменения, сопровождающие беременность, а также факторы, продуцируемые децидуальным

микроокружением, играют решающую роль для трансформации фенотипа NK клеток. Так, гормоны, продуцируемые плацентой на ранних сроках беременности, способствуют трансформации фенотипа NK клеток периферической крови с цитотоксического на регуляторный [6-8]. Реализация регуляторных эффектов гормонов опосредована усилением экспрессии ингибиторной молекулы NKG2A и L-селектина, принимающих участие в миграции CD16⁻CD56^{bright} NK клеток в матку. Гормоны беременности регулируют спектр продуцируемых NK клетками цитокинов, препятствуют продукции провоспалительных цитокинов, но усиливая выработку TGF-beta1 CD16⁻CD56^{bright} NK клетками.

TGF-beta1, продуцируемый в том числе и децидуальными макрофагами, способствует конверсии периферических NK в dNK, повышая экспрессию ингибиторной «checkpoint» молекулы Tim-3 (T-cell Ig and mucin domain-containing protein 3) на dNK [9]. «Checkpoint» молекулы являются корецепторными молекулами, передающими ингибиторный сигнал, главным образом, ограничивающий цитотоксические функции. Среди лимфоцитов NK имеют самый высокий уровень экспрессии TIM3 [9]. При беременности, экспрессия Tim-3 на NK клетках увеличивается, причем на dNK в значительно большей степени, чем на периферических NK [9]. Тогда как снижение уровня TIM3 на T-лимфоцитах и NK клетках ассоциировано со спонтанными абортами [9]. Лигандом к TIM3 является галатин-9 [9]. Ингибирующий сигнал при взаимодействии галатин-9 с TIM3 угнетает цитотоксичность NK клеток в отношении клеток трофобласта, препятствуя дегрануляции, выбросу перфорина, гранзима B [9]. Блокирование TIM3 сигналинга усиливает цитотоксичность dNK к клеткам трофобласта. TIM3⁺ dNK экспрессируют больше маркеров зрелости и активации (CD94, CD69), чем TIM3⁻ dNK. Сигналинг с TIM3 регулирует продукцию цитокинов dNK IFN-gamma и TNF-alpha, необходимых для ремоделирования и роста спиральных артерий [9].

Так, продуцируемый децидуальными клетками, гликоделин A, взаимодействует с молекулами L-селектина на CD16⁻CD56^{bright} NK клетках, что важно для ранних стадий дифференцировки dNK [5]. Однако зрелые dNK лишаются экспрессии L-селектина, что свидетельствует об участии других ассоциированных с беременностью факторов в дифференцировке dNK.

Реализация эффекторных функций NK клеток находится в строгой зависимости от метаболического статуса клетки. CD56^{bright} и CD56^{dim} NK клетки характеризуются разной метаболической активностью. Приобретение регуляторного фенотипа NK клетками сопровождается усиленным потреблением глюкозы и преимущественным переходом с окислительного фосфорилирования на субстратное с усилением аэробного гликолиза [10]. Так, NK-клетки CD56^{bright} обладают более высоким уровнем экспрессии белка-переносчика глюкозы и активностью mTOR (мишенью рапамицина в клетках млекопитающих), что способствует усилению гликолиза даже в условиях нормоксии, по сравнению с NK-клетками CD56^{dim} [10]. При этом снижение гликолиза в CD56^{bright} NK клетках значительно уменьшает продукцию IFN-gamma, однако базальная продукция IFN-gamma CD56^{bright} NK клетками зависит и от окислительного фосфорилирования [11]. Модуляция метаболической активности CD56^{bright} NK-клеток не влияла их дегрануляцию и продукцию гранзима B [11].

Молекулы гистосовместимости I класса HLA-E, продуцируемый клетками трофобласта, являющиеся лигандами для CD94/NKG2A и CD94/NKG2C на dNK, играют важную роль в регуляции метаболизма NK, усиливая гликолиз и окислительное фосфорилирование, что стимулирует секрецию IFN-γ и VEGFα при беременности [12].

Инкубация с цитокинами NK клеток модулирует их метаболический потенциал, однако реализация эффекторных функций в ответ на действие различных цитокинов зависит от продолжительности воздействия, степени зрелости и исходного уровня активации dNK.

Индукционное стимуляцией IL-15 увеличение скорости гликолиза и дыхания играет важную роль в активации и экспансии NK клеток [9-11].

В целом, можно заключить, что приобретение регуляторного фенотипа NK клетками в ответ на действие активационных стимулов зависит от исходного уровня активации, метаболического статуса и степени зрелости. Таким образом, изучение факторов и механизмов, контролирующих функциональную активность NK клеток, открывает новые перспективы для повышения эффективности NK-клеточной терапии.

Работа поддержана грантом РФФИ 22-25-00694.

Библиографический список

1. Ширшев С.В. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий: монография. Екатеринбург, 2009. 582 с.
2. Díaz-Hernández, I., Alecsandru, D., García-Velasco, J.A., Domínguez, F.: Uterine natural killer cells: from foe to friend in reproduction// Hum. Reprod. Update – 2021. –V. 27(4), – P. 720-746.
3. Keppel MP, Saucier N, Mah AY, Vogel TP, Cooper MA. Activation-specific metabolic requirements for NK Cell IFN-gamma production. // J. Immunol. – 2015. – V. 194, -P. 1954–62.
4. Erlebacher, A.: Immunology of the maternal-fetal interface. // Annu. Rev. Immunol. – 2013. – V. 31, – P. 387-411.
5. Croy, B. A., van den Heuvel, M. J., Borzychowski, A. M., Tayade, C. Uterine natural killer cells: a specialized differentiation regulated by ovarian hormones.// Immunological reviews – 2006. – V. 214, – P. 161–185.
6. Shirshov, S.V., Nekrasova, I.V., Gorbunova, O.L, Orlova, E.G., Maslennikova, I.L.: The effect of kisspeptin on the functional characteristics of isolated NK cells. Dokl. Biol. Sci. – 2015. – V. 464, – P. 267-269.
7. Shirshov, S.V., Nekrasova, I.V., Orlova, E.G., Gorbunova, O.L.: Roles of leptin and ghrelin in the regulation of the phenotype and cytokine production by NK cells from peripheral blood // Dokl. Biol. Sci – 2016. – V. 470(1), – P. 249-252.
8. Shirshov, S.V., Nekrasova, I.V., Orlova, E.G.: Estriol modulates the functional activity of phagocytes and NK cells. // Dokl. Biol. Sci. – V. 2008422, – P. 360-362.
9. Sun, J., Yang, M., Ban, Y., Gao, W., Song, B., Wang, Y., Zhang, Y., Shao, Q., Kong, B., Qu, X.: Tim-3 Is Upregulated in NK Cells during Early Pregnancy and Inhibits NK Cytotoxicity toward Trophoblast in Galectin-9 Dependent Pathway // PLoS One. – 2016. – V. 11(1), – e0147186.
10. Donnelly RP, Loftus RM, Keating SE, Liou KT, Biron CA, Gardiner CM, et al. mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. // J Immunol. 2014. – V. 193. – P. 4477–84.
11. Keating SE, Zaiatz-Bittencourt V, Loftus RM, Keane C, Brennan K, Finlay DK, et al. Metabolic reprogramming supports IFN-gamma production by CD56bright NK cells. // J Immunol. – 2016. – V. 196.- P.2552–60.
12. Jiang, L., Fei, H., Jin, X., Liu, X., Yang, C., Li, C., Chen, J., Yang, A., Zhu, J., Wang, H., Fei, X., & Zhang, S. Extracellular Vesicle-Mediated Secretion of HLA-E by Trophoblasts Maintains Pregnancy by Regulating the Metabolism of Decidual NK Cells. // International journal of biological sciences,- 2021.- V.17(15), – P. 4377–4395.

ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТАННОГО ИОНАМИ ДВУХВАЛЕТНОГО ЖЕЛЕЗА СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ

Раззоронова Е.А., Чурина Т.С., Горшкова Е.Н.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

Аннотация. В сыворотке иммуноглобулин А (IgA) может выполнять как гомеостатическую, так и провоспалительную функцию [1,2]. Ранее было показано, что обработка IgA ионами Fe(II) влияет на его антигенсвязывающие характеристики [3]. Поскольку влияние обработки сывороточного IgA ионами Fe(II) на функции нейтрофилов еще не было изучено, целью работы явилось исследование эффекторных свойств нейтрофилов человека при взаимодействии с модифицированным ионами Fe(II) сывороточным иммуноглобулином А.

Ключевые слова: иммуноглобулин А, нейтрофилы, гомеостаз, фагоцитоз.

Имуноглобулин А (IgA) является доминирующим классом антител слизистых оболочек и вторым по распространенности в сыворотки крови после IgG. Роль сывороточного иммуноглобулина А изучена относительно слабо в отличие от IgA слизистых оболочек [4]. Про- или противо- воспалительная функция сывороточного IgA определяется характером взаимодействия иммуноглобулина со своим рецептором (FcαRI). Так, поскольку связывание свободного (в отсутствие антигена) плазменного IgA со своим рецептором носит временный характер, это инициирует проведение ингибирующего внутриклеточного сигнала. Такая сигнализация подавляет окислительный взрыв, хемотаксис и фагоцитоз иммунных клеток, а также продукцию ими цитокинов [4]. Однако наравне с поддержанием гомеостаза в кровотоке, IgA также участвует в нейтрализации и Fc-опосредованных механизмах элиминации вторгающихся патогенов. Например, сывороточный IgA крайне эффективен в рекрутинге нейтрофилов для уничтожения опухолевых клеток, потенциально активен против некоторых инфекционных агентов [5,6]. Таким образом, особенности взаимодействия IgA с антигенами и с FcαRI в конкретном иммунном контексте определяют патофизиологические или терапевтические роли иммуноглобулина.

Ионы двухвалентного железа, Fe(II), обладающие редокс-активным потенциалом, являются типичным компонентом воспалительного микроокружения. Высвобождение ферритин и трансферрин связанных ионов Fe(II) наблюдается, например, под действием АФК, генерируемых профессиональными фагоцитами в ходе ответа на патогены [7]. Ранее мы показали, что воздействие ионами Fe(II) на человеческий сывороточный IgA влияет на антигенсвязывающие свойства плазменного иммуноглобулина, расширяя спектр распознаваемых им бактериальных (*E. coli*) ауто-антигенов (клетки линии Colo 205), вероятно, благодаря усилению роли гидрофобности и паратопной гибкости в связывании молекул.

Антитела с антигенсвязывающей реактивностью обычно отвергаются на ранних этапах производства иммуноглобулиновых препаратов. Однако, общеизвестно, что иммунной

системой организма человека постоянно синтезируется репертуар антител, полиспецифичных по своей природе, которые обладают конформационной лабильностью антигенсвязывающих центров [8, 9].

Стоит ожидать, что проявление индуцированного антигенсвязывающего разнообразия антителами служит некой природной стратегией повышения эффективности иммунного ответа. Таким образом, исследование в данном направлении позволили бы оценить влияние мягкой химической модификации иммуноглобулинов на ход иммунных реакций.

В тоже время химическую модификацию иммуноглобулинов предлагается рассматривать в качестве одной из стратегий повышения терапевтического потенциала поликлональных иммуноглобулиновых препаратов за счет их обогащения дополнительными фракциями IgA с расширенными антигенсвязывающими и, возможно, улучшенными иммунорегуляторными характеристиками. За этим следует более оптимальное использование донорской плазмы, уменьшение доз применяемых препаратов, а также снижение затрат на их производство [10].

В нашем исследовании мы предполагаем, что химическая модификация IgA может повлиять и на эффекторные функции антител, которые сопряжены с опосредованным Fc-рецептором сдерживанием чрезмерной активации иммунных клеток, а также влиять на его опсоническую активность и Fc-осредованную элиминацию патогенов. Основная задача исследования – установить каково влияние сывороточного IgA, обработанного ионами Fe(II), на выживаемость и фагоцитоз нейтрофилов.

В работе были использованы: сывороточный IgA человека, выделенный из комплексного иммуноглобулинового препарата (Микроген, Россия) хроматографическим способом с использованием агарозного жакалина Пирса (Thermo Fisher Scientific, США); водный раствор сульфата железа ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ растворяли в бидистиллированной воде (0,1 мМ) и добавляли в раствор IgA в PBS (pH 7,4) в расчете 20 мМ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ на 5 мг/мл IgA (1 ч, 4 °С). От не провзаимодействовавшего с IgA FeSO_4 избавлялись путем трехступенчатого диализа: сначала при 4 °С в растворе PBS (pH 7,4) с добавлением 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) в течение 2 часов, а затем двукратно в PBS (pH 7,4) в течение 24 ч. Рабочая концентрация модифицированного IgA составляла 2,5 мг/мл, что соответствует физиологичной концентрации в сыворотке крови.

Нейтрофилы, выделенные из периферической крови условно здоровых добровольцев в градиенте фиколл-урографина, стимулировали (15 мин, 37 °С) с помощью ФНО- α в концентрации 25 нг/мл (SigmaAldrich, США) и ЛПС в концентрации 100 нг/мл (SigmaAldrich, США).

Для оценки жизнеспособности нейтрофилов суспензию клеток ($1 \cdot 10^6$ кл/мл) инкубировали с нативным и Fe(II) обработанным IgA (25 ч, 37 °С). К клеткам добавляли йодистый пропидий (Thermo Fisher, США) и аннексин V-FITC (BD Biosciences, США) и оценивали их жизнеспособность с помощью проточного цитофлуориметра (Cytotflex, Beckman Coulter, Россия). Возбуждение флуоресценции осуществляли на длине волны 488 нм, эмиссию регистрировали с помощью фильтра BP 525/40 нм для аннексина V-FITC и фильтра BP 690/50 нм для йодистого пропидия.

Для оценки фагоцитарной активности нативный и обработанный Fe(II) IgA инкубировали (30 мин, 37°С) с инактивированными нагреванием FITC-мечеными клетками *E.coli* ($1 \cdot 10^8$ кл/мл), а затем с нейтрофилами (1 ч, 37 °С). Производили цитофлуориметрическую оценку каждые 10 мин в течение 1 часа. Возбуждение

флуоресценции осуществляли при 488 нм, эмиссию регистрировали с помощью фильтра ВР 525/40 нм. Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов оценивали долю флуоресцентных клеток от общей исследуемой популяции. Кроме этого, производили оценку интенсивность флуоресцентного сигнала, получаемого от FITC-меченных бактериальных клеток. Суммарный результат этих измерений оценивался с помощью фагоцитарного индекса (ФИ), рассчитываемого по формуле: ФИ = [% нейтрофилов, вступивших в фагоцитоз] x [медиана флуоресцентного сигнала].

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, США) с применением непараметрического критерия Краскала-Уоллиса.

В ходе исследования было определено, что на 20 и 25 час инкубации снижается жизнеспособность неактивированных и ЛПС-активированных нейтрофилов, обработанных сывороточным Fe(II)-модифицированным IgA (рис. 1). Для ФНО-стимулированных клеток было продемонстрировано эффект снижения выживаемости под влиянием нативного IgA и IgA, обработанного ионами Fe(II) через 25 часов инкубации.

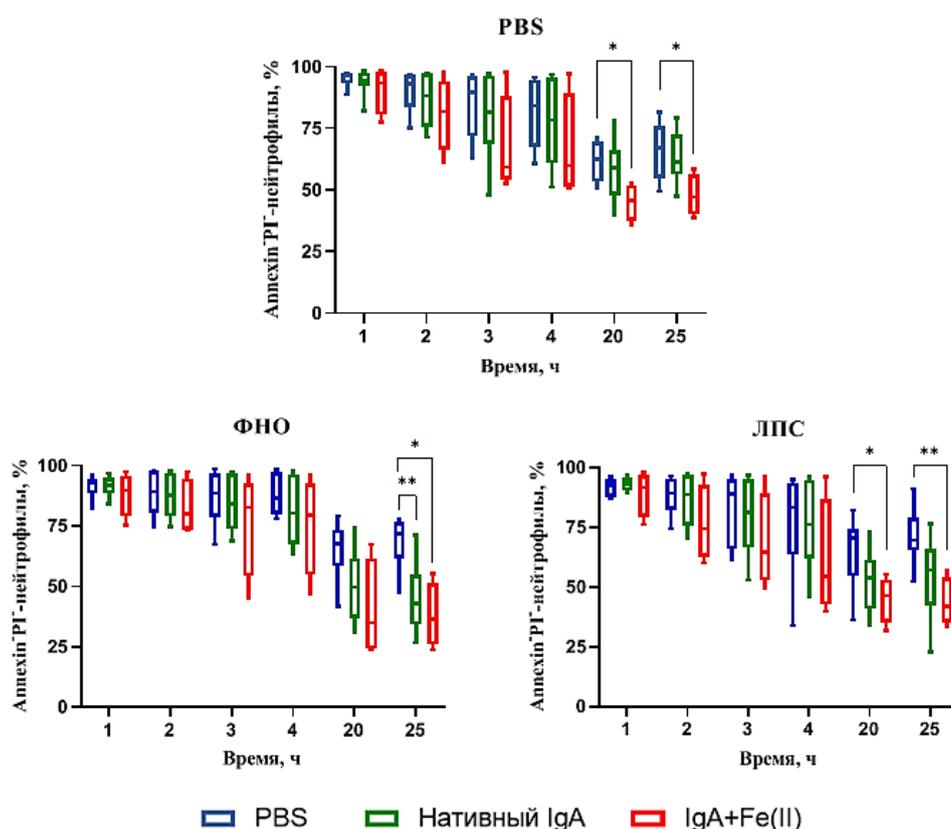


Рисунок 1 – Цитофлуориметрический анализ жизнеспособности неактивированных и ФНО- или ЛПС-активированных нейтрофилов после обработки нативным и Fe(II)-модифицированным сывороточным IgA (данные представлены в виде диаграммы размаха, на которой отложена медиана и межквартильный размах; статистика: критерий Краскала-Уоллиса, * – $p < 0,0332$, ** – $p < 0,0021$, *** – $p < 0,0002$; данные репрезентативны для 10 (группы PBS и Нативный IgA) и 4 (группа IgA+Fe(II)) доноров).

В ходе исследования фагоцитарной активности нейтрофилов в отношении FITC-меченных клеток E.coli было установлено, что опсонизация нативным и Fe(II)-модифицированным IgA повышает ФИ нейтрофилов по сравнению с необработанными клетками (рис. 2). Тем не менее, обработка сывороточного IgA ионами Fe(II) не способствует более эффективному фагоцитозу бактерий нейтрофилами, о чем свидетельствует отсутствие

статистически значимых различий между соответствующими группами (Нативный IgA и IgA+Fe(II)).

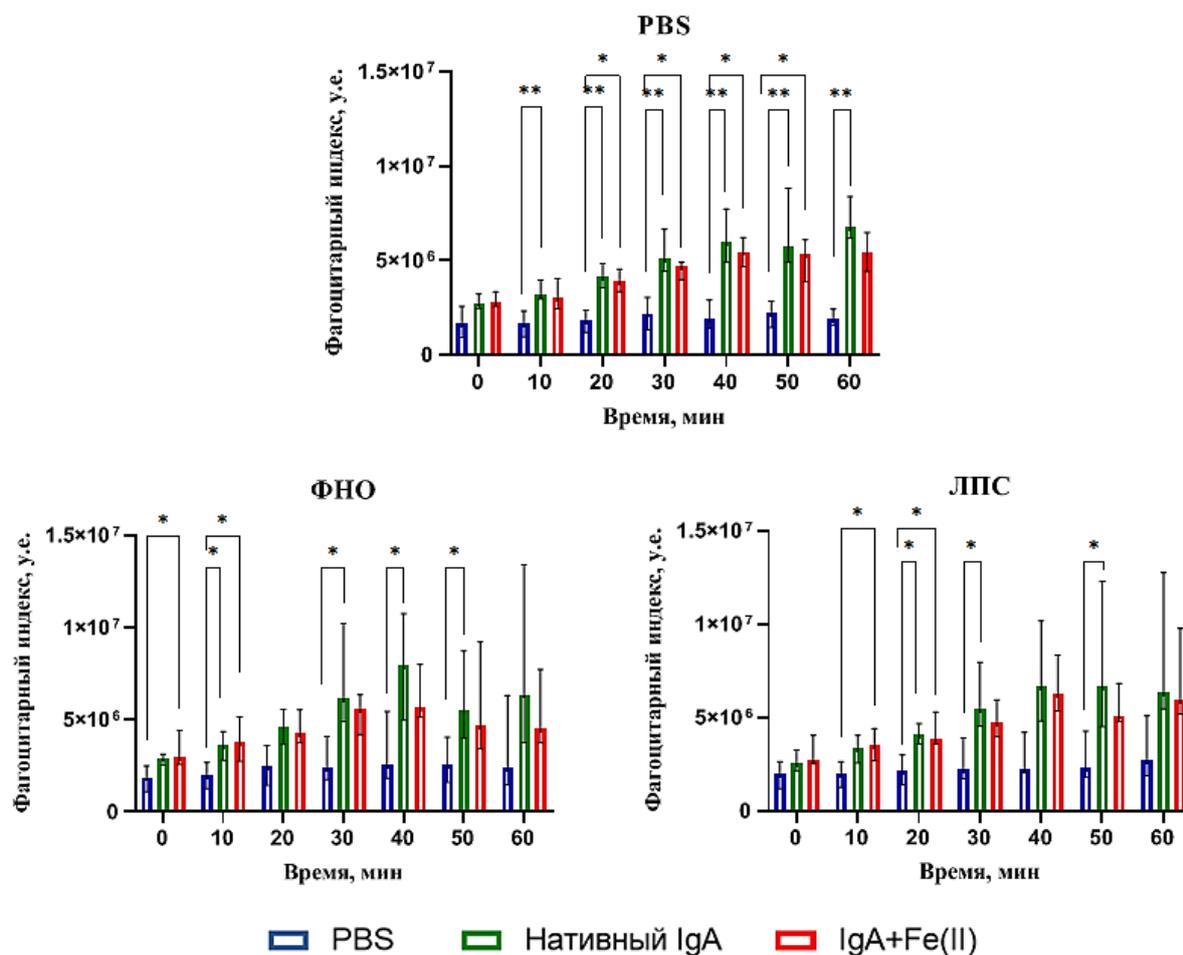


Рисунок 2 – Фагоцитарный индекс неактивированных и ФНО- или ЛПС-активированных нейтрофилов в ходе фагоцитоза клеток *E.coli*, опсонизированных нативным и Fe(II)-модифицированным IgA (данные представлены в виде медианы и межквартильного размаха; статистика: критерий Краскала-Уоллиса, * – $p < 0,0332$, ** – $p < 0,0021$, *** – $p < 0,0002$; данные репрезентативны для 6 доноров)

Таким образом, на основании полученных результатов было установлено, что ионы Fe(II) не изменяют опосредованную сывороточным IgA жизнеспособность нейтрофилов, хотя и стимулируют их гибель на 20 и 25 часу. Также было определено, что Fe(II) не влияет на опсоническую активность сывороточного IgA, т.к. статистически значимых различий между группами Нативный IgA и IgA+Fe(II) не наблюдалось во всех временных точках.

На основании полученных данных можно сделать выводы о том, что, несмотря на то, что обработка сывороточного IgA Fe(II) может приводить к индукции его антигенсвязывающей активности, она не способна оказывать влияние на его функциональные свойства в отношении фагоцитарной активности нейтрофилов и может оказывать негативное воздействие на их жизнеспособность.

Работа выполнена при поддержке программы научного академического руководства «Приоритет-2030» (Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского).

Библиографический список

1. Bakema J.E., Egmond M. Immunoglobulin A: a next generation of therapeutic antibodies // *mAbs*. – 2011. – V. 3. – P. 352 – 361.
2. Hansen I.S., Baeten D.L.P., Dunnen J. The inflammatory function of human IgA // *Cellular and molecular life sciences*. – 2019. – V. 76. – P. 1041 – 1055.
3. Gorshkova E.N., Lecerf M., Astrakhantseva I.V. et al. Induced antigen-binding polyreactivity in human serum IgA // *Immunobiology*. – 2022. – V. 227, – № 3. – P. 1–20.
4. Sterlin D., Gorochov G. When therapeutic IgA antibodies might come of age // *Pharmacology*. – 2020. – V. 106. – P. 9 – 19.
5. Boross P., Lohse S., Nederend M et al. IgA EGFR antibodies mediate tumor killing in vivo // *EMBO molecular medicine*. – 2013. – V. 5. – P. 1213-1226.
6. Davis S.K., Selva K.J., Kent S.J., Chung A.W. Serum IgA Fc effector functions in infectious disease and cancer // *Immunology and cell biology*. – 2020. – V. 98, – № 4. – P. 276 – 286.
7. Dimitrov J.D. Ivanovska N.D., Lacroix-Desmazes S. et al. Ferrous ions and reactive oxygen species increase antigen-binding and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G // *The journal of biological chemistry*. – 2006. – V. 281, – № 1. – P. 439 – 446.
8. Седых С.Е., Бунева В.Н., Невинский Г.А. Полиреактивность природных антител; обмен HL-фрагментами // *Биохимия*. – 2013. – Т. 78, – № 12. – С. 1651 – 1669.
9. Dimitrov J.D. Harnessing the therapeutic potential of “rogue” antibodies // *Trends in pharmacological sciences*. 2020. – V. 41, – № 6. – P. 409 – 417.
10. Spath P.J., Schneider C., Gunten, S. Clinical use and therapeutic potential of IVIG/SCIG, plasma-derived IgA or IgM, and other alternative immunoglobulin preparations // *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*. – 2016. – V. 65, – № 3. – P. 215 – 231.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЛЮМИНОЛ И ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА

Ракутина М.Н.¹, Ужвийук С.В.², Тимганова В.П.²

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.*

² *Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия.*

Аннотация. Изучение влияния оксида графена на различные популяции иммунных клеток имеет большое значение. Мы исследовали эффекты пегилированного оксида графена на нейтрофилы, выделенные из периферической крови человека. Наночастицы оксида графена (100-200 нм и 1-5 мкм) модифицировали линейным и разветвленным полиэтиленгликлом. Было изучено влияние наночастиц оксида графена на продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилов. Образование АФК нейтрофилами определяли путем измерения люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции. Таким образом, наночастицы оксида графена снижали продукцию АФК нейтрофилами в стимулированном варианте ЛюцХЛ и ЛюмХЛ.

Ключевые слова: оксид графена, полиэтиленгликоль, люминолзависимая хемилюминесценция, люцигенинзависимая хемилюминесценция, нейтрофилы, активные формы кислорода.

EFFECT OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON LUMINOL AND LUCIGENIN-DEPENDENT CHEMILUMINESCENCE OF HUMAN NEUTROPHILS

Rakutina M.N.¹, Uzhviyuk S.V.², Timganova V.P.²

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russian Federation.*

² *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Branch of Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*

Abstract. The study of the effect of graphene oxide on various populations of immune cells is of great importance. We investigated the effects of pegylated graphene oxide on neutrophils isolated from human peripheral blood. Graphene oxide nanoparticles (100-200 nm and 1-5 μ m) were modified with linear and branched polyethylene glycol. The effect of graphene oxide nanoparticles on the production of reactive oxygen species (ROS) of neutrophils was studied. The formation of ROS by neutrophils was determined by measuring luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. Thus, graphene oxide nanoparticles reduced the production of ROS by neutrophils in a stimulated version of lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence.

Keywords: graphene oxide, polyethylene glycol, luminol-dependent chemiluminescence, lucigenin-dependent chemiluminescence, neutrophils, reactive oxygen species.

Введение

Графен – двумерная аллотропная модификация углерода, образованная слоем атомов углерода толщиной в один атом [1]. Благодаря своим уникальным свойствам, таким как большая удельная площадь поверхности, высокие электро- и теплопроводность, способность к флуоресценции и ее гашению (в зависимости от условий), он применяется во многих отраслях науки, в том числе и в биомедицине [2].

Области потенциального применения графена включают системы доставки лекарственных средств, транспортировку молекул, культивирование тканей организма и имплантаты [3].

В биологических и медицинских исследованиях преимущественно применяются окисленные формы графена, а именно оксид графена. Оксид графена гидрофилен, обладает хорошей коллоидной стабильностью, на его поверхности присутствуют карбоксильные группы, облегчающие модификацию его поверхности биосовместимыми полимерами [2]. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является популярным биосовместимым полимером и компонентом нескольких нанопрепаратов, одобренных как для клинического применения, так и для прохождения клинических испытаний [4].

При попадании наноматериалов в организм человека они сталкиваются с клетками иммунной системы, поэтому необходимо понимать, как воздействует оксид графена на эти клетки. Нейтрофилы – самые многочисленные клетки врожденного иммунитета, первые реагирующие на внедрение наночастиц.

Выделение активных форм кислорода (АФК) нейтрофилами направлено на уничтожение чужеродных объектов. Способность нейтрофильных гранулоцитов образовывать достаточное количество АФК может служить прогностическим признаком для оценки дальнейшего хода воспалительного процесса, а ответ на раздражитель может характеризовать активность защитных сил организма. В ряде работ показано, что ОГ способствует инициации кислородного взрыва в нейтрофилах и макрофагах [5].

Хемилюминесцентный метод позволяет оценить образование АФК. В качестве активаторов хемилюминесценции (ХЛ) наиболее широко используются люминол и люцигенин.

Таким образом, целью данного исследования является оценка влияния наночастиц ОГ разной размерности, покрытых линейным и разветвленным полиэтиленгликолем на продукцию активных форм кислорода нейтрофилами.

Материалы и методы

Нейтрофилы выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в двойном градиенте плотности препаратов Histopaque® (Sigma-Aldrich, США): $\rho=1,077 \text{ г/см}^3$ – для отделения лимфоцитов, $\rho=1,119 \text{ г/см}^3$ – для выделения нейтрофилов. Для этого разведенную раствором Хэнкса в 2 раза кровь наслаивали на двойной градиент плотности Histopaque® и центрифугировали 40 минут при 400g, 20°C. Полученную суспензию нейтрофильных гранулоцитов дважды отмывали в растворе Хэнкса («Биолот», Россия) по 15 минут при 350g, 4°C. Супернатант сливали, оставшиеся нейтрофилы разводили в 1 мл раствора Хэнкса, затем подсчитывали количество клеток в камере Нейбауэра. Клетки использовали в концентрации $1 \times 10^6 \text{ кл./мл}$.

Измеряли величину спонтанной хемилюминесценции (СХЛ) нейтрофилов, которая характеризует базальный уровень активации этих клеток. Для определения резервных возможностей активации нейтрофилов осуществляли стимуляцию кислородного метаболизма

посредством добавления к ним опсонизированного зимозана (ОЗ) («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 1,5 мкг/мл.

В качестве усилителей люминесценции использовали люминол и люцигенин. Люминол-усиленная хемилюминесценция (ЛюмХЛ) регистрировала весь пул АФК и отражала суммарную активность миелопероксидазы и NADPH-оксидазы и др. Натриевую соль люминола («Sigma-Aldrich», США) использовали в концентрации 20 мкМ. С помощью люцигенин-усиленной хемилюминесценции (ЛюцХЛ) измеряли образование супероксидного анион-радикала ($\bullet\text{O}^{2-}$) и оценивали активность NADPH-оксидазы. Люцигенин (синтезирован и любезно предоставлен д-ром Денисом Ларкиным, Москва, Россия) использовали в концентрации 5 мкМ.

В работе использовали наночастицы ОГ разных размерностей (0,1-0,2 мкм – ОГ_м и 1-5 мкм – ОГ_б), покрытые линейным ПЭГ (Л-ОГ) и разветвленным ПЭГ (рП-ОГ), в двух концентрациях 5 и 25 мкг/мл. Модификация наночастиц ОГ была описана ранее в статье [6].

Для оценки уровня ЛюмХЛ и ЛюцХЛ в лунки 96-луночного стерильного планшета для люминометра («Nunc», Дания) последовательно вносили раствор Хенкса, наночастицы ОГ, (контроль – спонтанная Люм и ЛюцХЛ), клеточную суспензию (10^6 /мл), 10% пулированную инактивированную человеческую сыворотку и люминол или люцигенин. В стимулированные пробы вносили опсонизированный зимозан.

Интенсивность люминесценции измеряли в течение 90 минут с интервалом в 3 минуты на гибридном ридере “Synergy H1” (“BioTek”) при 37 °С. Рассчитывали интегральный показатель светосумму (S), т.е. площадь под кривой хемилюминесценции, характеризующую суммарный синтез АФК за 90 мин исследования и равную сумме всех значений интенсивности люминесценции для каждой пробы.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism 8 с использованием критерия Фридмана и post-hoc теста Данна для множественных сравнений. Данные представлены в виде медианы (Me). Различия считали значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования

Влияние наночастиц ОГ на интенсивность спонтанной и стимулированной ЛюмХЛ.

Известно, что стимуляция нейтрофилов сопровождается образованием АФК (супероксидный анион, перекись водорода, гидроксил-радикал, активные формы хлора и др.), обладающих мощным бактерицидным действием.

Показано, что наночастицы ОГ разных размерностей функционализированных линейным и разветвленным ПЭГ во всех исследованных концентрациях не влияли на продукцию спонтанной продукции АФК нейтрофилами за 90 минут наблюдения (данные не представлены). Высокая концентрация наночастиц ОГ разных размерностей покрытых линейным и разветвленным ПЭГ (25 мкг/мл) снижала продукцию АФК нейтрофилами к концу наблюдения (рис. 1). Таким образом, наночастицы ОГ вызывали снижение продукции АФК нейтрофилов, что возможно свидетельствует об антиоксидантном действии исследуемых частиц.

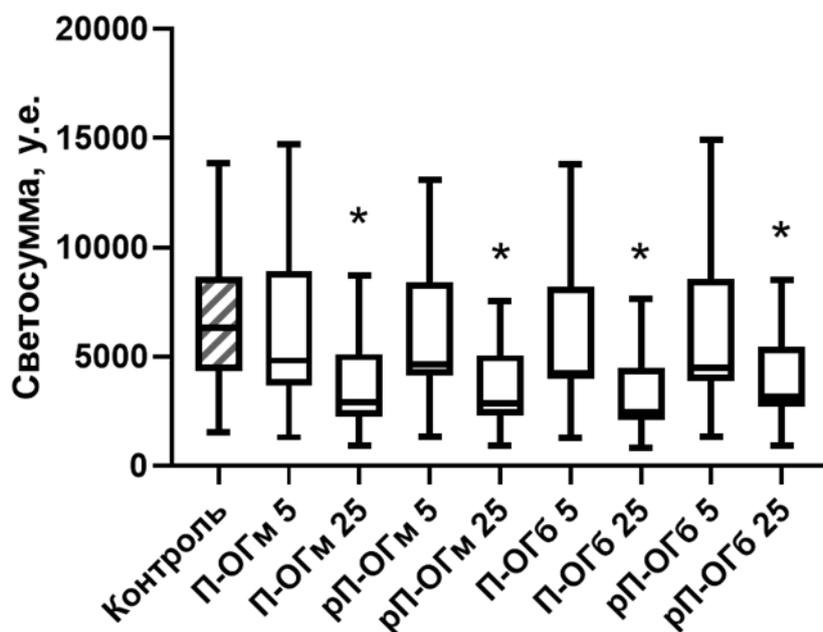


Рисунок 1 – Влияние наночастиц ОГ на стимулированную ОЗ ЛюмХЛ нейтрофилов.
 Примечание: * – статистически достоверно отличающиеся данные от контроля без ОГ по критерию Фридмана, $n=7$.

Влияние наночастиц ОГ на интенсивность спонтанной и стимулированной ЛюцХЛ.

Установлено, что ОГ-ПЭГ в концентрациях 5 и 25 мкг/мл не влиял на спонтанную продукцию АФК нейтрофилами (данные не представлены). Снижение интенсивности ОЗ-стимулированной ЛюцХЛ наблюдалось к концу периода измерений под влиянием высокой концентраций наночастиц ОГ (рис. 2). Так, наночастицы ОГ (25 мкг/мл) в ОЗ-стимулированной ЛюцХЛ снижал продукцию АФК нейтрофилами.

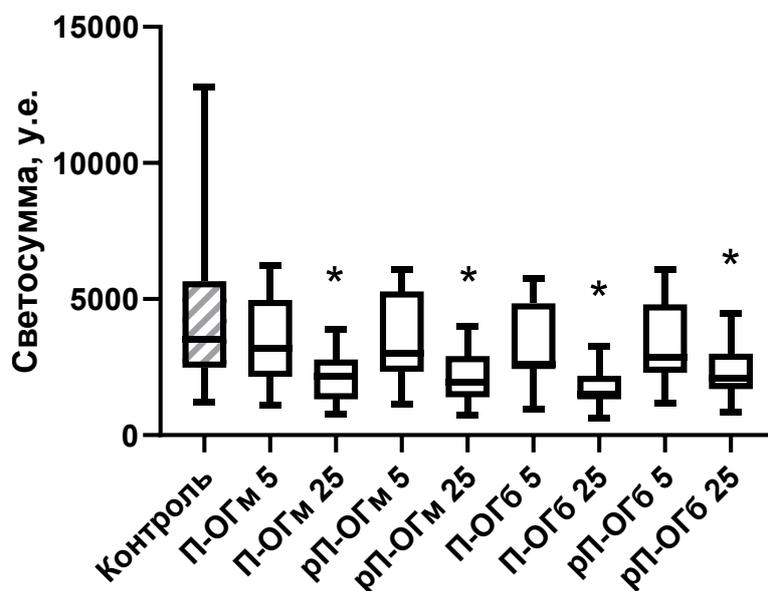


Рисунок 2 – Влияние наночастиц ОГ на стимулированную ОЗ ЛюцХЛ нейтрофилов.
 Примечание: * – статистически достоверно отличающиеся данные от контроля без ОГ по критерию Фридмана, $n=7$.

Заключение

При исследованиях влияния наночастиц ОГ на лейкоциты человека было установлено, что присутствие ОГ и П-ОГб в концентрациях 2,5 и 5 мкг/мл в среде с лейкоцитами приводит к снижению спонтанной и стимулированной ЛЗХЛ в первые минуты теста, при этом эффект П-ОГб был более выраженным [7]. Таким образом, можно проследить некоторые отличия, поскольку в нашем исследовании использовались более высокие концентрации ОГ, наночастицы, покрытые разветвленным ПЭГ и объектом исследования были нейтрофилы периферической крови.

Было установлено, что наночастицы ОГ в концентрациях 5 и 25 мкг/мл не влияли на продукцию АФК нейтрофилами периферической крови человека в тестах спонтанной ЛюмХЛ и ЛюцХЛ. При изучении опсонизированных зимозан-стимулированных вариантов было показано снижение продукции АФК нейтрофилами периферической крови в ЛюмХЛ и ЛюцХЛ к концу периода инкубации (90 минут). Известно, что ЛюмХЛ отражает суммарную (внутриклеточную и внеклеточную) продукцию АФК, прежде всего, супероксид-аниона, а кроме того перекиси водорода. Из литературных данных известно об антиоксидантной активности ОГ в отношении различных форм АФК. В недавних исследованиях была показана очень низкая антиоксидантная активность ОГ по отношению к перекиси водорода и гидроксид-радикалу в низких концентрациях [8; 9]. В других исследованиях авторами Qui et al. [10] была показана способность наночастиц ОГ защищать различные биомолекулы от окисления, а в частности высокая антиоксидантная активность ОГ в концентрации 10 мкг/мл и менее в отношении гидроксид-радикала, а также о его способности нейтрализовать супероксид-анион (в концентрации около 80 мкг/мл). Известно также, что модификация ОГ различными функциональными группами существенно увеличивает его антиоксидантную активность [11], в связи с этим можно предположить, что пегилирование оказывает влияние на нейтрализацию АФК ОГ.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского Научного Фонда № 19-15-00244-П.

Библиографический список

1. Smith, A.T.; LaChance, A.M.; Zeng, S.; Liu, B.; Sun, L. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites // *Nano Mater.* – 2019. – V. 1. – P. 31–47.
2. Храпцов П. В., Раев М.Б., Тимганова В. П., Бочкова М. С., Заморина С.А. Взаимодействие наночастиц оксида графена с клетками иммунной системы // *Гены & Клетки.* – 2020. – Том 15. – №3. – С. 29–38.
3. Cao, W.; He, L.; Cao, W.; Huang, X.; Jia, K.; Dai, J. Recent progress of graphene oxide as a potential vaccine carrier and adjuvant // *Acta Biomater.* – 2020. – Vol. 112. – P. 14–28.
4. Abdel-Mageed, H.M.; AbuelEzz, N.Z.; Radwan, R.A.; Mohamed, S.A. Nanoparticles in nanomedicine: A comprehensive updated review on current status, challenges and emerging opportunities // *Microencapsul.* – 2021. – V. 38. – P. 414–436.
5. Коленчукова О. А., Савченко А. А., Смирнова С. В. Особенности люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим риносинуситом // *Медицинская иммунология.* – 2020. – Том 12. – № 4–5. – С. 437–440.
6. Khramtsov, P.; Bochkova, M.; Timganova, V.; Nechaev, A.; Uzhviyuk, S.; Shardina, K.; Maslennikova, I.; Rayev, M.; Zamorina, S. Interaction of Graphene Oxide Modified with Linear

- and Branched PEG with Monocytes Isolated from Human Blood // *Nanomaterials*. –2022. – V. 12. – P. 126.
7. Бочкова М.С., Тимганова В.П., Храпцов П.В., Ужвиюк С.В., Шардина К.Ю., Нечаев А.И., Раев М.Б., Заморина С.А. Изучение влияния наночастиц оксида графена на люминол-зависимую хемилюминесценцию лейкоцитов человека // *Медицинская иммунология*. 2020. – Том 22. – №5. – С. 977-986.
 8. Baali N., Khecha A., Bensouici A., Speranza G., Hamdouni N. Assessment of Antioxidant Activity of Pure Graphene Oxide (GO) and ZnO-Decorated Reduced Graphene Oxide (rGO) Using DPPH Radical and H₂O₂ Scavenging Assays // *Carbon Research*. – 2019. – V. 5. – P. 75.
 9. Markovic Z.M., Jovanovic S.P., Maskovic P.Z., Mojsin M.M., Stevanovic M.J., Danko M., Micusik M., Jovanovic D.J., Kleinova A., Spitalsky Z., Pavlovic V.B., Todorovic Markovic B.M. Graphene oxide size and structure pro-oxidant and antioxidant activity and photoinduced cytotoxicity relation on three cancer cell lines // *Photochemistry and photobiology*. – 2019. – P. 200.
 10. Qiu Y., Wang Z., Owens A.C., Kulaots I., Chen Y., Kane A.B., Hurt R.H. Antioxidant Chemistry of Graphene-Based Materials and its Role in Oxidation Protection Technology // *Nanoscale*. – 2014. – V. 6. – № 20. – P. 11744–11755.
 11. Ruiz V., Yate L., Garcia I., Cabanero G., Grande H.J. Tuning the antioxidant activity of graphene quantum dots: Protective nanomaterials against dye decoloration // *Carbon*. – 2017. – P. 366-374.

ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ НА ЗДОРОВЬЕ ПОЛОСТИ РТА

Рахмонов М.Х.

Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Аннотация. Появляется все больше доказательств неуклонного роста аутоиммунных заболеваний в последние десятилетия. Действительно, рост аутоиммунных заболеваний равен всплеску аллергической и онкологической патологии; с другой стороны, показано, что инфекции встречаются реже в западных обществах. Оральные проявления аутоиммунных заболеваний часто являются основным признаком аутоиммунных заболеваний. Таким образом, стоматологи могут сыграть ключевую роль в выявлении и во время последующего многопрофильного лечения.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, системная красная волчанка, полости рта, диагностика, стоматология, лечение.

THE EFFECT OF SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS ON ORAL HEALTH

Rakhmonov M.Kh.

BFSAEI HE Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. There is growing evidence of a steady increase in autoimmune diseases in recent decades. Indeed, the increase in autoimmune diseases is equal to a surge in allergic and oncological pathology; on the other hand, it has been shown that infections are less common in Western societies. Oral manifestations of autoimmune diseases are often the main sign of autoimmune diseases. Thus, dentists can play a key role in the identification and during subsequent multidisciplinary treatment.

Keywords: autoimmune diseases, systemic lupus erythematosus, oral cavity, diagnostics, dentistry, treatment.

Системная красная волчанка – тяжелое и хроническое аутоиммунное воспалительное заболевание неизвестной этиопатогенеза и различных клинических проявлений. Системная красная волчанка в основном поражает женщин в 8 раз чаще, чем мужчин. Распространенность системной красной волчанки во всем мире колеблется от 12 до 50 на 100 000, в зависимости от местоположения и этнической принадлежности [1].

Системная красная волчанка обычно является хроническим и прогрессирующим заболеванием, состояние покоя и прогрессирование которого протекают довольно регулярно и последовательно. Существуют клеточные и клеточно-опосредованные процессы, участвующие в системной красной волчанке, хотя и предполагалось, что первичное вовлечение в основном обусловлено клеточно-опосредованным иммунитетом и последующим гуморальным вовлечением [2]. Иммунный комплекс откладывается в различных органах,

вызывая воспалительную реакцию, которая приводит к нарушению функций органов, характерному для данного заболевания. В патогенезе системной красной волчанки была продемонстрирована активация путей ИФН (интерферон) I типа, дисфункция В – и Т-клеток и наличие антинуклеарных антител [3].

Повреждение кожи является типичным клиническим признаком системной красной волчанки, и оно было зарегистрировано в 85% случаев. Симптомы могут варьироваться от простых круглых поражений кожи до полиорганных нарушений, потенциально смертельных. Наиболее рецидивирующим поражением кожи является сильная эритема на поверхности кожи, подверженной воздействию света; кроме того, дискоидные поражения полости рта являются одним из наиболее распространенных проявлений заболевания. Так называемая скуловая сыпь (или порыв бабочки) расположена на носу и щеках, а эритема обнаруживается также на кончиках пальцев.

Классическое клиническое проявление представлено правильной круглой или слегка красной неправильной областью. Это может характеризоваться атрофией или наличием изъязвлений. Красная область характеризуется типичными белыми излучающими полосами и телеангиэктазией. Эти признаки могут напоминать признаки красного плоского лишая, несмотря на отсутствие симметрии. Хотя состояние полости рта не является серьезным, у 40% пациентов сообщалось о петехиальном поражении и кровотечении из десен, таких как десквамативный гингивит, краевой гингивит или эрозивные поражения слизистой оболочки, что может указывать на серьезную тромбоцитопению. У многих пациентов с системной красной волчанкой может одновременно наблюдаться синдром Шегрена [4].

Диагностика системной красной волчанки основана на полиорганном заболевании и исследовании антинуклеарных антител на уровне сыворотки крови. Так называемые LE-клетки могут быть обнаружены в кровотоке. LE-клетки представляют собой зрелые нейтрофилы, которые проглотили сферические включения, продуцируемые ядерными компонентами и другими клеточными элементами [2]. Поражения волчанки можно спутать с многоформными поражениями эритемы, красным плоским лишаем и пузырьчато-буллезными поражениями [1]. Кроме того, дифференциальный диагноз должен включать лихеноидные реакции на зубные пломбы, травматический кератоз или кератоз курильщика и веррукозную карциному. Демонстрация неповрежденных прилегающих тканей по отношению к данным поражениям посредством гистологического и иммуногистохимического подтверждения по-прежнему является стандартным критерием для окончательного диагноза [5].

Лечение системной красной волчанки основано на профилактике, поддержании состояния ремиссии и облегчении симптомов, а также устранении воспаления. Салицилаты используются в менее тяжелых случаях. Существуют и другие используемые препараты, такие как гидроксихлорохин (противомалярийное средство), кортизоны и другие иммунодепрессанты, такие как азатиоприн и циклофосфамид. Кортикостероиды высокой и средней мощности и ингибиторы кальциневрина используются в качестве местных методов лечения кожных проявлений. Защита от солнечного света является частью стратегии, направленной на предотвращение вспышек кожных проявлений. Прогноз часто бывает хорошим, когда течение заболевания промежуточного типа и задействовано всего несколько органов. Заболевание также может быть смертельным в случае заболеваний почек с гипертонией и быстрой эволюцией в сторону почечной недостаточности, что приводит к смерти пациента [6].

Синдром Шегрена – аутоиммунное заболевание, поражающее слюнные и слезные железы и вызывающее снижение секреторной активности вследствие лимфоцитарной

инфильтрации и последующего разрушения экзокринных желез. Более низкая выработка слюны (гипосаливация) вызывает сухость во рту (ксеростомия); дефицит слез вызывает ксерофтальмию. Хотя этиопатология синдрома Шегрена до сих пор неизвестна, в этот процесс вовлечены явления гуморального и клеточного иммунитета; на самом деле, важную роль играет повышенная активация В-клеток с последующим образованием иммунного комплекса и выработкой аутоантител. Генетические и экологические факторы также могут принимать участие в патогенезе синдрома [7].

Синдром Шегрена поражает 0,5–3% всего населения и преобладает у женщин по сравнению с мужчинами (соотношение 9: 1). Как правило, синдром Шегрена выявляется в возрасте около 50 лет. Важно подчеркнуть, что существуют два характерных скачка: сразу после менархе и после менопаузы [8].

У некоторых пациентов клинические признаки проявляются только во рту и глазах, в то время как у других наблюдается более значительное аутоиммунное повреждение. 50% случаев также имеют различные аутоиммунные заболевания, такие как ревматоидный артрит или системная красная волчанка. Повреждение желез без признаков других аутоиммунных заболеваний определяется как первичный синдром Шегрена. Добавление аутоиммунного заболевания называется вторичным синдромом Шегрена [9].

Основные признаки синдрома связаны с полостью рта [2]. Ксеростомия ответственна за возникновение различных проявлений синдрома Шегрена на уровне полости рта. Недостаток слюны предрасполагает пациентов к развитию кариеса зубов. Недостаток слюны способствует накоплению зубного налета и их очистке. Отек и воспаление десен являются частыми клиническими признаками. Кроме того, снижение слюнного потока может привести к развитию оппортунистических инфекций.

В дополнение к оральным симптомам у пациентов также наблюдаются раздражение и сухость глаз, вызванные ксерофтальмией, а также светобоязнь. Почти у 20% пациентов, страдающих синдромом Шегрена, наблюдаются признаки феномена Рейно, состояния, которое поражает пальцы рук и ног. Наконец, у пациентов, страдающих этим заболеванием, могут наблюдаться артралгия, миалгия и астения.

Выводы различных эпидемиологических исследований утверждают, хотя для подтверждения этого требуются более новые исследования, что генетические, а также экологические факторы играют определенную роль в патогенезе заболеваний [10]. Синдром часто сопровождается изменением лабораторных данных. 90% пациентов дают положительный результат на ревматоидный фактор, антитело против IgG в сыворотке крови пациента. Существуют также другие аутоантитела, такие как анти-Шегрен А и анти-Шегрен В, которые могут быть обнаружены у этих пациентов [2].

Библиографический список

1. J. B. Albilal, D. K. Lam, C. M. Clokie, and G. K. Sándor. Systemic lupus erythematosus: a review for dentists. // *Journal of the Canadian Dental Association*. 2007. vol. 73, no. 9, pp. 823–828.
2. M. B. Mustafa, S. R. Porter, B. R. Smoller, and C. Sitaru. Oral mucosal manifestations of autoimmune skin diseases. // *Autoimmunity Reviews*. 2015. vol. 14, no. 10, pp. 930–951.
3. S. V. Lourenço, F. R. de Carvalho, P. Boggio et al. Lupus erythematosus: clinical and histopathological study of oral manifestations and immunohistochemical profile of the inflammatory infiltrate. // *Journal of Cutaneous Pathology*. 2007. vol. 34, no. 7, pp. 558–564.

4. R. Jonsson, G. Heyden, N. G. Westberg, and G. Nyberg. Oral mucosal lesions in systemic lupus erythematosus—a clinical, histopathological and immunopathological study. // *The Journal of Rheumatology*. 1984. vol. 11, no. 1, pp. 38–42.
5. M. Schiodt. Oral manifestations of lupus erythematosus. // *International Journal of Oral Surgery*. 1984. vol. 13, no. 2, pp. 101–147
6. C. L. Carroll and A. B. Fleischer Jr. Tacrolimus ointment: the treatment of atopic dermatitis and other inflammatory cutaneous disease. // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2004. vol. 5, no. 10, pp. 2127–2137.
7. A. Bascones-Martínez, V. García-García, J. H. Meurman, and L. Requena-Caballero. Immune-mediated diseases: what can be found in the oral cavity? // *International Journal of Dermatology*. 2015. vol. 54, no. 3, pp. 258–270.
8. B. M. Liquidato, C. Soler Rde, and I. Bussoloti Filho. Evaluation of the concordance of sialometry and salivary glands scintigraphy in dry mouth patients. // *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2006. vol. 72, no. 1, pp. 116–119.
9. G. Sarrión. Sjögren's syndrome of the oral cavity. Review and update. // *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2009. vol. 14, no. 7, pp. 325–E330.

БОЛЕЗНЬ БЕХЧЕТА И ЕЕ ПРОЯВЛЕНИЯ В ПОЛОСТИ РТА

Рахронон М.Х.

Росийский университет дружбы народов, Москва, Россия

Аннотация. Оральные признаки часто являются первым проявлением аутоиммунных заболеваний. По этой причине стоматологи играют важную роль в выявлении возникающих аутоиммунных патологий. Действительно, ранняя диагностика может сыграть решающую роль в улучшении качества стратегий лечения, а также качества жизни. Это может быть получено благодаря специфическим знаниям о проявлениях аутоиммунных заболеваний в полости рта.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, болезнь Бехчета, диагностика, полости рта, лечение.

BEHCET DISEASE AND ITS MANIFESTATIONS ON ORAL CAVITY

Rakhmonov M.Kh.

BFSAEI HE Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia

Abstract. Oral signs are often the first manifestation of autoimmune diseases. For this reason, dentists play an important role in identifying emerging autoimmune pathologies. Indeed, early diagnosis can play a crucial role in improving the quality of treatment strategies, as well as the quality of life. This can be obtained thanks to specific knowledge about the manifestations of autoimmune diseases in the oral cavity.

Keywords: autoimmune diseases, Behcet disease, diagnosis, oral cavity, treatment.

Синдром Бехчета – аутоиммунное, мультисистемное заболевание неизвестной этиологии. Обычно он характеризуется, по крайней мере, двумя из трех ключевых типичных факторов: язвы полости рта, язвы половых органов и воспаление глаз. Хотя его первоначальное определение связано с дерматологической патологией, болезнь Бехчета часто характеризуется неврологическим и сосудистым поражением. Обычно это поражает людей в возрасте от 30 лет и не свидетельствует о гендерном пристрастии. Наибольшая заболеваемость этим заболеванием наблюдается среди средиземноморского и азиатского населения с заметной распространенностью в Турции. Демонстрация аутоиммунного генеза подтверждается наличием анти-слизистых аутоантител, а также ассоциацией заболевания с конфигурациями HLA B5 и B51 [1].

Кожно-слизистые поражения очень часто являются первым признаком наличия синдрома Бехчета. Их распознавание является ключевым фактором для ранней диагностики, и они позволяют сделать более благоприятный прогноз. Поражения полости рта представляют

собой язвы слизистой оболочки полости рта, неотличимые от обычных афт слизистой оболочки полости рта [2]. Они болезненны и характеризуются циклическим проявлением. Они локализуются на губах, слизистой оболочке щек, мягком небе и языке. Вначале поражение проявляется в виде эритематозного поражения, за которым следует развитие язв. Их размеры могут варьироваться от нескольких миллиметров до сантиметров [3]. Язвы на половых органах меньше и расположены на уровне мошонки, у основания полового члена или на больших половых губах. Поражения глаз присутствуют в 30-70% случаев [4]. Они проявляются как начальная форма светобоязни, за которой следуют увеит и конъюнктивит. В некоторых случаях было обнаружено, что они связаны с глаукомой и катарактой. Поражения кожи имеют папулезный или пустулезный вид и в основном локализуются на туловище или конечностях.

Было сказано, что нет патогномоничных лабораторных данных. Чтобы диагностировать синдром Бехчета, в соответствии с критериями ISG, по крайней мере, два основных признака (поражения полости рта, половых органов или глаз) должны присутствовать, когда исключается другое клиническое объяснение. Действительно, дифференциальная диагностика является сложной задачей, учитывая, что афтозные поражения полости рта очень распространены среди населения в целом. Кроме того, афтозные поражения связаны с ВИЧ, болезнью Крона, саркоидозом и системной красной волчанкой, учитывая, что язвы, специфичные для дуалита, по-видимому, являются уникальным признаком, используемым для дифференциации синдрома Бехчета от различных патологий, упомянутых выше [5].

Лечение синдрома Бехчета основано на применении местного и системного кортизона как такового или в сочетании с иммунодепрессантами. Применение иммуносупрессивных препаратов оправдано отсутствием профилактики рецидивов из-за стратегии лечения монокортикостероидами. Основной целью лечения пациентов с синдромом Бехчета является своевременное лечение кожно-слизистых поражений полости рта, чтобы предотвратить прогрессирование заболевания и предотвратить необратимое поражение органов, особенно в активной фазе. Синдром Бехчета может привести к летальному исходу, особенно в случае поражения сосудов: разрыв аневризмы и тромбоз являются основными причинами смерти [3].

Библиографический список

1. J. W. Mays, M. Sarmadi, and N. M. Moutsopoulos. Oral manifestations of systemic autoimmune and inflammatory diseases: diagnosis and clinical management. // *Journal of Evidence Based Dental Practice*. 2012. vol. 12, no. 3, pp. 265–282.
2. T. M. Chused, S. S. Kassan, G. Opelz, H. M. Moutsopoulos, and P. I. Terasaki. // "Sjögren's syndrome association with HLA-Dw3," *The New England Journal of Medicine*. 1977. vol. 296, no. 16, pp. 895–897.
3. E. Alpsy. Behçet's disease: a comprehensive review with a focus on epidemiology, etiology and clinical features, and management of mucocutaneous lesions. 2016. *The Journal of Dermatology*, vol. 43, no. 6, pp. 620–632.
4. A. Greco, A. De Virgilio, M. Ralli et al. Behçet's disease: new insights into pathophysiology, clinical features and treatment options. // *Autoimmunity Reviews*. 2018. vol. 17, no. 6, pp. 567–575.
5. International Study Group for Behçet's Disease. Criteria for diagnosis of Behçet's disease. // *The Lancet*. 1990. vol. 335, no. 8697, pp. 1078–1080.

СВЯЗЬ МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА И РАЗВИТИЕМ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Шамова П.М., Фильштынская В.С., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. В статье рассмотрен вопрос о связи микробиоты кишечника человека и центральной нервной системы. Приводятся данные научных исследований, подтверждающих взаимосвязь микробиоты кишечника с развитием различных неврологических расстройств, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, депрессий, также изучается влияние микробиоты на стрессоустойчивость. Данная связь осуществляется посредством синтеза различных метаболитов в кишечнике, которые, в свою очередь, могут выступать в качестве нейромедиаторов, участвующих в коммуникации с ЦНС. В основу статьи лег анализ научных данных из отечественных и зарубежных источников.

Ключевые слова: микробиота, кишечник человека, нейродегенеративные заболевания, центральная нервная система, стресс.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE STATE OF THE HUMAN GUT MICROBIOTA AND THE DEVELOPMENT OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Shamova P.M., Filshtynskaya V.S., Soboleva O.M.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. The article considers the question of the relationship between the microbiota of the human intestine and the central nervous system. The data of scientific studies confirming the relationship of the gut microbiota with the development of various neurological disorders, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, depression are presented, and the influence of microbiota on stress resistance is also studied. This connection is carried out through the synthesis of various metabolites in the intestine, which, in turn, can act as neurotransmitters involved in communication with the central nervous system. The article is based on the analysis of scientific data from domestic and foreign sources.

Keywords: microbiota, human intestines, neurodegenerative diseases, central nervous system, stress.

В последние годы ученых все больше привлекает вопрос микробиоты кишечника, происходит оценка важности состояния микробиоты для нормального функционирования человеческого организма. Образ жизни и характер питания современного человека порождают большое количество болезней. Немаловажную часть из них составляют и те, что связаны с психическими процессами: отмечается неуклонный рост количества депрессий, тревожных расстройств, маниакально-депрессивных психозов, нейродегенеративных заболеваний, таких

как: болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз. Этиология этих заболеваний на сегодняшний день является актуальным предметом исследований. Как правило, для лечения таких пациентов используется симптоматическая терапия: назначаются антидепрессанты, анксиолитики и другие препараты. Однако, возможно, стоит рассмотреть проблему психического здоровья человека, с другой стороны. В древности еще Гиппократ говорил, что все болезни начинаются с кишечника. В современном мире ученые уже не отрицают это и активно ведут исследования для выявления связи нейродегенеративных и психических заболеваний с состоянием микробиоты кишечника.

По разным данным, кишечник человека населяет до ста триллионов бактерий с массой более 2 кг, около двух тысяч видов «обслуживают» человека. Кишечная микробиота, включающая все микроорганизмы пищеварительного тракта человека, также рассматривается как «эндокринный орган» за его способность производить многие сотни гуморальных агентов, которые воздействуют не только непосредственно на клетки кишечного эпителия и энтеральную вегетативную нервную систему, но и функционирование дистальных органов и систем организма хозяина. Известно, что микробиота кишечника здорового человека поддерживает общий гомеостаз организма и является сбалансированной. Примерно с начала XX века ученые уже находили связь между психоэмоциональным состоянием человека и работой кишечника. Однако в последние годы внимание исследователей направлено на ось микробиота-кишечник-мозг, именно с учетом состава микробиоты [1].

Колонизация микроорганизмами желудочно-кишечного тракта человека начинается с момента его рождения, далее микробиота дополняется, развивается и формируется. Считается, что заселение и последующее развитие кишечной микробиоты в раннем возрасте может определять эмоциональное, когнитивное и моторное развитие человека, в том числе оказывает непосредственное влияние на будущее психическое и общее здоровье человека. Все дело в том, что именно первичная кишечная микробиота запускает формирование иммунных и физиологических механизмов, включающих кишечную нервную систему, эндокринную и другие детерминанты физиологии желудочно-кишечного тракта, и стимулирует развитие центральной нервной системы [2].

Микробы, населяющие кишечник, синтезируют огромное количество веществ, необходимых организму. Около 36% низкомолекулярных соединений, обнаруживаемых в крови, включая такие нейротрансмиттеры как ГАМК, дофамин, серотонин, норадреналин и оксид азота, имеют микробное происхождение. В качестве примера *Escherichia coli* может выделять дофамин, серотонин и норадреналин, а *Lactobacillus* производят серотонин, ГАМК, ацетилхолин и гистамин, которые могут оказывать влияние на мозг хозяина. Ученые предполагают, что этот механизм играет важную роль в развитии некоторых неврологических заболеваний, включая болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, депрессивные расстройства и расстройства аутистического спектра.

Микроорганизмы-симбионты способны активно участвовать в накоплении общего пула соответствующих нейромедиаторов, а также регулировать нервно-психическую деятельность человека. Какими путями эти соединения могут достигнуть головного мозга? Доказано, что это может быть как гематогенный путь, так и трансназальный – через *n.vagus* [3].

Недавно в современной научной литературе появился термин «психобиотики» – это единичные виды и штаммы бактерий, обладающие психотропными свойствами и способные оказывать благоприятное влияние на здоровье пациентов, страдающих психическими заболеваниями. Эта группа микроорганизмов открывает широкие возможности для их практического использования, позволяя изучать их непосредственное влияние на течение

депрессии, тревожности, стресс-реактивности. Показана эффективность психобиотиков в борьбе с симптомами депрессии или хронической усталости, что может быть связано с противовоспалительной функцией отдельных психобиотиков и способностью уменьшать активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [2,4,5].

Многочисленные исследования на мышах показывают связь между мозгом и кишечником. Для изучения тревожности, депрессии, аутизма и различных аспектов когнитивной функции методы исследования на животных включали в себя применение психобиотиков, пробиотиков, инфекционных агентов, антибиотиков. В результате животные, инфицированные патогенными бактериями, были более тревожны и имели сниженные когнитивные способности. При употреблении антибиотиков, которые в свою очередь приводили к изменению состава микробиоты кишечника, наблюдалось снижение тревожности. При введении пробиотических бактерий наблюдали не только увеличение устойчивости к стрессам, но и улучшение познавательной способности у животных.

Интересным является эксперимент по созданию дисбаланса микробиоты опытных животных путем введения антибиотиков широкого и узкого спектра и, таким образом, получение линий со стерильным кишечником – гнотобионтов. В поведении таких животных наблюдались явления, подобные депрессии, тревоги, а также выключение нейронов гиппокампа и снижение поискового поведения. Последующее заселение кишечника этих мышей пробиотическими бактериями, например, *Lactobacillus casei* DG, приводило к нормализации поведенческих реакций. Также для оценки влияния микробиоты на стресс использовались гнотобиотические формы мышей, у которых содержание гормонов стресса кортикостерона и адренокортикотропного гормона было значительно выше, чем у мышей с микробиотой. При введении таким животным пробиотической бактерии *Bifidobacterium infantis* произошло значительное снижение уровня стрессовых гормонов, что указывало на участие бактерий в эндокринном ответе на стресс [2,3].

В одном из последних исследований был сделан вывод о том, что подверженность стрессу крыс «в юности» вызывает нарушения в составе микробиоты и ведет к более интенсивным стрессовым реакциям в зрелости. Важно, что в этом исследовании обнаружили следующий факт: если крысам давать пробиотические лактобактерии, уровень стрессовых гормонов нормализуется [6].

Также проводили эксперимент на безмикробных мышах, целью которого было подтверждение важности нормальной микробиоты для множества важных процессов в головном мозге. Один из исследуемых процессов – это метаболизм серотонина, нейромедиатора, отвечающего за настроение и аппетит. В основном он вырабатывается энтерохромаффинными клетками [7]. Предшественником серотонина является триптофан. Исследования показали, что у безмикробных мышей повышен уровень триптофана в плазме и снижен уровень серотонина в сыворотке. В этом же исследовании удалось установить, что у таких грызунов наблюдается пониженная экспрессия критического нейротрофического фактора, отвечающего за поддержание и стимулирование нейрогенеза. Обнаружили также, что у таких мышей наблюдались когнитивные нарушения, депрессивное и тревожное поведение, проблемы с общительностью [8].

Немногочисленные исследования по пересадке микробиоты от людей с депрессивным расстройством к грызунам без микробов или с дефицитом микробиоты показали индукцию депрессоподобного фенотипа, включая ангедонию и тревожное поведение, чего не наблюдалось у мышей, получавших трансплантацию микробиоты от здоровых контролей [6].

К сожалению, на данный момент нет точного понимания, какие микробы контролируют определенные психоэмоциональные состояния – есть только разрозненные сведения о связи отдельных видов бактерий с теми или иными симптомами. Однако удалось выявить, что существует связь между уменьшением *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и повышением уровня депрессии. Также рост числа гемолитических микроорганизмов сочетался с выраженным проявлением тревоги и депрессивных проявлений [9]. Низкий уровень *Bifidobacterium* и/или *Lactobacillus* наблюдается у людей с депрессивным расстройством, а низкий уровень только *Bifidobacterium* замечен в микробиоте у пациентов с болезнью Альцгеймера. Относительное обилие противовоспалительных бактерий, в том числе роды *Blautia*, *Roseburia* и *Coprococcus*, было значительно ниже в пробах кала от пациентов с болезнью Паркинсона. У детей с аутизмом в целом выявлено отсутствие разнообразия в микробиоте [4].

Большой интерес представляют исследования с участием людей. Чтобы доказать влияние микробиоты кишечника на поведение человека, ученые ищут взаимосвязь между приемом пробиотиков, пребиотиков и улучшением динамики депрессивных и невротоподобных состояний. Для оценки результатов состояния пациентов проводят анкетирование. Например, показано, что после трехнедельного приема штамма *Lactobacillus casei* Shirota происходит улучшение настроения у 3,0% испытуемых, находившихся в плохом настроении. Другое исследование показало, что комбинация *Bifidobacterium longum* и *Lactobacillus helveticus* улучшает динамику преодоления депрессии [1].

Некоторые исследования утверждают, что дисбаланс питания и кишечной микробиоты могут быть одними из главных причин нарушения формирования эпигенетической программы развития отдельного организма. Это в свою очередь может привести к развитию метаболических расстройств, которые могут нарушать обмен нейротрансмиттеров и приводить к развитию нейродегенеративных заболеваний или усугублять их течение [10].

В исследовании эффекта приема пробиотиков на течение болезни Альцгеймера у мышей было замечено улучшение способностей к обучению и памяти при одновременном увеличении *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. и снижении колиформных бактерий в фекалиях. Кроме того, добавление к терапии молока, ферментированного *L. fermentum* или *L. casei*, также увеличивали способности к обучению и запоминанию у подопытных мышей [11].

На фоне болезни Паркинсона при приеме пробиотиков, содержащих *L. acidophilus*, *B. bifidum*, *L. reuteri*, *L. fermentum*, в течение 12 недель уменьшились клинические проявления заболевания. Также отмечались улучшение синтеза инсулина, увеличение уровня глутатиона, уменьшение уровня провоспалительных цитокинов. При контакте с эпителием кишечника пробиотики вызывали синтез нейропептидов и нейротрансмиттеров, таких как нейропептид Y, субстанция P, серотонин, глюкагоноподобный пептид, холецистокинин [12].

Стоит отметить, что под влиянием экзогенных факторов и такого важного фактора как возраст, в крови увеличивается количество поступающих эндотоксинов грамотрицательных бактерий, а также метаболитов, продуктов распада микроорганизмов в целом. Гематогенно или транснейтрально данные вещества достигают головного мозга и, участвуя в обмене нейротрансмиттеров и дегенерации миелиновых волокон, потенцируют развитие нейродегенеративных заболеваний. Дисбаланс кишечной микробной экологии, тяжелые соматические заболевания, широкий спектр используемых медикаментозных средств (антибиотики, слабительные, антациды и др.) – все это факторы, способствующие углублению нарушений микробной экологии пищеварительного тракта. Можно предположить, что прием как пребиотиков, так и пробиотиков совместно с устранением вредных привычек способны

улучшить состояние не только кишечной микробиоты, но и состояние организма в целом: как органическое, так и психоэмоциональное.

Таким образом, исследования микробного состава кишечника человека действительно становится особенно глобальным и значимым направлением в области современной биомедицины. В связи с возникновением новых технологий, разработкой новых концепций и междисциплинарного объединения молекулярных генетиков, медиков, микробиологов, физиологов и биохимиков, удается установить связь и выявить влияние нарушения функции оси кишечник-мозг. На сегодняшний день установлено, что начальная микробиота человека может влиять на развитие головного мозга человека через синтезируемые ею нейроактивные вещества, также изменение состава микробиоты тесно связано с изменениями в реакции на стресс и может способствовать развитию таких нервно-психических заболеваний, как депрессия, расстройства аутистического спектра, расстройство сна, болезнь Паркинсона, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и других. Для коррекции психоэмоциональных нарушений и психических заболеваний, улучшения качества жизни человека необходима здоровая микробиота кишечника с ее полноценным составом. Роль конкретных микробов на развитие как психических, так и нейродегенеративных заболеваний не до конца изучена, однако если уже доказано наличие их значимости, то, продолжив исследования в этой области, можно достигнуть прогресса в лечении пациентов не только с психопатологией, а, возможно, даже и более широкого спектра заболеваний. Изучение взаимодействия микроорганизмов кишечника и человеческого мозга не только позволит лучше понять патогенез нервно-психических расстройств, но и предоставит новые возможности для разработки новых методов иммуно- или микробной терапии.

Библиографический список

1. Ignatova V. Influence of Gut Microbiota on Behavior and Its Disturbances, Behavioral Neuroscience, Sara Palermo and Rosabella Morese, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.85317. Available at:<https://www.inteshopen.com/books/behavioral-neuroscience/influence-of-gut-microbiota-on-behavior-and-its-disturbances> (accessed 01.10.2022).
2. Аверина О.В., Даниленко В.Н. Микробиота кишечника человека: роль в становлении и функционировании нервной системы // Микробиология, 2017, том 86, №1, С.5-24.
3. Giulia Enders. Gut: The Inside Story of Our Body's Most Underrated Organ. 2017. 210 p.
4. Li-Hao Cheng, Yen-Wenn Liu Psychobiotics in mental health, neurodegenerative and neurodevelopmental disorders. Journal of food and drug analysis. 2019. p. 632- 648.
5. Roshchina V.V. New trends and perspectives in the evolution of neurotransmitters in microbial, plant, and animal cells. Advances in Experimental Medicine and Biology. 2016; 874: 25-77.
6. Stephanie G. Cheung, Ariel R. Goldenthal: Systematic Review of Gut Microbiota and Major Depression. Am. 2019; Front. // at:<https://www.ncbi.nlm.gov/pubmed/30804820> (accessed 11.09.2019).
7. Berger, M.; Gray, J.A.; Roth, B.L. The Expanded Biology of Serotonin. Annu. Rev. Med. 2009, 60,355-366
8. Luczynski, P.; Neufeld, K.-A.M.; Oriach, C.S.; Clarke, G.; Dinan, T.G.; Cryan, J.F. Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. Int. J. Neuropsychopharmacol. 2016, 19, 1-17.

9. Можелис Ю.В. Психопатологические состояния, СРК, микробиота кишечника и их взаимосвязь // Terra medica nova. 2009. №2. С.32.
10. Шендеров Б.А. Кишечная микробиота и нейродегенеративные заболевания // Неврология, спецвыпуск. 2016. №1. С. 9-13.
11. Athari Nik Azm S, Djazayeri A, Safa Probiotics improve insulin resistance status in an experimental model of Alzheimer's disease. // Med J Islam Repub Iran. 2017; (103): 18-31.
12. Cani PD, Knauf C. How gut microbes talk to organs: the role of endocrine and nervous routes. Molecular Metabolism. 2016; (743): 245-250.

БОКАПАРВОВИРУСЫ – НОВОЕ «ЛИЦО» В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Тиунова К.Р., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Недавно открытые бокапарвовирусы значимы в клинической медицине, так как понимание их особенностей может помочь вылечить пациента и избежать осложнений при острых респираторных вирусных инфекциях бокапарвовирусной этиологии.

Ключевые слова: этиология, клиника, патогенез, лечение, профилактика.

BOKAPARVOVIRUSES ARE A NEW «FACE» IN HUMAN INFECTIOUS PATHOLOGY

Tiunova C. R., Soboleva O. M.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Kemerovo State Medical University», Kemerovo, Russia

Abstract. Recently discovered bocaparvoviruses are significant in clinical medicine, as understanding their features can help cure the patient and avoid complications in acute respiratory viral infections of bocaparvovirus etiology.

Keywords: etiology, clinic, pathogenesis, treatment, prevention.

В Швеции в 2005 году были открыты бокапарвовирусы, которые отличались от других родов семейства Parvoviridae кодированием нового белка под названием NP1. Учёные определили генетическое родство бокапарвовируса человека с двумя парвовирусами животных: бычьим парвовирусом (bovine parvovirus) и парвовирусом собак (canine minute virus). Бокапарвовирус человека обычно обнаруживается у младенцев и детей. Чаще болеют мальчики, чем девочки. У взрослых при тесном контакте с больными людьми могут быть легкие симптомы острого респираторного заболевания, в редких случаях вирус обнаруживается при пневмонии, возникшей на фоне иммунодефицита [1].

По данным 2022 года насчитывают 28 видов бокапарвовирусов. Их безоболочечные вирионы имеют кубический тип симметрии и размер 25 нм. Капсид состоит из 32 капсомеров. Геном вирусов представлен одноцепочечной линейной молекулой ДНК длиной около 5300 нуклеотидов, которая кодирует неструктурные белки (NS1, NS2, NS3, NS4, NS70 и NP1) и структурные полипептиды (VP1, VP2, VP3). Способность образовывать шпилечные структуры позволяет вирусу на протяжении длительного времени персистировать в организме человека после перенесённого заболевания. Об этом может также свидетельствовать наличие ДНК вируса в лимфоэпителиальной ткани аденоидов. Геном вируса в зависимости от стадии инфекционного процесса может быть в трех формах: при латентной стадии в кольцевой

молекуле (эписома), при подготовке к репликации при наличии благоприятных условий в суперспирализованной молекуле и при развитии клинических симптомов в линейной молекуле ДНК [2].

Репликация вируса происходит в ядре. Проникновение в клетку-хозяина достигается путём присоединения к рецепторам хозяина с помощью клатрин-зависимого эндоцитоза. Бокапарвовирусы человека реплицируются автономно, но не отрицается наличие вирусом-помощников. Бокапарвовирусы поражают терминально дифференцированные эпителиальные клетки в слизистых оболочках дыхательных путей (HBoV1) и кишечника (HBoV2–4). Вирус не требует активного деления клеток для достижения продуктивной репликации. Фактически, репликация не зависит от клеточного цикла, и вирус задействует механизм восстановления повреждения клеточной ДНК для репликации генома. Очень часто инфекция сопровождается присоединением респираторно-синцитиального вируса человека, аденовируса, риновируса, метапневмовируса, парагриппа, гриппа А и В, коронавируса. Вирус выходит из клетки-хозяина путём экспорта ядерных пор [3].

Источниками инфекции являются люди, крупный рогатый скот и собаки. Заражение бокапарвовирусной инфекцией происходит воздушно-капельным или алиментарным путём. В группу риска входят медицинские работники, лица с иммунодефицитом, употребляющие внутривенно наркотические средства, больные гемофилией, получавшие внутримышечные инъекции, и люди после трансплантаций органов.

Вид *Primate bocaparvovirus 1* у людей вызывает преимущественно бронхолит и пневмонию. Вид *Primate bocaparvovirus 2* вызывает чаще гастроэнтерит, бронхиальную пневмонию и ОРВИ. Общими симптомами бокапарвовирусных инфекций человека являются лихорадка, кашель, головная боль, выделение мокроты, хрипы, свистящее дыхание, фарингит, ларингит, ринит, рвота, диарея, бронхит, синусит и обострения бронхиальной астмы [4].

Во время инфекции организм индуцирует системный иммунный ответ. В остром периоде отмечается непродолжительная виремия, сопровождающаяся последовательным образованием антител класса М и G. У людей, перенесших бокапарвовирусную инфекцию, отмечается формирование стойкого иммунного ответа. Практически все беременные женщины имеют иммуноглобулины класса G к HBoV1, что исключает внутриутробное инфицирование.

Для диагностики бокапарвовирусной инфекции необходим исследуемый материал – назофарингеальные смывы, фекальные образцы, кровь, спинномозговая жидкость, моча, жидкость из среднего уха. ДНК бокапарвовирусов обнаруживается методом полимеразной цепной реакцией, которая обладает высокой специфичностью и чувствительностью. Это позволяет работать с любым типом клинического материала, а также с образцами в замороженном состоянии. Выделение вируса на культурах клеток в настоящее время затруднительно, так как отсутствует простая биологическая модель для культивирования вируса. Белки бокапарвовируса человека выявляют иммуноферментным анализом. Также необходимо исключить у пациента факторы риска развития инфекции, такие как недоношенность, сердечно-легочные патологии и бронхиальная астма. Изменения в анализе крови носят неспецифический характер в виде нейтрофилиеза, сдвига лейкоцитарной формулы до палочкоядерных форм и повышения скорости оседания эритроцитов у трети пациентов с HBoV-инфекцией. Уровень С-реактивного белка у детей с различными клиническими проявлениями инфекции в основном не превышает 50 мг/л. Рентгенограмма органов грудной клетки объективно не отражает имеющийся объем и характер воспалительного процесса в легких, что в ряде случаев требует проведения компьютерной томографии легких. Ранняя

диагностика этиологии острых респираторных инфекций позволяет провести рациональную этиотропную терапию, прогнозирование тяжести заболевания, предотвращения осложнений и внутрибольничного заражения, что значительно сокращает сроки госпитализации [5,6].

Специфической терапии бокапарвовирусных инфекций в настоящее время не разработано, но отмечена чувствительность бокапарвовируса человека к цидофовиру – противовирусное средство, подавляющее репликацию цитомегаловируса путём селективного ингибирования синтеза вирусной ДНК. Пациентов лечат симптоматически с помощью жаропонижающих, ферментов, пробиотиков и антигистаминных. Основными методами лечения являются кислородно-медикаментозные, аэрозольные ингаляции для больных с ларинготрахеитом, стенозом гортани и бронхообструктивным синдромом. Ингаляции назначаются в зависимости от тяжести общего состояния и обеспечивают подачу лекарственных средств (эуфиллин, нафтизин, глюкокортикостероиды) через дыхательные пути. Если у пациентов вязкая мокрота, назначаются муколитики (АЦЦ, мукалтин). При гиперпродукции секрета рекомендуются перкуссионный массаж или постуральный дренаж для удаления слизи из бронхов. При наличии показаний назначают приём антибиотиков (цефалоспорины, макролиды), противовирусные препараты (альгирем, интерферон лейкоцитарный, виферон) [7].

Профилактика бокапарвовирусной инфекции заключается в постоянном мытье рук, исключении переохлаждений весной и осенью, проветривании комнат, избегании людных мест и тесных контактов с простуженными людьми. Если у пациента есть группы риска осложнений гриппа: беременность, сахарный диабет, хроническая болезнь легких, ожирение, возраст больше 60 лет – желательно ставить прививки от гриппа, чтобы избежать осложнений в виде вирусной пневмонии и дыхательной недостаточности. Разрабатываются профилактические препараты на основе VP2 вирусоподобных частиц. В опытах показана их способность индуцировать выраженный гуморальный и клеточный ответ у мышей.

Бокапарвовирус человека играет немаловажную роль в этиологии ОРВИ у детей и взрослых. Клинически инфекция во многом сходна с типичными респираторными инфекциями, но в большинстве случаев приводит к развитию бронхообструктивного синдрома и нередко характеризуется явлениями диспепсии. Прогноз для пациентов хороший, если патогенетическая и симптоматическая терапия начинается в начале заболевания. Именно поэтому нужно знать особенности диагностики и лечения бокапарвовирусной инфекции для будущей успешной и грамотной работы врачом.

Библиографический список

1. Kozulina I.S., Samsygina G.A., Isayeva Ye.I., Legkova T.P., Shevchenko N.N., Donin I.M., Pavlov S.A. Bokavirus in etiology of respiratory diseases in infants and preschool age children // scientific article.-2009.-V.8.-№3.-P.15-16.
2. Sivets N.V., Shmeleva N.V., Lapo T.P. Bocaparovirus infection in children in the republic of Belarus: molecular and epidemiological aspects // scientific article.-2019.-V.11.-№4.-P.114.
3. Kanner E.V., Krutikhina S.B., Gorelov A.V. Bocavirus infection in children at the current stage // scientific article.- 2017.-№5.-P.36.
4. Isaeva E.I. The new respiratory viral infections // a scientific article.-2015.-V.21.-№1.-P.38
5. Kanner E.V., Krutikhina S.B., Gorelov A.V. Bocavirus infection in children at the current stage // scientific article.-2017.-№5.-P.37.

6. Sharipova E. V., Babachenko I. V., Shcherbatyh M. A. Respiratory tract damage with bocavirus infection in children // scientific article.-2020.-V.19.№2.-P.18.
7. Vartanyan R.V., Shvetsova Yu.V., Bunin S.V., Yatsishina S.B., Malyshev N.A. Bocavirus infection in infants // scientific article.-2010.-V.9-№3.-P.13.

ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП TH17

Усанина Д.И.^{1,2}, Тимганова В.П.¹, Бочкова М.С.^{1,2}, Шардина К.Ю.¹, Ужвиюк С.В.¹

¹ *Институт экологии и генетики микроорганизмов – филиал ФГБУН Пермского федерального исследовательского центра УрО РАН, Пермь, Россия*

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Аннотация. Изучали прямой эффект наночастиц оксида графена (ОГ) на цитокиновый профиль активированных Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17. Достоверные эффекты были выявлены при использовании ОГ в концентрации 25 мкг/мл: наночастицы, модифицированные линейным полиэтиленгликолем (ПЭГ), повышали продукцию IFN- γ , а модифицированные разветвлённым ПЭГ – подавляли синтез IL-17. Низкая концентрация пегилированных наночастиц ОГ (5 мкг/мл) не оказывала влияния на цитокиновый профиль Т-хелперов.

Ключевые слова: оксид графена, цитокиновый профиль, IL-17-продуцирующие Т-хелперы (Th17).

INFLUENCE OF GRAPHENE OXIDE NANOPARTICLES ON THE CYTOKINE PROFILE OF ACTIVATED T-HELPERS POLARIZED INTO PHENOTYPE TH17

Usanina D.I.^{1,2}, Timganova V.P.¹, Bochkova M.S.^{1,2}, Shardina K. Yu.¹, Uzhviyuk S.V.¹

¹ *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, branch of the Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Abstract. We investigated the direct effect of graphene oxide (GO) nanoparticles on the cytokine profile of activated T-helpers polarized into phenotype TH17. It was found that GO nanoparticles (concentration 25 $\mu\text{g/ml}$) modified with linear polyethylene glycol (PEG) significantly increased the the production of IFN- γ , whereas those modified with branched PEG suppressed the synthesis of IL-17. A low concentration of pegylated GO nanoparticles (5 $\mu\text{g/mL}$) does not affect the cytokine profile of T-helpers.

Keywords: graphene oxide, cytokine profile, IL-17-producing helper T cells (Th17).

Графен – одна из аллотропных модификаций углерода, обладающая уникальным набором свойств: высокой теплопроводностью и электропроводностью, каталитической и антимикробной активностью и пр.

В настоящее время активно изучается возможность использования препаратов на основе графена в области биомедицины, что, однако, осложняется цитотоксичностью графена [1, 2]. Риск возникновения иммунного ответа снижается при использовании биосовместимых полимеров (например, полиэтиленгликоль) для функционализации поверхности наночастиц [3, 4, 5]. По этой же причине предпочтительно использование окисленной формы графена (оксид графена, ОГ), так как карбоксильные группы облегчают процесс поверхностной модификации.

Перед исследователями стоит задача изучения биосовместимости графена, конкретно – его взаимодействие с иммунными клетками, так как именно они будут первыми контактировать с инородными частицами. Этот вопрос активно изучается, накопленные знания позволяют заключить, что характер воздействия наночастиц ОГ определяется комплексом факторов, таких как размеры, концентрация, конфигурация, функционализация, тип клеток и пр. [6].

Имеются разносторонние данные о влиянии графена на клетки как врождённого, так и адаптивного иммунитета, однако на данный момент нет информации о влиянии на цитокиновый профиль провоспалительной субпопуляции IL-17-продуцирующих лимфоцитов (Th17). Таким образом, целью настоящей работы являлась оценка эффектов наночастиц ОГ на цитокиновый профиль активированных Т-хелперов, поляризованных в фенотип Th17.

Исследование проводили в соответствии с Хельсинской Декларацией ВМА 2000 г. и протоколом Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине 1999 г., на используемую экспериментальную схему получено разрешение Этического комитета «ИЭГМ УрО РАН» (IRB00010009) от 30.08.2019. Для оценки эффектов наночастиц оксида графена на продукцию цитокинов Т-хелперами использовали активационную модель, которая имитирует процесс взаимодействия Т-лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками (АПК) в присутствии провоспалительных цитокинов (IL1 β +IL6) [7]. Взаимодействие Т-хелперов с TCR-активатором, заменяющим в системе *in vitro* АПК, инициирует такие процессы, как активация, дифференцировка и продукция цитокинов.

В работе использовали CD4⁺ клетки, выделенные из мононуклеаров периферической крови (МПК) здоровых доноров (n=5), и наночастицы оксида графена размером 100-200 нм («Ossila Ltd», Великобритания), которые мы покрывали линейным (П-ОГ) и разветвленным (рП-ОГ) полиэтиленгликолем. Модификацию частиц ОГ осуществляли ранее описанным методом [8].

МПК получали центрифугированием в градиенте плотности «Диаколла» (1,077 г/см³) («Диа-М», Россия). Для получения наивных CD4⁺ Т-клеток из суспензии МПК, был использован метод негативной иммуномагнитной сепарации (MACS® MicroBeads and MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия). После сепарации оценивали количество клеток и их жизнеспособность с использованием красителя Trypan blue 0,4% («InVitrogen», США). Чистота выделенных наивных Т-клеток была подтверждена окрашиванием CD45R0, CD45RA и CD62L (CD45RA-FITC, CD45R0-PE (BioLegend, США) и CD62L-APC (Miltenyi Biotec, Германия) на проточном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Средний процент клеток NAÏVE (CD45R0-CD45RA⁺ CD62L⁺) от общего события составлял ~70% от гейта лимфоцитов.

Изолированные наивные CD4⁺ клетки культивировали в 96-луночных планшетах (в концентрации 10⁶ клеток/мл) в бессывороточной полной питательной среде (среда TexMACS™ (Miltenyi Biotec)) с добавлением 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамин (ICN

Pharmaceuticals, США) и пенициллина-стрептомицина-амфотерицина В (BI, Израиль) во влажной атмосфере в CO₂-инкубаторе при 37° С и 5% CO₂ в течение 7 дней без замены среды.

Для индукции лимфоцитов в фенотип Th17 в культуры вносили рекомбинантные цитокины IL-1β (20 нг/мл), IL-6 (30 нг/мл), IL-23 (30 нг/мл), TGF-β (2,25 нг/мл); антитела против IL-4 (2,5 мкг/мл) и антитела к IFN-γ (1 мкг/мл) в соответствии с рекомендациями Miltenyi Biotec. В качестве активатора Т-лимфоцитов через Т-клеточный рецептор (T-cell receptor, TCR) использовали «T-Cell Activation/Expansion Kit, human» (TCR-активатор) (Miltenyi Biotec, Германия) – частицы MACSiBead™, нагруженные антителами против CD2, CD3, CD28 человека.

Наночастицы П-ОГ и рП-ОГ добавляли в культуры до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. Культуры без наночастиц ОГ служили контролем.

Жизнеспособность клеток после 7 дней инкубации, определенная с помощью окрашивания Zombie aqua (ZA) (Invitrogen, США), составила 73,28 ± 8,36% от негейтированных событий и 96,29 ± 1,381% от гейта лимфоцитов.

После окончания инкубации супернатанты культур осветляли центрифугированием на 14000 g и замораживали. Затем в супернатантах культур Th17-поляризованных клеток при помощи мультиплексного анализа определяли содержание следующих цитокинов и хемокинов: IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, MCP-1, MIP-1β, TNF-α (набор “Bio-Plex Pro™ Human Cytokine Grp I Panel 17-Plex”, Bio-Rad, США). Содержание IL-6 и IL-1β не оценивали, так как эти цитокины были внесены в культуру для поляризации Т-хелперов в фенотип Th17.

Результаты регистрировали с помощью мультиплексного анализатора MAGPIX® (Merck Millipore, США) с использованием программного обеспечения xPONENT®. Для построения стандартных кривых использовали пятипараметрический логистический (5PL) метод анализа. Обработку полученных данных осуществляли в программе Belysa® Immunoassay Curve Fitting Software.

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prizm 8.0.1, используя тест Фридмана и post-hoc тест Данна для множественных сравнений. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей (Me (Q1–Q3)). Уровень значимости принимали за 0,05.

При анализе цитокинового профиля было установлено, что оба вида пегелированных наночастиц ОГ не влияли на уровень MIP-1β, MCP-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, и TNF-α, GM-CSF, G-CSF (Рисунок).

Однако, обнаружено, что под воздействием наночастиц ОГ, модифицированных линейным ПЭГ, в концентрации 25 мкг/мл в культурах, активированных Т-хелперов повышалась продукция IFN-γ, а ОГ, модифицированный разветвлённым ПЭГ, понижал продукцию клетками IL-17 – ключевого цитокина Th17 (Таблица).

Полученные данные в очередной раз подтверждают, что характер воздействия наночастиц оксида графена зависит от множества факторов, в данном случае играют роль концентрация и способ функционализации частиц.

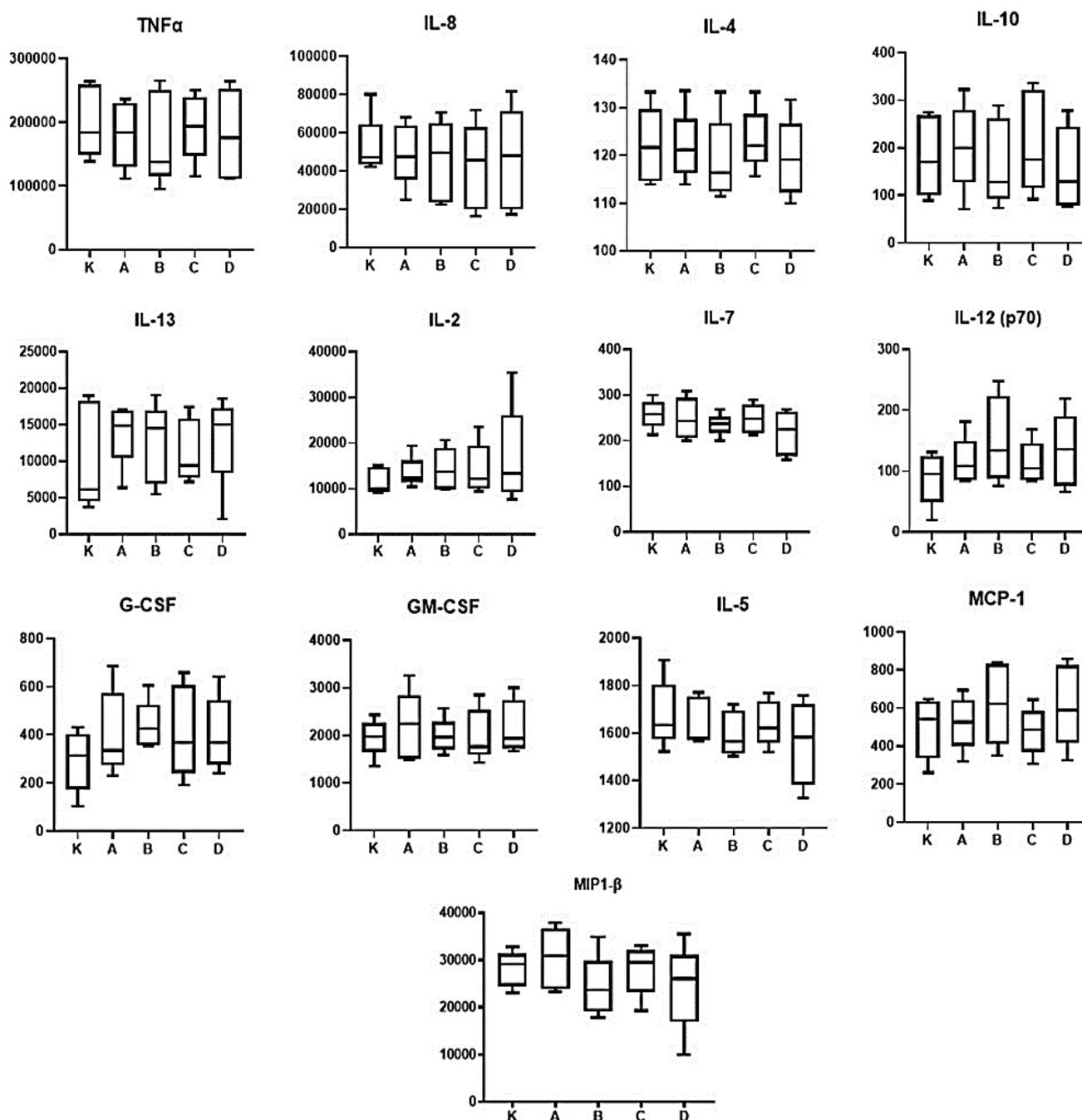


Рисунок – Концентрации цитокинов в супернатантах культур Th17-поляризованных клеток после инкубации в присутствии наночастиц оксида графена. По оси абсцисс – вид и концентрация наночастиц (К – контроль; А – П-ОГ 5 мкг/мл; В – П-ОГ 25 мкг/мл; С – рП-ОГ – 5 мкг/мл; D – рП-ОГ 25 мкг/мл), по оси ординат – концентрация цитокинов, пг/мл. Границами гистограммы показан межквартильный размах (Q1–Q3), линией в центре гистограммы – медиана (Me), “усами” – минимум и максимум.

Выяснено, что на цитокиновый профиль поляризованных Th17-клеток влияют лишь наночастицы в больших концентрациях (25 мкг/мл), причём, в зависимости от типа ПЭГ, покрывающего клетки, эффекты различаются. Наночастицы, покрытые разветвлённым ПЭГ, понижают секрецию IL-17, а наночастицы, покрытые линейным ПЭГ, повышают секрецию IFN-γ.

Таблица – Концентрация цитокинов в супернатантах культур Th17-поляризованных Т-хелперов после инкубации в присутствии наночастиц оксида графена, пг/мл, Ме (Q1-Q3)

	Контроль	П-ОГ 5 мкг/мл	П-ОГ 25 мкг/мл	рП-ОГ 5 мкг/мл	рП-ОГ 25 мкг/мл
IFN- γ	573,0 (528,0 – 982,5)	913,0 (606,0 – 1131,0)	1048 (632,5 – 1399,0)	934,0 (627,5 – 1010,0)	943,0 (554,0 – 1140,0)
Значение «р» в сравнении с контролем	-	0,6461	0,0055	0,9206	0,9206
IL-17	2149 (1799,0 – 3470,0)	2350 (1399,0 – 3372,0)	1969 (1374,0 – 2283,0)	2875 (1611,0 – 3780,0)	1827 (1072,0 – 2275,0)
Значение «р» в сравнении с контролем	-	>0,9999	0,2874	>0,9999	0,0373

Таким образом, установлено влияние пегилированного ОГ на цитокиновый профиль активированных Т-хелперов. Важно отметить, что эффекты имели место лишь при использовании наночастиц ОГ в высоких концентрациях. Низкая же концентрация пегилированных наночастиц ОГ (5 мкг/мл) не оказывает влияния на цитокиновый профиль, поэтому именно эту концентрацию можно использовать в дальнейшем для углубленных исследований функций Т-лимфоцитов и других иммунных клеток.

Работа поддержана грантом РФФ 19-15-00244-П.

Библиографический список

1. Dudek I., Skoda M., Jarosz A., Szukiewicz. The molecular influence of graphene and graphene oxide on the immune system under in vitro and in vivo conditions // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz). – 2016. – V. 64. – №3. – P. 195–215.
2. Tang Z., Zhao L., Yang Z., Liu Z., Gu J., Bai B., Liu J., Xu J., Yang H. Mechanisms of oxidative stress, apoptosis, and autophagy involved in graphene oxide nanomaterial antiosteosarcoma effect // Int. J. Nanomedicine. – 2018. – V. 13. – P. 2907–2919.
3. Makharza S., Cirillo G., Bachmatiuk A., Ibrahim I., Loannides N., Trzebicka B., Hampel S., Rümmeli M. H. Graphene oxide-based drug delivery vehicles: functionalization, characterization, and cytotoxicity evaluation // J. Nanoparticle Research. – 2013. – V. 15. – № 12. –P. 2099.
4. Kiew S.F., Kiew L.V., Lee H.B., Imae T., Chung L.Y. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review // J. Controlled Release. – 2016. – V. 226. – P. 217–228.
5. Orecchioni M., Jasim D.A., Pescatori M., Manetti R., Fozza C., Sgarrella F., Bedognetti D., Bialco A., Kostarelos K., Delogu L. G. Molecular and genomic impact of large and small lateral dimension graphene oxide sheets on human immune cells from healthy donors // Adv. Healthcare Mater. – 2016. – V. 5. – P 276–287.
6. Orecchioni M., Bedognetti D., Newman L., Fuoco C., Spada F., Hendrickx W., Marincola F.M., Sgarrella F., Rodrigues A.F., Ménard-Moyon C., Cesareni G., Kostarelos K., Bianco A., Delogu

- L.G. Single-cell mass cytometry and transcriptome profiling reveal the impact of graphene on human immune cells // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – № 1. – P. 1109.
7. Paiva P., Hannan N.J., Hincks C., Meehan K.L., Pruyssers E., Dimitriadis E., Salamonsen L.A. Human chorionic gonadotrophin regulates FGF2 and other cytokines produced by human endometrial epithelial cells, providing a mechanism for enhancing endometrial receptivity // *Hum. Reprod.* – 2011. – Vol. 26. – № 5. – P. 1153–1162.
 8. Khramtsov P.V., Bochkova M.S., Timganova V.P., Nechaev A.I., Uzhviyuk S.V., Shardina K.Y., Maslennikova I.L., Rayev M.B., Zamorina S.A. Interaction of Graphene Oxide Modified with Linear and Branched PEG with Monocytes Isolated from Human Blood // *Nanomaterials.* – 2021. – Vol. 12. – №1. – P. 126.

ВЛИЯНИЕ КОШАЧЬЕГО АЛЛЕРГЕНА FEL D 1 НА ЧЕЛОВЕКА И МЕТОДЫ ЕГО НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Федорова Е.Ю.

Красноярский государственный аграрный университет, Красноярск, Россия

Аннотация. Один из основных источников ингаляционных аллергенов в помещении – это кошки. Несмотря на распространенность и потенциальную тяжесть аллергических заболеваний, схемы лечения направлены только на купирование симптомов. Но важнее устранить источник болезни, а именно нейтрализовать белок Fel d 1.

Ключевые слова: ингаляционные аллергены, Fel d 1, кошки, аллергия.

INFLUENCE OF CAT ALLERGEN FEL D1 ON HUMANS AND METHODS OF ITS NEUTRALIZATION

Fedorova E. Yu.

Krasnoyarsk State Agrarian University, Krasnoyarsk, Russia

Abstract. One of the main sources of indoor airborne allergens is cats. Despite the prevalence and potential severity of allergic diseases, treatment regimens focus only on symptomatic relief. But it is more important to eliminate the source of the disease, namely, to neutralize the Fel d 1 protein.

Keywords: inhalant allergens, Fel d 1, cats, allergy.

Аллергия (от греч. *allos* – другой, *ergon* – действие) – одна из форм иммунного ответа, которая характеризуется высокой специфичностью с развитием сенсибилизации и накоплением в организме иммуноглобулинов или CD4 Т-лимфоцитов воспаления. В результате происходит повышение чувствительности к аллергену, и при его повторном проникновении возникает аллергическое заболевание [1].

По прогнозам ВОЗ XXI век стал эпохой аллергии, это обуславливается увеличением в 2-3 раза симптомов у людей каждые 10 лет. Среди всех заболеваний, аллергические занимают третье место по всему миру. Так, каждый пятый человек подвержен аллергической реакции [2].

Отмечено увеличение проявления аллергии на кошек. На данный момент болеют как взрослые, так и дети по статистике 10% и 14% соответственно. Кошки являются основным источником ингаляционных аллергенов в помещении после клещей домашней пыли.

Заболевание вызывает аллерген Fel d 1. Это белковый комплекс секретоглобина размером примерно 35-39 кДа. Он вырабатывается слюнными и слюнными железами кошек, причем самые высокие концентрации обнаруживаются в слюне. Животные вылизываются, тем самым распространяют белок по шерсти, мебели, одежде и так далее. Кроме того, его

небольшой размер позволяет непрерывно находиться в воздухе в течение длительных периодов времени, что делает его одним из самых легких аллергенов для вдыхания. Вдобавок, белок может перемещаться на одежде и других предметах из домов, где есть кошки, в места, где их нет, принося вред другим людям. Традиционно терапия аллергии заключается в приеме антигистаминных препаратов. Но были разработаны новые методы лечения.

1) Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) – это вариант лечения пациентов введением минимальных доз аллергена с нарастающей последовательностью. Хотя терапия может обеспечить длительную защиту от аллергических заболеваний, она сопряжена с риском побочных реакций, имеет разную эффективность у больных и может занять минимум от пяти лет. Но данный метод пока не зарегистрирован на территории РФ, в отличие от Запада [3].

2) Технология редактирования геномов CRISPR/Cas9 для кошек находится еще в экспериментальной стадии (*in vitro*). Научные работники готовятся перейти к стадии *in vivo*, то есть применить данный метод на живом организме. За основу взята модель взаимодействия бактерии с вирусом-бактериофагом. В ДНК бактерии находятся короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами – сокращенно CRISPR. Эти участки состоят из прямых повторяющихся последовательностей, которые разделены спейсерами. Механизм приспособления бактерии к вирусу заключается в встраивании части ДНК вируса в спейсер бактерии. При повторной атаке вирусом, белок Cas9 обнаруживает идентичную вирусную ДНК и уничтожает ее. Таким образом, редактирование генов CN1 и CN2, кодирующих аллерген Fel d1 приведет к устранению симптомов аллергии [4].

3) Корм для кошек, содержащий в себе яичный желток снижает концентрацию Fel d 1 в слюне кошки. Это обуславливается блокированием кошачьего аллергена IgY, который накапливается в желтке птицы. В ходе исследования снижение концентрации Fel d1 на шерсти и чешуйках кожи было обнаружено у 97% кошек. Через три недели специализированной диеты количество аллергена на шерсти животных снизилось в среднем на 47% [5].

4) Вакцина для кошек «НуроCat». Для иммунизации использовали конъюгированную вакцину, с помощью которой производятся антитела IgG нейтрализующие аллерген. Эффективность курса вакцинации из трех доз с интервалом в 3 недели была подтверждена в исследованиях с участием нескольких десятков кошек.

5) Вакцина для людей «Cat-PAD» состоит из семи синтезированных в лаборатории эпитопов, аналогичных участкам белка-аллергена Fel 1 d. Курс состоит из четырех доз, вводимых подкожно в течение трех месяцев. Данный препарат доказал свою эффективность на Западе в рандомизированном двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании [6].

6) Отечественная вакцина для людей «Cats Project» разрабатывалась в Сеченовском университете начиная с 2018 года совместно с Венским медицинским университетом. Ученые отметили, что вакцина будет безопасна для беременных и детей. Также она безопаснее, чем терапия АСИТ, при которой как было отмечено выше наблюдались побочные эффекты. Длительность лечения сократится в разы, а эффективность будет сохраняться на долгие годы. В настоящее время проект «Cats Project» проходит стадию доклинических исследований [7].

Таким образом, представленные выше методы помогут решить следующие задачи:

- 1) уменьшение аллергических заболеваний
- 2) лечение болезни, вместо купирования симптомов
- 3) помощь людям, которые несмотря на болезнь живут с кошками
- 4) сокращение количества домашних животных в приютах, которых отдают из-за аллергии

Библиографический список

1. Мельников В.М. Аллергические заболевания. – Пенза: ПГУ. – 2015. – 5 с.
2. Крикало И.Н.К проблеме распространения аллергозов // Здоровье для всех. – 2013. – №5. – С. 81-84.
3. Orengo, J.M., Radin, A.R., Kamat, V. et al. Treating cat allergy with monoclonal IgG antibodies that bind allergen and prevent IgE engagement // Nat Commun. – 2018. – V 9. –1421 p.
4. CRISPR/Cas9 для получения гипоаллергенных кошек URL: <https://profil.mos.ru/ntek/proekty/crispr-cas9-dlya-polucheniya-gipoallergennykh-koshek.html> [Дата обращения 05.10.2022].
5. PURINA представила революционный подход к снижению уровня основного аллергена кошек URL:https://www.purina.ru/sites/purina.ru/files/2019-11/06_%D0%9F%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%81-%D1%80%D0%B5%D0%BB%D0%B8%D0%B7_CatAllergenBreakthru.pdf [Дата обращения 05.10.2022].
6. Вакцина от аллергии на кошек: планы и реальность URL: <https://medaboutme.ru/articles/vaktsina-ot-allergii-na-koshek-plany-i-realnost/> [Дата обращения 05.10.2022].
7. Ученые Сеченовского Университета продолжают работу над вакциной от аллергии на кошку URL:<https://www.sechenov.ru/pressroom/news/uchenye-sechenovskogo-universiteta-prodolzhayut-rabotu-nad-vaktsinoy-ot-allergii-na-koshku/> [Дата обращения 05.10.2022].

ВОЗДЕЙСТВИЕ КИСЛОЙ СРЕДЫ КАК СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА (КИП)

Чурина Т.С., Курасова Д.А., Раззорова Е.А., Кулакова Ю.С., Горшкова Е.Н.

Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н. И. Лобачевского», Нижний Новгород, Россия

Аннотация. Сегодня все большее внимание уделяют иммуноглобулиновым препаратам, обогащенным IgA и IgM. Однако неизвестно, существуют ли способы усиления их терапевтических свойств в результате индукции полиспецифичности антител, входящих в их состав, по аналогии с препаратами на основе IgG. В ходе настоящего исследования была показана возможность модуляции антигенсвязывающих свойств иммуноглобулинов в составе обогащенного иммуноглобулинового препарата на примере комплексного иммуноглобулинового препарата.

Ключевые слова: иммуноглобулины, комплексные иммуноглобулиновые препараты (КИП), полиспецифичность, заместительная терапия.

EXPOSURE TO AN ACIDIC ENVIRONMENT AS A STRATEGY FOR INCREASING THE THERAPEUTIC EFFICIENCY OF A COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATION (CIP)

Tchurina T. S., Kurasova D. A., Razzorenova E. A., Kulakova J. S., Gorshkova E. N.

Institute of Biology and Biomedicine, Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. Today, more and more attention is paid to immunoglobulin preparations enriched with IgA and IgM. However, it is not known whether there are ways to enhance their therapeutic properties as a result of the induction of polyspecificity of the antibodies that make up their composition, by analogy with drugs based on IgG. In the course of this study, the possibility of modulating the antigen-binding properties of immunoglobulins in the composition of an enriched immunoglobulin preparation was shown using the example of a complex immunoglobulin preparation.

Keywords: immunoglobulins; complex immunoglobulin preparations (CIP); polyspecificity; replacement therapy

Терапевтические поликлональные иммуноглобулиновые препараты, вводимые внутривенно (ВВИГ) получают на основе объединенной плазмы, полученной от тысяч здоровых доноров. Благодаря этому такие препараты содержат иммуноглобулиновый профиль, превосходящий таковой для одного человека. Используемые впервые в заместительной терапии иммунодефицитных состояний, ВВИГ сегодня все чаще используются для лечения широкого спектра воспалительных и аутоиммунных заболеваний, выступая в качестве иммуномодулирующего в высоких дозах и противовоспалительного агента в низких дозах [1].

Эффективность заместительной терапии препаратами ВВИГ опирается на коллективный иммунологический опыт в популяции доноров плазмы. Он включает антитела против большого количества клинически значимых возбудителей, благодаря чему и достигается терапевтический эффект таких препаратов – связывание и нейтрализация микробных антигенов, блокирование присоединения вирусов и бактерий к клетке мишени, опсонизация и инициация фагоцитоза [2].

В подавляющем большинстве иммуноглобулиновые препараты для внутривенного введения содержат $\geq 95\%$ IgG с плазмоподобным распределением подклассов IgG и следовыми количествами IgA и IgM. Существенную долю общей себестоимости таких препаратов представляют затраты на сырье. Это, вместе с необходимостью повышения эффективности их терапевтических свойств для рационализации их использования, требует наиболее оптимального использования белков плазмы [3].

Одной из стратегий, направленной на повышение терапевтической эффективности используемых в настоящее время препаратов, является их обогащение иммуноглобулинами других классов, в частности IgA и IgM. Это способно расширить иммуноглобулиновый профиль и, во-первых, открыть новые возможности в терапии пациентов с дефицитом IgM или IgA, и, во-вторых, усилить их терапевтический потенциал за счет полезных свойств и функций IgM и IgA по сравнению с IgG [4].

Другим подходом к повышению эффективности обычных ВВИГ может стать индукция их полиспецифических свойств или, иначе говоря, приобретение ими способности связывать несколько структурно не родственных антигенов [5]. Явление индуцированной полиспецифичности впервые было показано при изучении целевых свойств семи коммерческих препаратов IgG ($\geq 95\%$ IgG), предназначенных для внутривенного введения. Те из них, что подвергались в процессе фракционирования воздействию низкого pH, демонстрировали значительный уровень поли- и аутореактивности при тестировании на сложной смеси антигенов [6]. Однако, на настоящий момент данные о возможности индукции полиспецифических свойств иммуноглобулинов в составе обогащенных IgA и IgM иммуноглобулиновых препаратов отсутствуют. В связи с чем целью настоящей работы стало исследование способности кислых буферных растворов индуцировать полиспецифические свойства иммуноглобулинов классов G, A и M, входящих в состав комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП).

Объектом настоящего исследования стал КИП (Микроген, Россия), в состав которого входят иммуноглобулины классов G, A и M (50% IgG, 25% IgA, 25% IgM). Возможность усиления его терапевтических свойств посредством индукции полиспецифичности анализировали после его кратковременной обработки в течение 10 минут буферными растворами с низкими значениями pH (0,25M глициновый буферный раствор с pH 2,6 и pH 4,0) в соотношении 1:9. Показатели кислотности среды были подобраны в соответствии с наиболее часто используемыми значениями pH на отдельных этапах коммерческого производства иммуноглобулиновых препаратов. Приобретение антителами новых специфичностей в результате такой обработки определяли на панели антигенов бактериального происхождения (*Escherichia coli* BL21) методом иммуноблоттинга, а также в отношении отдельного вирусного антигена – капсидного белка норовируса VP1 – методом непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа. В обоих случаях в качестве первичных антител был использован КИП, нативный (обработанный буферным раствором со значением pH 7,0) и pH-модифицированный (pH 2,6 и pH 4,0). Детекцию уровня связывания проводили отдельно для

каждого изотипа иммуноглобулинов, входящих в состав КИП, с помощью изотип-специфических вторичных моноклональных антител.

В результате проведенных экспериментов нами был продемонстрирован разнонаправленный эффект от модификации иммуноглобулинов, входящих в состав КИП. Так, подтверждая литературные данные, IgG в результате его кратковременной обработки буферными растворами с pH 2,6 и pH 4,0 демонстрировал расширение спектра связываемых антигенов на примере набора бактериальных антигенов *E. coli* (рис. 1А).

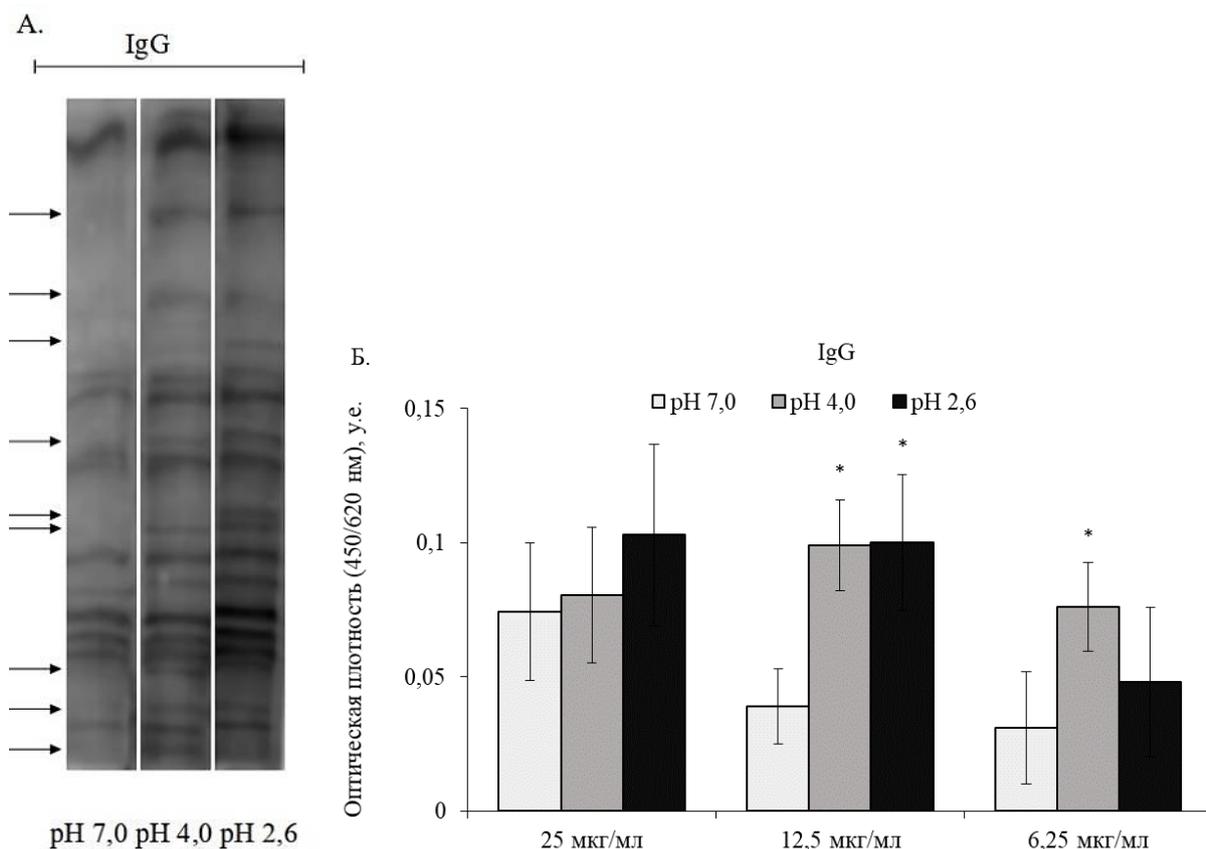


Рисунок 1 – А. Иммуноблотированные на мембране комплексы нативного и pH-модифицированного иммуноглобулина класса G с антигенами *E. coli*; Б. Интенсивность связывания нативного и pH-модифицированного IgG с капсидным белком норовируса VP1.

Стрелками обозначено появление новых окрашенных комплексов антиген-модифицированное антитело как результат связывания ими ранее не распознаваемых антигенов. * различия статистически значимы по сравнению с нативным иммуноглобулином (pH 7,0) ($p < 0,05$)

Данный эффект оценивали по увеличению числа окрашенных комплексов «антиген – pH-модифицированное антитело» в сравнении с контролем – числом окрашенных комплексов «антиген-нативное антитело». Это явление, вероятно, может быть объяснено структурными перестройками в активном центре антител, произошедшими под воздействием дестабилизирующих щелочных условий, а именно: перераспределением и экспонированием гидрофобных аминокислотных остатков в связывающем сайте, способствующих увеличению вклада не специфических гидрофобных взаимодействий, а также усилению гибкости паратопа [5]. Наблюдаемый эффект, предположительно, также не является беспорядочным гидрофобным слипанием молекул иммуноглобулинов вследствие их частичной денатурации,

так как модифицированный IgG связывался далеко не со всеми антигенами из исследуемого набора, то есть взаимодействие носило избирательный характер.

Помимо этого, после такой модификации фракция антител IgG-изотипа приобретала лучшую способность связывать капсидный антиген норовируса VP1 (рис. 1Б.). Это могло достигаться как за счет появления новых специфичностей у антител, ранее не имевших сродства к данному белку, так и за счет увеличения аффинности связывания этого белка антителами, ранее распознававшими его. Однако, согласно результатам ИФА, данное явление носило дозозависимый характер, достигая оптимальных показателей при концентрации КИП 12,5 мкг/мл.

Напротив, связывающая способность антител IgA-изотипа усиливалась под воздействием буферного раствора с pH 4,0 в отношении бактериальных антигенов *E. coli*, но, в тоже время, снижалась в отношении вирусного капсидного белка (рис. 2А, 2Б). Более низкие показатели кислотности среды существенно не влияли на антиген-связывающие свойства данного класса иммуноглобулинов.

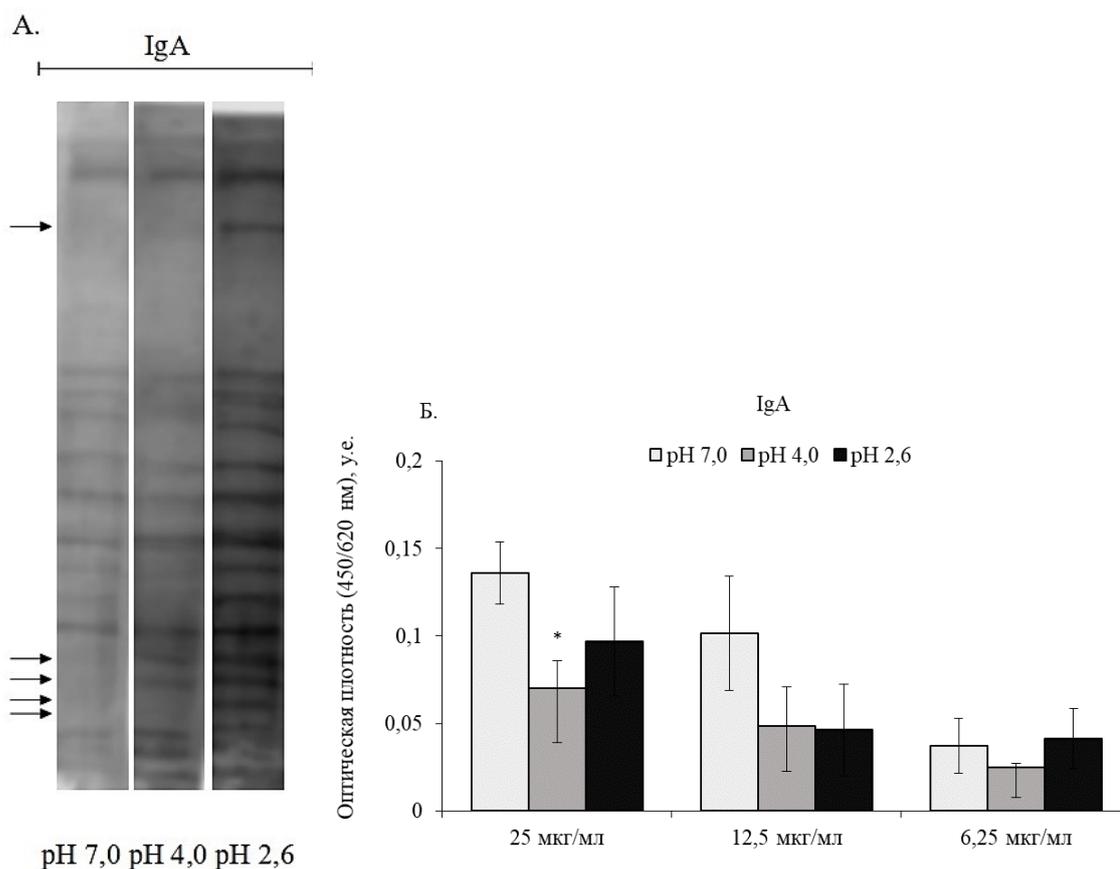


Рисунок 2 – А. Иммуобилизованные на мембране комплексы нативного и pH-модифицированного иммуноглобулина класса А с антигенами *E. coli*; Б. Интенсивность связывания нативного и pH-модифицированного IgA с капсидным белком норовируса VP1. * различия статистически значимы по сравнению с нативным иммуноглобулином (pH 7,0) ($p < 0,05$).

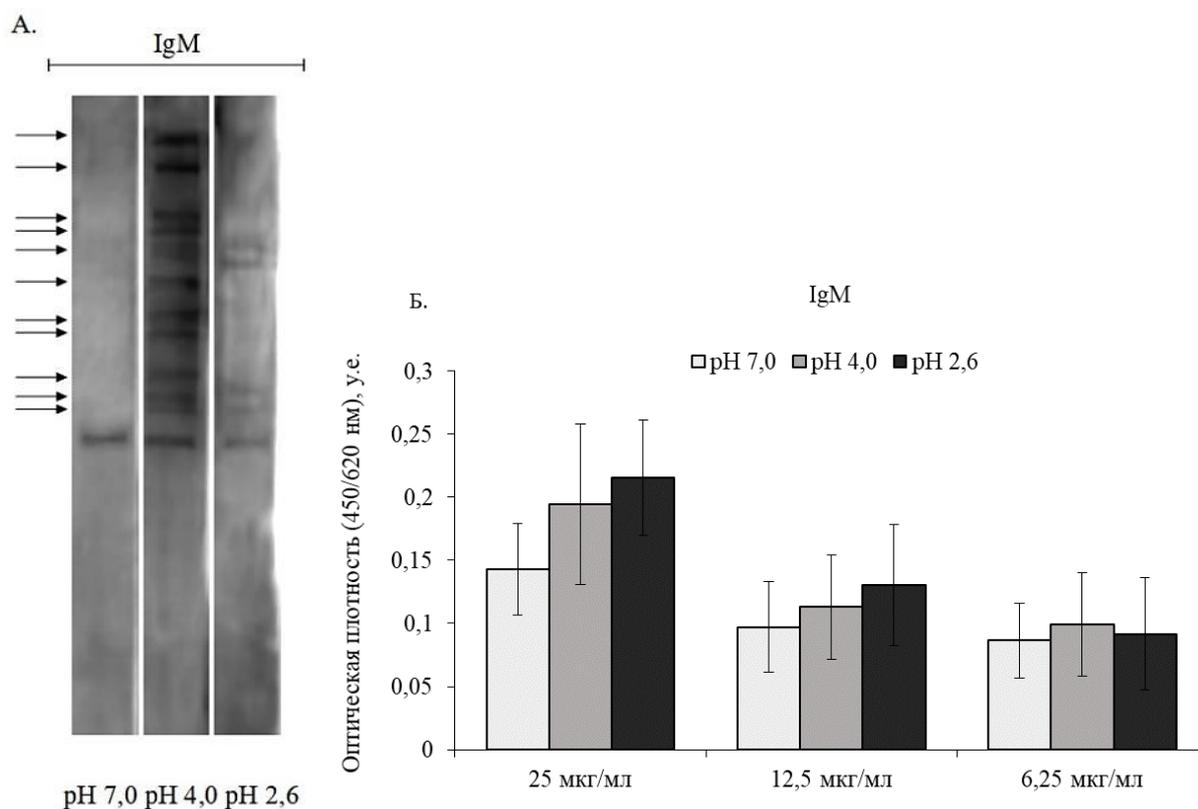


Рисунок 3 – А. Иммуноблизованные на мембране комплексы нативного и рН-модифицированного иммуноглобулина класса М с антигенами *E. coli*; Б. Интенсивность связывания нативного и рН-модифицированного IgM с капсидным белком норовируса VP1.

Аналогично иммуноглобулину G, антитела IgM-изотипа расширяли спектр связываемых ими бактериальных антигенов под воздействием кислых буферных растворов, однако не демонстрировали существенных изменений по сравнению с нативными антителами в способности связывать норовирусный капсидный белок (рис. 3А, 3Б).

Таким образом, нами была показана потенциальная возможность усиления антигенсвязывающих свойств комплексного иммуноглобулинового препарата за счет расширения спектра связываемых антигенов иммуноглобулинами, входящими в его состав, а также, вероятно, за счет усиления аффинности связывания ими ранее распознаваемых антигенов. Однако, в связи с зависимым от концентрации и разнонаправленным эффектом от кратковременной обработки иммуноглобулинов буферными растворами с низкими значениями рН данное явление требует дальнейших исследований.

Библиографический список

1. Кондратенко И.В., Заплатников А.Л., Бологов А.А. Внутривенные иммуноглобулины: что и когда? // Детская больница. 2010. №4. С. 56-60.
2. Späth P., Schneider C., von Gunten S. Clinical Use and Therapeutic Potential of IVIG/SCIG, Plasma-Derived IgA or IgM, and Other Alternative Immunoglobulin Preparations // Arch Immunol Ther Exp. 2017. Vol. 65. P. 215-231.
3. Bohländer F., Riehl D., Weißmüller S. et al. Immunomodulation: Immunoglobulin Preparations Suppress Hyperinflammation in a COVID-19 Model via FcγRIIA and FcαRI // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. P. 1-13.

4. Kakoullis L., Pantzaris N., Platanaki C. et al. The Use of IgM-Enriched Immunoglobulin in Adult Patients with Sepsis // *The Journal of Critical Care*. 2018. Vol. 47. P. 30-35.
5. Dimitrov J., Pashov A., Vassilev T. Antibody Polyspecificity: What Does It Matter? // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 750. P. 213-226.
6. Djoumerska I., Tchobanov A., Pashov A., Vassilev T. The Autoreactivity of Therapeutic Intravenous Immunoglobulin (IVIg) Preparations Depends on the Fractionation Methods Used // *Scandinavian Journal of Immunology*. 2005. Vol. 61. P. 357-363.

РЕАКЦИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОККЛЮЗИОННУЮ ПРОБУ У КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ЮНОШЕЙ

Шутова С.В., Сегеда А.С., Сазонова А.Д.

*Медицинский институт Тамбовского Государственного Университета имени
Г.Р. Державина, Тамбов, Россия*

Аннотация. Сочетание нарушения гомеостаза, состояния гиперкоагуляции и снижения оксигенации тканей является причиной неблагоприятных изменений в системе микроциркуляции, наблюдаемых у курильщиков табака. Методом лазерной доплеровской флоуметрия были изучены особенности микроциркуляции в обычных условиях и при окклюзии у курящих и некурящих юношей. Выявлены различия реакции микроциркуляции на окклюзию у курящих и некурящих студентов, касающиеся не только общей микроциркуляции, но и механизмов ее регуляции. Под влиянием компонентов табачного дыма изменяется эндотелийзависимая регуляция микрокапилляров и другие регуляторные процессы, что является предрасполагающим фактором к развитию патологических изменений в кардиоваскулярной системе.

Ключевые слова: микроциркуляция, табакокурение, лазер-доплер флоуметрия.

RESPONSE OF MICROCIRCULATORY SYSTEM TO OCCLUSION TEST IN SMOKERS AND NON-SMOKERS

Shutova S.V., Segeda A.S., Sazonova A.D.

Medical Institute of Tambov State University named after G.R. Derzhavin, Tambov, Russia

Abstract. The combination of homeostasis disturbance, hypercoagulable state, and reduced tissue oxygenation is responsible for the adverse changes in the microcirculatory system observed in tobacco smokers. The peculiarities of microcirculation in the norm and under occlusion in smoking and non-smoking young men were studied by laser doppler flowmetry. Differences in the reaction of microcirculation to occlusion in smoking and non-smoking students were revealed, concerning not only the general microcirculation, but also the mechanisms of its regulation. Under the influence of tobacco smoke components, endothelium-dependent regulation of microcapillaries and other regulatory processes changes, which is a predisposing factor to the development of pathological changes in the cardiovascular system.

Keywords: microcirculation, smoking, laser-doppler flowmetry.

Актуальность. Распространённость курения среди населения планеты, по различным источникам, составляет 40-60% [1]. Известно, что никотин значительно увеличивает циркулирующие катехоламины [2] приводя к нарушению микроциркуляции [3]. Табачные

сигареты также значительно повышают уровень вазопрессина [4] и фибриногена [5] вызывая тахикардию, гипертонию [6] и состояние гиперкоагуляции [5]. Угарный газ, который образуется при горении табака и вдыхается при курении, имеет очень высокое сродство к гемоглобину. Это повышает уровень карбоксигемоглобина [6] и впоследствии снижает оксигенацию тканей [7]. Сочетание нарушения гомеостаза, состояния гиперкоагуляции и снижения оксигенации тканей является причиной неблагоприятных изменений в системе микроциркуляции, наблюдаемых у курильщиков табака.

Благодаря последним достижениям компьютерных технологий в области спектрального анализа колебаний кровотока микрососудистого русла и разработке адекватных функциональных проб стало возможным неинвазивно с помощью лазерной доплеровской флоуметрии выделить и проанализировать регуляторные факторы, контролирующие микрогемодинамику [8].

Цель работы. Изучение особенностей микроциркуляции в обычных условиях и при окклюзии у курящих и некурящих юношей.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 18 курящих и 28 некурящих юношей в возрасте от 18 до 25 лет, у которых проводилась лазерная доплеровская флоуметрия (ЛДФ) со спектральным вейвлет-анализом колебаний кровотока на аппарате «ЛАЗМА ПФ» (НПП «Лазма», Россия) согласно рекомендованной производителями прибора методике [8]. Исследовали микроциркуляцию поверхностных слое кожи голени у курящих и некурящих студентов в обычных условиях (1 мин.), во время окклюзии (3 мин.) и после снятия манжеты (6 мин.). Анализировали безартефактные фрагменты ЛДФ-граммы вышеуказанной длительности. Исследования осуществлялись при комнатной температуре 22-24°C в положении сидя после 10-минутного отдыха. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с помощью программы «Statistica 10.0» (Dell Inc., США). Поскольку распределение большинства признаков отличалось от нормального (проверяли по критерию Шапиро-Уилка), данные представлены в виде медианы и 25% и 75% квартилей ((Me (Q25; Q75)). Статистическую значимость различий оценивали с использованием критерия Вилкоксона для зависимых и критерия Манна-Уитни для независимых групп. Различия принимались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты исследования.

Выявлены существенные различия параметров микроциркуляции у курящих и некурящих исследуемых исходном состоянии и при проведении окклюзионной пробы.

Показатель среднего значения микроциркуляции у курящих студентов до окклюзии оказался значительно выше, чем у некурящих (5,41 (4,68; 7,76) и 4,52 (3,84; 5,33), соответственно), что отражает избыточное кровенаполнение сосудов у курящих юношей и по-видимому, носит компенсаторный характер. Во время механической окклюзии кровотоков существенно падает у курящих и незначительно – у некурящих. Снятие окклюзионной манжеты в группе курящих юношей вызывает выраженное усиление кровотока с превышением исходных значений (постокклюзионная компенсация). У некурящих юношей кровотоков восстанавливается практически до исходных значений. Данные различия, по-видимому, связаны с морфологическими изменениями микроциркуляторного русла, отмеченными другими авторами. Так, Харин А.В. с соавторами в своем исследовании [9] обратил внимание на расширение сосудов артериального отдела у курящих юношей и сужение венозного с одномоментным уменьшением скорости кровотока, что приводит к существенному застою крови. Также в группе потребителей табака было отмечено увеличение эритроцитарных агрегатов (застой крови) и многочисленные деформации капилляров. По

мнению авторов, данные изменения направлены на восполнение недостаточности кровоснабжения тканей вследствие деформации микрососудов. Нашим доказательством данных заключений служат функциональные изменения, которые показывают избыточное кровенаполнение и повышенная реактивность на механическое ограничение кровоснабжения в группе никотин-потребителей.

Стоит отметить, что значение нутритивного кровотока у курящих после окклюзии было выше в 2 раза, чем у некурящих в тех же условиях (3,34 (2,67; 3,75) и 1,76 (1,49; 2,29), соответственно). После снятия окклюзионной манжеты у курящих лиц данные значения возрастают и даже превышают в 1,5 раза исходные, в отличие от некурящих лиц, где происходят противоположные изменения – значения после окклюзии не достигают первоначальных.

Показатель среднего шунтового кровотока у лиц, употребляющих табак, оказался в 1,5 раза выше аналогичного показателя у некурящих (3,15 (1,80; 3,59) и 2,20 (1,79; 2,84), соответственно), что указывает на увеличение доли шунтирующих сосудов.

Что касается коэффициента вариации колебаний кровотока, то этот показатель у курящих лиц после окклюзии вырос в 2 раза, по сравнению с некурящими, где значения вернулись к исходным. Так как показатель вариативности отражает степень напряжения регуляторных механизмов, можно заключить, что при курении появляется необходимость усиления различных механизмов регуляции.

Гурова О.А. в своей работе, рассматривающей микроциркуляцию крови у юношей при табакокурении с помощью метода ЛДФ, отмечает повышение активности механизмов регуляции [10]. Нами были выявлены статистически значимые отличия в значениях показателей регуляции кровотока (эндотелиальных, нейрогенных, мышечных) в исходном состоянии и при окклюзии у курящих и некурящих студентов, но при этом также наблюдались отличия между курящими и некурящими студентами.

После снятия манжеты, амплитуда эндотелиальных колебаний была в 2 раза выше у курящих студентов, что говорит о более выраженном ответе эндотелия на гипоксию в виде выброса NO. Амплитуда нейрогенных колебаний после устранения окклюзии была в 1,6 раза выше у курящих мужчин, что говорит о снижении сопротивления и усилении кровотока по артериоло-веноулярному шунту. При снятии манжеты амплитуда миогенных колебаний достоверно в 2,5 раза выше у курящих студентов, что свидетельствует о более значительной вазодилатации и, следовательно, повышении нутритивного кровотока. Амплитуды дыхательных колебаний выраженных различий не имели. Амплитуда сердечных колебаний после снятия манжеты также была в 1,5 раза выше у курящих мужчин, что говорит о значительно большем притоке крови в микроциркуляторное русло после окклюзии. Отличия в показателях температуры у курящих и некурящих студентов минимальны.

Заключение. Выявлены различия реакции микроциркуляции на окклюзию у курящих и некурящих студентов, касающиеся не только общей микроциркуляции, но и механизмов ее регуляции. Под влиянием компонентов табачного дыма изменяется эндотелийзависимая регуляция микрокапилляров и другие регуляторные процессы, что является предрасполагающим фактором к развитию патологических изменений в кардиоваскулярной системе.

Библиографический список

1. Савельев В.Н., Васильев А.Д., Жуйкова А.А. Табакокурение – эпидемиология и профилактика // *Modern Science*. – 2020. – № 1-2. – С. 136-138.
2. Cryer P.E., Haymond M.W., Santiago J.V., Shah S.D. Norepinephrine and epinephrine release and adrenergic mediation of smoking-associated hemodynamic and metabolic events // *N. Engl. J. Med.* – 1976. – 295(11). – P. 573-577.
3. Netscher D.T., Wigoda P., Thornby J., Yip B., Rappaport N.H. The hemodynamic and hematologic effects of cigarette smoking versus a nicotine patch // *Plast. Reconstr. Surg.* – 1995. – 96(3). – P. 681-688.
4. Waeber B., Schaller M.D., Nussberger J., Bussien J.P., Hofbauer K.G., Brunner H.R. Skin blood flow reduction induced by cigarette smoking: role of vasopressin // *Am. J. Physiol.* – 1984. – 247(6 Pt 2). – P. 895-901.
5. Belch J.J., McArdle B.M., Burns P., Lowe G.D., Forbes C.D. The effects of acute smoking on platelet behaviour, fibrinolysis and haemorheology in habitual smokers // *Thromb. Haemost.* – 1984. – 51(1). – P. 6-8.
6. Krupski W.C. The peripheral vascular consequences of smoking // *Ann. Vasc. Surg.* – 1991. – 5(3). – P. 291-304.
7. Jensen J.A., Goodson W.H., Hopf H.W., Hunt T.K. Cigarette smoking decreases tissue oxygen // *Arch Surg.* – 1991. – 126(9). – P. 1131-1134.
8. Крупаткин А.И., Сидоров В.В.; Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови Руководство для врачей; Москва: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 253 с.
9. Харин А.В., Аверьянова И.В., Вдовенко С.И. Оценка морфофункционального состояния микроциркуляторного русла у курящих юношей // *Анализ риска здоровью*. – №3. – 2019. – С.112–117.
10. Гурова О.А. Состояние микроциркуляции крови у юношей при табакокурении и после отказа от него // *Новые исследования*. – № 4 (60). 2019. – С. 79-83.

БОТАНИКА, ГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

doi:10.17072/simbioz-2022-405-411

ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ

Абдульмянова Л.И., Буриева М.Р., Гулямова Т.Г.

Институт Микробиологии Академии Наук, Ташкент, Узбекистан

Аннотация. Из растений, произрастающих в различных областях республики, расположенных на высоте от 500 до 1000 м над уровнем моря, выделено 30 штаммов темносептированных эндофитных грибов, в том числе редких видов. Изучены их морфолого-культуральные свойства и способность синтезировать темноокрашенные пигменты. Исследование физико-химических свойств подтвердило меланиновую природу выделенных пигментов. Показана перспективность получения меланина из эндофитных грибов путем твердофазной ферментации.

Ключевые слова: эндофитные грибы, меланин, твердофазная ферментация.

ENDOPHYT FUNGI AS PRODUCERS OF MELANIN PIGMENTS

Abdulmyanova L.I., Burieva M.R., Gulyamova T.G.

Institute of Microbiology of the Academy of Sciences, Tashkent, Uzbekistan

Abstract. From plants growing in various regions of the republic, located at an altitude of 500 to 1000 m above sea level, 30 strains of dark-septed endophytic fungi, including rare species, were isolated. Their morphological and cultural properties and the ability to synthesize dark-colored pigments have been studied. The study of physicochemical properties confirmed the melanin nature of the isolated pigments. The prospects for obtaining melanin from endophytic fungi by solid-phase fermentation are shown.

Keywords: endophytic fungi, melanin, solid phase fermentation.

Меланин – отрицательно заряженное гидрофобное соединение с высоким молекулярным весом, образующееся при окислительной полимеризации фенольных и/или индольных веществ. В настоящее время установлено, что меланин наряду с солнцезащитными и радиопротекторными свойствами, обладает способностью хелатировать металлы и взаимодействовать с лекарственными препаратами, проявляет антиоксидантную активность, улучшает состояние иммунной системы, оказывает гепатопротекторное действие, проявляет антиканцерогенные и противовоспалительные свойства [1].

Меланин – пигмент, способствующий выживанию микроорганизмов в экстремальных условиях обитания. Именно такими условиями характеризуются некоторые регионы Узбекистана с резко континентальным климатом, высокими перепадами дневных/ночных и

летних/зимних температур. Ландшафт республики представлен высокогорьями с разреженным воздухом, равнинами, пустынями с высоким засолением почв, и разнообразными заповедниками. Флора Узбекистана насчитывает более 4000 видов растений, из них 112 видов лекарственных растений разрешено для использования, при этом 80% составляют дикорастущие виды. Это обуславливает уникальные природные характеристики, что непосредственно влияет на распространение и разнообразие микрофлоры, в том числе и эндофитной [2, 3]. Эндофиты – грибы, бактерии, актиномицеты – микроорганизмы, бессимптомно обитающие в межклеточном и внутриклеточном пространстве растений. В симбиотической ассоциации растение – хозяин защищает и питает эндофит, который в ответ продуцирует биоактивные метаболиты, в том числе и меланиновые пигменты. При этом именно меланизированные грибы более устойчивы к УФ-индуцированному и окислительному стрессу, экстремальным температурам, гидролитическим ферментам, токсичным тяжелым металлам и антимикробным средствам, по сравнению с немеланизированными грибами [4]. Меланин главным образом локализован во внешнем слое клеточной стенки, но в некоторых грибах, меланин также можно найти вне клеточной стенки в культуральной жидкости, обычно в виде гранул.

В этой связи, для изучения меланин синтезирующего потенциала эндофитных грибов был произведен сбор лекарственных растений, произрастающих в различных областях республики, отличающихся климатом, высотой над уровнем моря и относящиеся к различным географическим поясам (табл.1).

Из растений было выделено 30 грибных изолятов, обладающих темноокрашенным мицелием. В результате анализа распространения отобранных темносептированных эндофитов (ТСЭ), установлено, что большинство культур выделено из растений, произрастающих в местах с сильной солнечной инсоляцией.

Изучение морфолого-культуральных свойств отобранных ТСЭ позволило отнести их к родам *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Sclerotium*, *Ulocladium*. Среди выделенных эндофитов встречаются также редкие виды темносептированных грибов, такие как: *Cladosporium coremioides* – VE92L, *Alternaria grisea* – FF61S, *Alternaria geophila* – HP133L, *Alternaria tenuis* – VE98L, *Doratomyces purpureofuscus* – HT191R, *Ulocladium consortiae* – FF155L, *Alternaria malvae* – TS55S, *Cladosporium tenuissimum* – AF183.

Перспективность производства пигментов из микроорганизмов, в том числе грибов не вызывает сомнений, вследствие короткого времени размножения, высокого уровня продукции биомассы, скорости роста и удобства для выращивания в биореакторах по сравнению с растительными источниками, что делает процесс экономически выгодным и жизнеспособным в промышленном масштабе [5].

Меланин накапливается во внешнем слое клеточной стенки, поэтому получение прироста биомассы, т.е. увеличения количества клеток, путем подбора питательных сред и условий культивирования является первостепенной задачей при масштабировании процесса ферментации.

Потенциал эндофитных грибов как источников меланина практически не изучен [6]. Одной из проблем в ферментации эндофитов является то, что в процессе культивирования они могут, расти плохо или, не расти вовсе, а также терять свои свойства продуцировать те или иные искомые соединения.

Таблица 1 – Темноокрашенные эндофитные изоляты растений Узбекистана

Наименование растения (рус., латин.)		Изолят	Кол-во	Место сбора растений
Барвинок малый	<i>Vinca minor</i>	VM83R, VM84L	2	Джизакская область предгорья Нурагинского заповедника (500 м) (Мирзачульский округ)
Барвинок прямой	<i>Vinca erecta</i>	VE92L, VE98L	2	
Лук длинноостроконечный	<i>Allium longicuspis</i>	AL141L	1	
Подсолнечник клубненосный	<i>Helianthus tuberosus</i>	HT191R, HT192R, HT194R, HT195L, HT196L, HT207T	6	
Целозия гребенчатая	<i>Celosia cristata</i>	CC213F	1	Наманганская область Папские адыры (500 м) (Ферганский округ)
Саксаул белый	<i>Haloxylon persicum</i>	HP133L	1	
Козилец продолговатый	<i>Scorzonera ovata</i>	SO77L, SO78L, SO144L, SO146L	4	
Новый эндемичный вид	из сем-ва <i>Apiaceae</i>	A66S, A68S	2	
Тюльпан Шарипова (эндемик)	<i>Tulipa scharipovii</i>	TSch75L	1	Ташкентская область Предгорья Чаткальского заповедника (1000 м)
Ферула вонючая	<i>Ferula foetida</i>	FF61S, FF63L, FF64L, FF152S, FF155L	5	
Шалфей лекарственный	<i>Salvia officinalis</i>	SO8S	1	
Тимьян ползучий	<i>Thymus serpyllum</i>	TS55S	1	
Мята перечная	<i>Mentha piperita</i>	MP9R	1	Ташкентская область Предгорья Чаткальского заповедника (1000 м)
Лук нитезубый	<i>Allium filidens</i>	AF180F, AF183B	2	
ИТОГО			30	

Поскольку темноокрашенная биомасса является показателем уровня содержащихся в ней меланинов, то поиск путей повышения роста мицелиальной массы является главным условием в определении перспективности штамма как источника пигмента [7].

Нами изучена способность отобранных эндофитных грибов накапливать темноокрашенную биомассу на питательных средах: Сабуро, Чапека – Докса, картофельно-декстрозном бульоне, при поверхностной и глубинной ферментации (Рис 1.). Однако, при культивировании некоторые культуры теряли пигментацию мицелия при росте на жидкой среде. В результате для работы было отобрано 12 (40%) темноокрашенных культур.

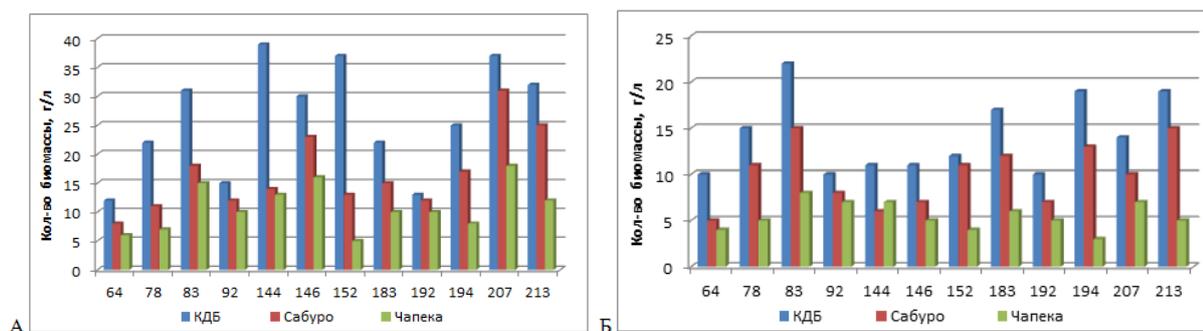


Рисунок 1 – Выход биомассы ТСЭ на различных питательных средах при глубинной (А) и поверхностной (Б) ферментации на 7 сутки роста.

Как видно из представленных данных, при сравнительном анализе трех сред было установлено, высокое накопление биомассы при глубинной ферментации происходит у всех 12 отобранных культур на картофельно-декстрозном бульоне. В среднем, выход биомассы на КДБ был гораздо выше по сравнению со средой Чапека-Докса. Уровень прироста биомассы на среде Сабуро был несколько выше, чем на среде Чапека-Докса, и более низким, чем на КДБ. Следует отметить, однако, что в разных штаммах зависимость от типа среды выражалась по-разному. Так, в отдельных штаммах, например, *Cladosporium coremioides* – VE92L, выделенном из *Vinca erecta* и *Penicillium sp.*–HT192R из *Helianthus tuberosus*, уровень биомассы имел близкие значения на всех трех средах, в штаммах *Cladosporium sp.* – HT207 из *Helianthus tuberosus* и *Cladosporium sp.* – CC213 из *Celosia cristata* достаточно высокий уровень накопления наблюдался и на среде КДБ и на среде Сабуро. В то же время в *Aspergillus niger* – FF152S, выделенном из *Ferula foetida*, и в *Alternaria sp.* – SO144L из *Scorzonera ovata*, выход биомассы на КДБ составлял величину, более чем в 3-7 раз выше по сравнению со средой Чапека-Докса.

При поверхностной ферментации на трех средах более высокому выходу биомассы также способствовала среда КДБ. Однако, по сравнению с глубинной ферментацией, ее количество в целом ниже у всех отобранных культур.

Полученные данные показали, что уровень прироста биомассы выделенных эндофитных грибов при ГК на КДБ составляет от 12 до 39 г/л, на среде Сабуро – от 8 до 31 г/л и на среде Чапека – Докса от 5 до 18 г/л. При ПК прирост биомассы был заметно ниже и составлял от 10 до 22 г/л на среде КДБ от 5 до 15 г/л на среде Сабуро и от 3 до 8 г/л на среде Чапека Докса.

Для выделения меланиновых пигментов из 12 были отобраны 8 эндофитов, накапливающие наиболее высокое количество темноокрашенной биомассы на разных средах. Количественный выход полученных пигментов, однократно экстрагированных из культур, выросших при глубинной и поверхностной ферментации на разных средах, отражающий содержание пигмента в 1 мл экстракта биомассы, представлен на рис. 2.

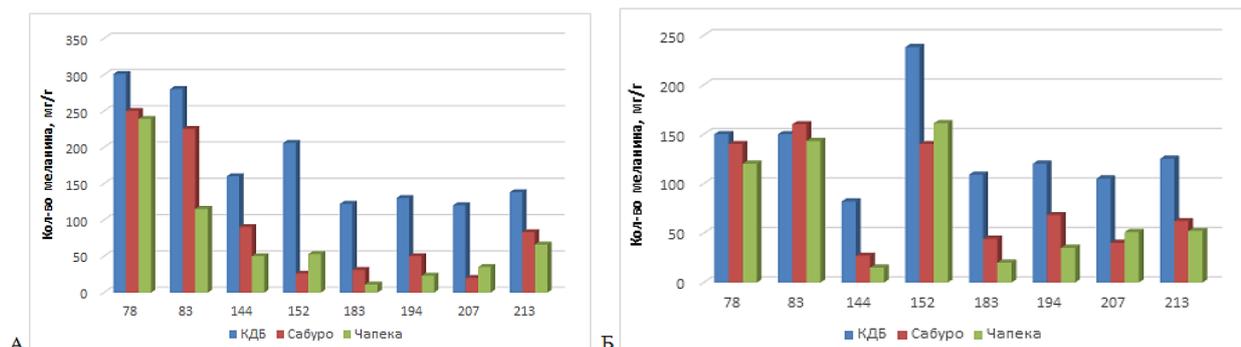


Рисунок 2 – Выход меланиновых пигментов из культур, выросших при глубинной (А) и поверхностной (Б) ферментации на разных средах.

Как видно из представленных данных, высокий выход меланина на уровне 250-300 мг/г биомассы наблюдается при ГФ на КДБ у штаммов *Alternaria sp.* – SO78L, выделенного из *Scorzonera ovata* и *S. minorum* – VM83R, выделенного из *V. minor*, при ПФ на КДБ у *A. niger* – FF152S, выделенного из *F. foetida*, а также на уровне 100 мг/г у *Cladosporium sp.* – HT207 из *H. tuberosus* вне зависимости от способа ферментации.

Следует отметить, что вполне логично было ожидать, что из штаммов, проявляющих хороший рост меланизированной биомассы, будет выделено большее количество пигмента.

Однако, как оказалось, степень экстрагируемости меланина в разных штаммов отличается. Так, например, из биомассы штаммов *Alternaria sp.* – *SO144L* и у *A. niger* – *FF152S* с высоким приростом биомассы выход меланина был относительно невелик по сравнению со штаммами *Alternaria sp.* – *SO78L* и *S. minorum* – *VM83R*, проявляющих умеренную скорость роста. Уровень меланина в этих штаммах составил от 250 до 300 мг/г на среде КДБ, и от 200 до 250 мг/ при ферментации на среде Сабуро. В целом, экстрагируемость меланина из культур при глубинном выращивании была выше.

При получении различных пигментов с помощью микроорганизмов использование дешевых и доступных агропромышленных отходов в качестве твердофазных субстратов может сделать процесс экономически эффективным и экологически чистым [7].

В связи с этим, мы изучили возможность твердофазной ферментации ТСЭ на измельченных субстратах: рис, кукуруза, овес и пшеница.

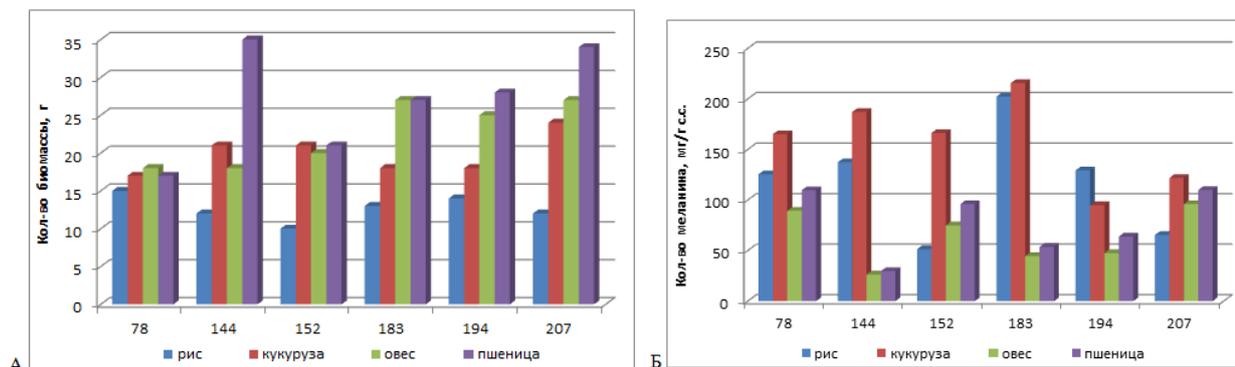


Рисунок 3 – Выход биомассы (А) и меланинов (Б) ТСЭ при ТФФ на 10 сутки роста.

Установлено, что при ТФФ в целом высокое накопление биомассы наблюдается на овсе и пшенице у всех культур, кроме штаммов *Alternaria sp.* – *SO78L* и *Aspergillus niger* – *FF152S*. При этом наибольший выход биомассы на уровне 30-35г, показали *Alternaria sp.* – *SO144L* и *Cladosporium sp.* – *HT207* на пшенице (Рис.3). Однако, несмотря на высокий выход биомассы у данных штаммов, образование меланиновых пигментов на пшенице резко снижено. Также снижена меланин синтезирующая способность у всех штаммов, выросших на овсе. Сравнительно высокий синтез меланинов на уровне 125-215 мг/г ферментированного субстрата, установлен на кукурузе у всех культур, кроме штамма *Ulocladium sp.* – *HT194R*, показавшего активность на рисе – 130 мг/г. При этом выход биомассы не превышал в среднем 20г. Наибольший выход меланина, составляющий 215 мг/г с.с установлен в штамме *Cladosporium tenuissimum* – *AF183* из *Allium filidens*.

Нельзя не отметить общепринятую гипотезу о микробном сверхсинтезе физиологически активных соединений. Согласно этой гипотезе, избыточный синтез целевых продуктов в микроорганизмов происходит на фоне лимитирования роста микроорганизма по источникам питательных веществ или других стрессовых условиях, таких как температура, кислотность среды и т.д. По-видимому, наблюдаемый нами относительно более высокий уровень биосинтеза меланина на твердых субстратах, не обеспечивающий высокий прирост биомассы, связан со стрессовой ситуацией необходимости потреблять трудно утилизируемые твердые субстраты, как например, кукуруза. Таким образом, при культивировании методом ТФФ установлена обратная зависимость меланин синтезирующей способности и накопления биомассы у ТСЭ.

Предварительное определение принадлежности выделенных пигментов, образуемых ТСЭ к меланинам, проводили с помощью качественных реакций и по растворимости в различных растворителях [8, 9]. Для этого к полученным щелочным экстрактам пигментов

приливали H_2O_2 (обесцвечивание), $KMnO_4$ (раствор зеленеет), $FeCl_3$ (выпадение хлопьевидного осадка). Для определения растворимости сухой пигмент растворяли в органических и неорганических растворителях, таких как: вода, ацетон, гексан, серная кислота (Рис.4).

Предварительная идентификация выделенных темных пигментов из ТСЭ качественными реакциями и по растворимости в различных растворителях подтвердила меланиновую природу пигментов штаммов *Alternaria sp. – SO78L*, *Alternaria sp. – SO144L*, *Aspergillus niger – FF152S* и *Cladosporium tenuissimum-AF183*, выделенных из *Scorzonera ovata*, *Ferula foetida* и *Allium filidens*.

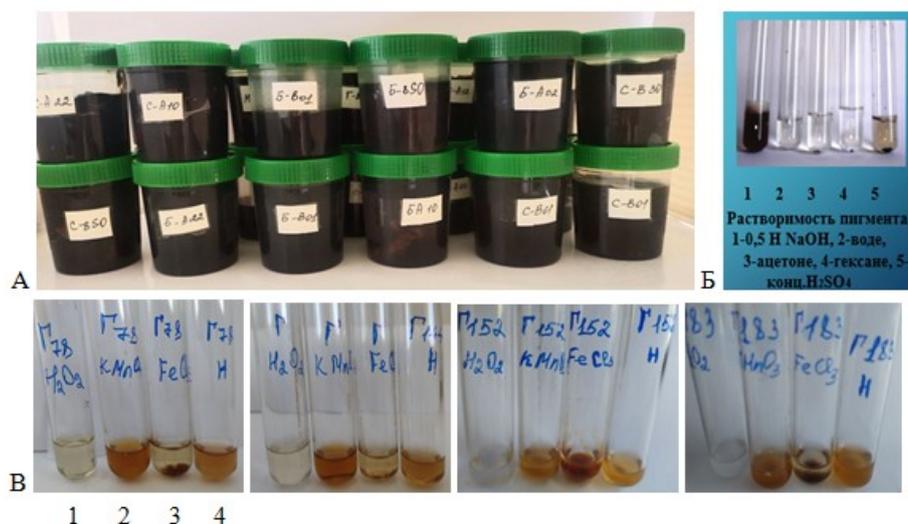


Рисунок 4 – Растворимость (Б) щелочных экстрактов (А) выделенных пигментов и качественные реакции (В) 1 – H_2O_2 (обесцвечивание); 2 – $KMnO_4$ (раствор зеленеет), 3 – $FeCl_3$ (выпадение хлопьевидного осадка), 4 – контроль (0,1N NaOH)

Таким образом, эндофитные грибы растений Узбекистана являются весьма перспективными источниками получения меланиновых пигментов, как путем жидкофазной, так и твердофазной ферментации.

Работа поддержана грантом Министерства Инновационного развития республики Узбекистан Ф3-201912269.

Библиографический список

1. ElObeid A.S., Kamal-Eldin A., Abdelhalim MAK, Haseeb A.M. Pharmacological properties of melanin and its function in health // Basic Clin Pharmacol Toxicol.-2017.- V.120 – P.515–522.
2. Huang L., Liu M., Huang H., Wen Y., Zhang X., Wei Y. Recent advances and progress on melanin-like materials and their biomedical applications // Biomacromolecules – 2018 – V.19. – P.1858–1868.
3. Sandra R. Pombeiro-Sponchiado^{1*}, Gabriela S. Sousa¹, Jazmina C.R. Andrade¹, Helen F. Lisboa² and Rita C. R. Gonçalves³. Production of Melanin Pigment by Fungi and Its Biotechnological Applications // 2017 – Chapter 4 – P.47-75.
4. Gessler N., Egorova A., Belozerskaya T. Melanin pigments of fungi under extreme environmental conditions (review) // Appl Biochem Microbiol. – 2014.–V.50.–P.105–113.

5. Malik K., Tokkas J., Goyal S. Microbial pigments: a review // *Int J Microbial Res Technol.* – 2012. – V.1. – P.361–365.
6. Suryanarayanan T.S., Ravishankar J.P., Venkatesan G., Murali T.S. Characterization of the melanin pigment of a cosmopolitan fungal endophyte // *Mycol Res.* – 2004.- V.108. –P. 974–978.
7. Panesar R., Kaur S., Panesar P.S. Production of microbial pigments utilizing agro-industrial waste: a review // *Curr Opin Food Sci.* – 2015. V.1. – P.70–76.
8. Suwannarach N., Kumla J., Watanabe B., Matsui K., Lumyong S. Characterization of melanin and optimal conditions for pigment production by an endophytic fungus *Spissiomycetes endophytica* SDBR-CMU319 // *PLoS ONE.* – 2019. – V.14(9):0222187.
9. De la Rosa J.M., Martin-Sanchez P.M., Sanchez-Cortes S., Hermosin B., Knicker H., Saiz-Jimenez C. Structure of melanins from the fungi *Ochroconis lascauxensis* and *Ochroconis anomala* contaminating rock art in the Lascaux Cave. // *Sci Rep.* – 2017. V.7, P.13441.

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОЗИМЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ

Ажимова В.А.¹, Масленникова А.П.¹, Боронникова С.В.¹, Данилова М.А.¹, Майсак Г.П.²

¹Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия
²ФГБУН «ПФИЦ УрО РАН» (Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН),
Пермь, Россия

Аннотация. Выделена ДНК шести сортов ×*Triticosecale* Wittm. ex A. Camus. С тотальной ДНК тритикале протестированы 22 ISSR-праймеров, из которых пять оказались наиболее эффективными: ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G). Полученные данные могут быть полезны при дальнейшем изучении генетического разнообразия сортов тритикале.

Ключевые слова: тритикале, праймеры, ISSR-метод.

SELECTION OF EFFECTIVE ISSR PRIMERS FOR WINTER TRITICALE VARIETIES

Azhimova V. A.¹, Maslennikova A. P.¹, Boronnikova S. V.¹, Danilova M. A.¹, Maisak G. P.²

¹Perm State University, Perm, Russia

²Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm,
Russia

Abstract. DNA of six varieties of ×*Triticosecale* Wittm. ex A. Camus was isolated. 22 ISSR primers were tested with total triticale DNA, of which five were the most effective: ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G). The data obtained may be useful in further studying the genetic diversity of triticale varieties.

Keywords: triticale, primers, ISSR method.

Введение. К середине XXI века численность населения Земли должна приблизиться к отметке в 9 млрд. человек. Несложно предположить, что такое значительно увеличение населения в скором времени приведет к возникновению огромного спроса на всевозможные ресурсы, в том числе и продукты питания. В новых условиях именно сельское хозяйство становится приоритетной отраслью, которую необходимо развивать. Ведущей группой сельскохозяйственных культур стран мира являются зерновые. Площадь пашен по всему миру составляет около 1,3 млрд га, зерновые культуры занимают более половины этой площади. Расширение видового и сортового разнообразия культур является одним из необходимых условий стабилизации зернового производства. Среди зерновых выделяют культуры, которые называют «основными хлебами человечества» – это пшеница, рис, кукуруза, а в последнее время многие ученые добавляют к этому списку и такую культуру, как тритикале

(*×Triticosecale* Wittm. ex A.Camus) [1]. В перспективе тритикале может стать мощной основой для качественной кормовой базы животноводства и для прямого использования в сельскохозяйственном и промышленном производстве, а также может являться источником ценных генов для селекции [2]. В увеличении эффективности производства зерна огромную роль играют именно озимые зерновые культуры, в том числе и тритикале. Они превосходят по своей биологической урожайности яровые в 1,5-2 раза, также озимые культуры имеют определенные агротехнические и организационно-хозяйственные преимущества [3]. Наиболее популярны в исследованиях генофондов растений, в том числе и культурных, ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats), они выявляют полиморфизм участков ДНК, заключенных между тандемно повторяющимися элементами – микросателлитами [4].

Цель исследований – выявление наиболее эффективных ISSR-праймеров для *×Triticosecale* Wittm. ex A.Camus для дальнейшего проведения молекулярно-генетических исследований озимых сортов.

Методика исследования. Растительный материал собран в 2022 году на опытном поле Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства в составе ФГБУН «ПФИЦ УрО РАН» (Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН). Объектами исследований избраны 3 кормовых сорта (Слон, Торнадо, Уральский Кормовой) и 3 зерновых сорта (Илия, Цекад 90, Сибард).

Отбор образцов провели на поле №3, севооборота №1: кормовые сорта Слон, Торнадо и Уральский кормовой (соответственно делянки 8, 15, 23), зерновые сорта Илия, Цекад 90 и Сибард (делянки 9, 11 и поле размножения). Со всех шести делянок было собрано у каждого сорта по 50 подфлаговых листьев с растений генеративного возрастного периода.

ДНК выделяли из 20 мг высушенных листьев по модифицированной методике Cota-Sanchez [2006] – в качестве сорбента использовали PVPP (polyvinylpolypyrrolidone) [5] [6]. Концентрацию ДНК и спектральные характеристики определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», USA) и выравнивали в пределах 10 нг/мкл. Для полимеразной цепной реакции реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 0,2 мкл 1 единицы Tag-полимеразы («Силекс М», Россия); 1 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 10 пМ праймера («Евроген», Россия); 1 mM MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 mM dNTP («Fermentas», Литва); 1 мкл тотальной ДНК.

Аmplификацию проводилась в термоциклере MJ Mini-Cycler («Bio-Rad», USA) по стандартной для ISSR-метода программе: предварительная денатурация при 94°C, 2 мин.; первые пять циклов при 94°C, по 20 сек.; температура отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; температура отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 54 до 64°C для ISSR-праймеров. Продукты амплификации разделяли электрофоретически в 1,5% агарозных гелях в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гельдокументации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA), определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One («Bio-Rad», USA). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.2 + 1,5 + 2 + 3 Kb DNA Ladder); «ООО-СибЭнзим-М», Москва). В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Отбор эффективных ISSR-праймеров осуществлялся по выявлению наибольшего числа фрагментов, включая и полиморфные, на ISSR-спектре и воспроизводимости результатов ПЦР.

Результаты и обсуждение. Для выявления эффективности были избраны 22 ISSR-праймеров с ди- и тринуклеотидным коровым мотивом с одним или двумя нуклеотидами в качестве якорей. Длина анализируемых ISSR-праймеров варьировала от 13 (X1) до 22 (ISSR9) нуклеотидов. Каждый праймер индивидуально был проанализирован в ПЦР с тотальной ДНК каждого исследуемого сорта. Эффективность ISSR-праймеров рассчитывалась в соответствии со шкалой 1–5: от низкой (1) до высокой (5) [7]. Результаты представлены в таблице.

Таблица –Эффективность ISSR-праймеров ×*Triticosecale* Wittm. ex A.Camus

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера
M1	(AC) ₈ CG	1	ISSR-5	(AG) ₈ CA	3
M2	(AC) ₈ CC	1	ISSR-6	(AG) ₈ CG	3
M3	(AC) ₈ CT	1	ISSR-7	(CTC) ₆ C	2
M27	(GA) ₈ C	1	ISSR-8	(GAG) ₆ C	4
X1	(CA) ₆ G	1	ISSR-9	(ACG) ₇ G	4
X9	(ACC) ₆ G	5	ISSR-10	(ATG) ₇ C	5
X10	(AGC) ₆ C	4	CR-212	(CT) ₈ TG	1
X11	(AGC) ₆ G	5	CR-215	(CA) ₆ GT	1
ISSR-1	(AC) ₈ T	2	CR-216	(GA) ₆ GG	2
ISSR-3	(TG) ₈ AA	1	CR-217	(TG) ₆ GG	1
ISSR-4	(TG) ₈ GC	1	CR-218	(GA) ₆ CC	1

В результате амплификации в ПЦР с 22 анализируемыми ISSRпраймерами были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 180 до 2000 н.п. Из 22 проанализированных ISSR-PCR праймеров с тотальной ДНК ×*Triticosecale* Wittm. ex A.Camus 3 продемонстрировали высокую эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК (ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G)), три праймер обнаружили среднюю (4) (X10 ((AGC)₆C), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G)), остальные праймеры показали невысокую (3 и ниже) эффективность (M1 ((AC)₈CG), M2 ((AC)₈CC), M3 ((AC)₈CT), M27 ((GA)₈C), X1 ((CA)₆G), ISSR-1 ((AC)₈T), ISSR-3 ((TG)₈AA), ISSR-4 ((TG)₈GC), ISSR-5 ((AG)₈CA), ISSR-6 ((AG)₈CG), ISSR-7 ((CTC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT), CR-216 ((GA)₆GG), CR-217 ((TG)₆GG), CR-218 ((GA)₆CC)).

В результате амплификации в ПЦР с 22 анализируемыми ISSRпраймерами были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 180 до 2000 н.п. Из 22 проанализированных ISSR-PCR праймеров с тотальной ДНК ×*Triticosecale* Wittm. ex A.Camus 3 продемонстрировали высокую эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК (ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G)), три праймер обнаружили среднюю (4) (X10 ((AGC)₆C), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G)), остальные праймеры показали невысокую (3 и ниже) эффективность (M1 ((AC)₈CG), M2 ((AC)₈CC), M3 ((AC)₈CT), M27 ((GA)₈C), X1 ((CA)₆G), ISSR-1 ((AC)₈T), ISSR-3 ((TG)₈AA), ISSR-4 ((TG)₈GC), ISSR-5 ((AG)₈CA), ISSR-6 ((AG)₈CG), ISSR-7 ((CTC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT), CR-216 ((GA)₆GG), CR-217 ((TG)₆GG), CR-218 ((GA)₆CC)). Таким образом, для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК

×*Triticosecale* Wittm. ex A.Camus были отобраны следующие 5 праймеров: ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G), все тринуклеотидные.

Заключение (выводы). Таким образом, для молекулярно-генетического анализа вида ×*Triticosecale* Wittm. ex A.Camus с использованием ISSR-PCR маркеров был произведен подбор ISSR-праймеров по эффективности выявления полиморфизма ДНК. Из 22 протестированных ISSR-праймеров были выявлены пять эффективных для анализа полиморфизма ДНК *Triticosecale*: ((ISSR-10 ((ATG)₇C), X9 ((ACC)₆G), X11 ((AGC)₆G), ISSR-8 ((GAG)₆C), ISSR-9 ((ACG)₇G)). Полученные результаты важны для дальнейших исследований генетического разнообразия озимых сортов тритикале.

Библиографический список

1. FAO STAT. Второй доклад о состоянии мировых генетических ресурсов для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства. Рим. 2010. 436 с. URL: <https://www.fao.org/3/i1500r/i1500r00.htm> [дата обращения: 02.10.2022].
2. Гамберова Т.В., Бабайцева Т.А., Ленточкин А.М. Экологическая оценка сортов озимой тритикале // Аграрный вестник Урала. 2014. №12. С. 6-8.
3. Моисеева К.В. Продуктивность сортов озимой пшеницы // Аграрный вестник Урала. 2017. №9. С. 30-34.
4. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография. Пермь, 2013. 239 с.
5. Cota-Sánchez, J.H., Remarchuk, K. & Ubayasena, K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue // Plant Molecular Biology Reporter. 2006. Vol. 24. P. 161–167.
6. Rogers S. O. & Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. / S.O. Rogers & A.J. Bendich // Plant Molecular Biology. – 1985. – V. 5. – P. 69-76.
7. Корзун В. Н. Разработка и применение геномных технологий для молекулярно-генетического картирования и прикладной селекции зерновых культур: дис. д-ра биол. наук. СПб., 2021. – 281 с.

ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМ. ТОЛСТЯНКОВЫЕ (CRASSULACEAE J. ST.-HIL.)

Арапова А.О., Шибанова Н.Л.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты по введению в культуру in vitro некоторых декоративных представителей семейства Толстянковые. Установлено, что для стерилизации эксплантов оптимальным является использование следующих стерилизующих агентов: 20%-ного раствора хлорамина-Б с экспозицией 30 мин и 70%-ного раствора этанола с экспозицией 1 мин. Рекомендуется использовать твердую питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов: 6-БАП 2 мг/л, НУК 2,5 мг/л и кинетина 2,5 мг/л.

Ключевые слова: культура in vitro, каллус, Crassulaceae J. St.-Hil.

INTRODUCTION INTO CULTURE IN VITRO OF SOME ORNAMENTAL REPRESENTATIVES OF THE FAM. CRASSULACEAE (CRASSULACEAE J. ST.-HIL.)

Arapova A. O., Shibanova N. L.

Perm State University, Perm, Russia

Abstract. The results of the introduction some ornamental representatives of the Crassulaceae into culture in vitro are presented. It has been established that the following sterilizing agents are optimal for explant sterilization: 20% chloramine-B solution with 30 min exposure and 70% ethanol solution with 1 min exposure. It is recommended to use Murashige and Skoog solid nutrient medium supplemented with phytohormones: 6-BAP 2 mg/l, NAA 2.5 mg/l and kinetin 2.5 mg/l.

Keywords: culture in vitro, callus, Crassulaceae J. St.-Hil.

Одними из популярных декоративных растений, которые широко используются по всему миру, являются представители семейства Толстянковые (Crassulaceae J. St.-Hil.). Такие качества, как компактность, простой уход, возможная пересылка растений на дальние расстояния, широкие пределы выносливости видов, многообразие окраски и форм листьев, позволили занять этим растениям одно из ведущих мест в мире [1,2]. Помимо декоративных качеств в последние годы у многих представителей семейства были найдены и изучены биологически и фармакологически активные вещества, которые проявляют гепатопротекторную, антигипергликемическую, антиоксидантную, противомикробную, антимуtagenную, инсектицидную и др. типы биологической активности [3].

Основные проблемы выращивания Толстянковых – это длительный ювенильный период и медленный рост [2]. Поэтому, микроклональное размножение является одним из наиболее эффективных методов разведения данных растений. Кроме этого, данный метод позволяет

сохранить множество полученных гибридных сортов, например, с признаками вариегатности и фасциации, которые проявляются у небольшого числа клонов при использовании традиционных методов вегетативного размножения [4,5].

Цель работы – получение первичного каллуса для введения в культуру *in vitro* некоторых представителей семейства Толстянковые (Crassulaceae J. St.-Hil.).

Исследования проводились в 2022 году в лаборатории микрклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. В качестве объектов исследований выбраны 2 вида и 1 гибрид: *Echeveria agavoides* Lem. hybr., *Echeveria purpurorum* (Rose) A. Berger и гибрид *Crassula rupestris* x *Crassula perfoliata* var. *minor* (*Crassula* cv. *Springtime*).

Эксплантами для введения в культуру *in vitro* выбраны части листовых пластинок эхеверий размером 0,5–1 см² и части побегов крассулы размером 2 см. Всего было высажено 372 экспланта. Стерилизацию материала проводили в 3 общепринятых этапа [5]. Престерилизация включала в себя обработку нейтральным детергентом в течение 20 мин и промывку проточной водой в течение 10 мин. В качестве стерилизующих агентов использовались 5%-ный раствор гипохлорита натрия («Белизна») с экспозицией 20 мин; 10%-ный раствор хлорамина-Б с экспозицией 20 мин; 20%-ный раствор хлорамина-Б с экспозицией 15-30 мин и 70%-ный раствор этанола с экспозицией 1 мин. Постстерилизация включала промывку в трех сменах стерилизованной дистиллированной водой по 5 мин в каждой. Стерилизация питательной среды в пробирках проводилась в автоклаве Sanyo MLS-3780 при температуре 120°C под давлением 1 атм. в течение 15 мин. Все этапы введения в культуру *in vitro* проводились в стерильных условиях в ламинар-боксе.

Экспланты высаживались на твердую питательную среду Мурасиге и Скуга (MS) с содержанием сахарозы 30 г/л, агара 7 г/л и витаминов: пиридоксин 2,5 мг/л, тиамин 5 мг/л и никотиновая кислота 2 мг/л. В качестве регуляторов роста использовались ауксины (β -индолилуксусная кислота (ИУК), α -нафтилуксусная кислота (НУК) и цитокинины (6-бензиламинопурин (6-БАП), кинетин. Всего было использовано 4 варианта среды с разным сочетанием и концентрацией фитогормонов: 6-БАП 2 мг/л и ИУК 5 мг/л; ИУК 2 мг/л и кинетин 0,2 мг/л; 6-БАП 2 мг/л, НУК 2,5 мг/л и кинетин 2,5 мг/л; ИУК 1 мг/л и кинетин 1 мг/л. Контрольный вариант среды не содержал витамины и фитогормоны.

Растения выращивались в условиях искусственного освещения в климатической камере «Binder KBF LQC 240» при температуре $+18 \pm 2^\circ\text{C}$ и освещении 14/10. Через 21-30 дней после посадки проводилась выбраковка материала, который имел признаки инфицирования. Подсчитывалось число стерильных эксплантов к общему числу объектов, подвергнутых стерилизации. Определялась жизнеспособность материала как процент стерильных эксплантов с признаками регенерации. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием стандартного пакета анализа Microsoft Office Excel. Различия по критерию Фишера считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Фотографии выполнены с помощью Redmi Note 9 Pro.

Первым этапом микрклонального размножения является стерилизация эксплантов. Для *Crassula* cv. *Springtime* применялся один режим стерилизации, в котором в качестве стерилизующих агентов использовались 5%-ный раствор гипохлорита натрия с экспозицией 20 мин и 70%-ный раствор этанола с экспозицией 1 мин. Для эксплантов двух изученных видов рода *Echeveria* DC. дополнительно использовалось еще 2 режима стерилизации, при которых 5%-ный раствор гипохлорита натрия был заменен на 10%-ный раствор хлорамина-Б с экспозицией 20 мин и 20%-ный раствор хлорамина-Б с экспозициями 15, 25 и 30 мин.

Установлено, что использование 5%-ного раствора гипохлорита натрия с экспозицией 20 мин привело к повреждению эксплантов *Echeveria*, вызвав быстро прогрессирующий некроз. У эксплантов *Crassula* cv. *Springtime* подобный эффект отсутствовал. Данные по выходу стерильной культуры представлены на рис. 1.

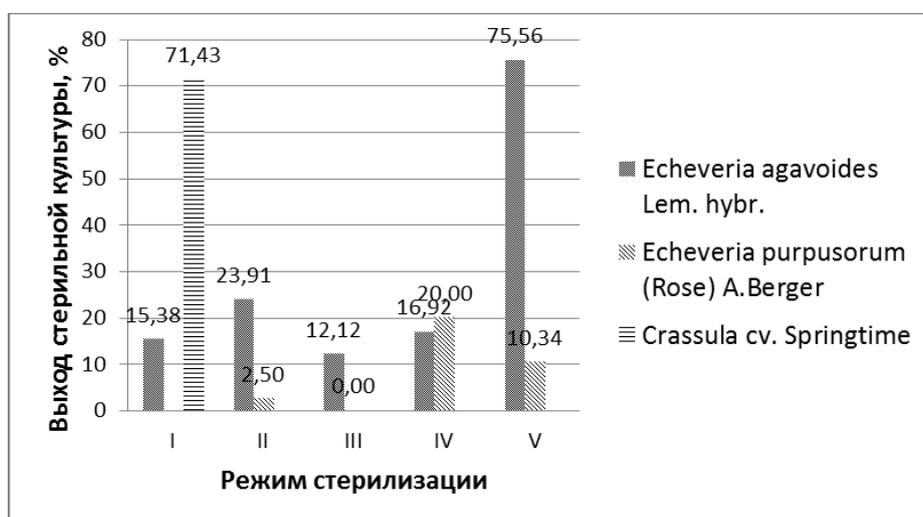


Рисунок 1 – Процент выхода стерильной культуры Толстянковых: I – гипохлорит натрия (5%) 20 мин и этанол (70%) 1 мин; II – хлорамин-Б (10%) 20 мин и этанол (70%) 1 мин; III – хлорамин-Б (20%) 15 мин и этанол (70%) 1 мин; IV – хлорамин-Б (20%) 25 мин и этанол (70%) 1 мин; V – хлорамин-Б (20%) 30 мин и этанол (70%) 1 мин.

Экспланты *E. agavoides* hybr. обладали высокой стерильностью при использовании V режима стерилизации (75,56%), который включал в себя применение 20%-ного раствора хлорамина-Б с экспозицией 30 мин и 70%-ного раствора этанола с экспозицией 1 мин. При использовании других режимов стерилизации у данного вида отмечается низкий выход стерильной культуры, который не превышает 23,91%. Стерильность культуры *E. purpurorum* была низкой при использовании всех режимов стерилизации. Наибольший выход стерильной культуры наблюдался при использовании 20%-ого раствора хлорамина-Б с экспозицией 25 мин и 70%-ого раствора этанола с экспозицией 1 мин (20,00%). При других режимах стерилизации он не превышал 10,34%. Для *Crassula* cv. *Springtime* использовался только один режим стерилизации, который включал обработку материала 5%-ным раствором гипохлорита натрия с экспозицией 20 мин и 70%-ным этанолом с экспозицией 1 мин. Выход стерильной культуры был высоким и составил 71,43%.

Для *E. agavoides* hybr. статистически значимых различий между первыми четырьмя режимами стерилизации не установлено ($p=0,48$, $p<0,05$). Статистически значимые различия установлены только с V вариантом стерилизации, при котором используются 20%-ный раствор хлорамина-Б с экспозицией 30 мин и 70%-ный раствор этанола с экспозицией 1 мин ($p=0,00$, $p<0,05$). Поэтому этот режим можно рекомендовать для стерилизации эксплантов данного вида. Для *E. purpurorum* статистически значимых различий между режимами стерилизации не выявлено ($p=0,26$, при $p<0,05$).

В работе А.П. Новаковской [6] для Родиолы розовой использовался режим стерилизации, включающий обработку 70% этанолом в течение 3-5 мин, 20% хлорамин-Б в течение 15 мин. В данном эксперименте выход стерильной культуры составил 75-80%. Несмотря на увеличение экспозиции 20%-ного хлорамина-Б до 30 мин и уменьшения экспозиции 70%-ного

этанола до 1 мин, мы получили для *E. agavoides* hybr. сопоставимые данные по стерильности культуры (75,56%), для *E. purpurorum* – более низкие (10,34%).

Процесс каллусообразования на эксплантах Толстянковых на твердой питательной среде MS начинается через 10-14 дней после посадки. Для изученных представителей рода *Echeveria* характерно образование плотного каллуса (рис. 2).



Рисунок 2 – Каллусообразование у эксплантов *Echeveria agavoides* Lem. hybr.: а – начало каллусообразования на 10 день после посадки; б – плотный каллус на 30 день после посадки; в – витрификация каллусной ткани.

На варианте среды MS с содержанием НУК в концентрации 2,5 мг/л была отмечена витрификация каллусной ткани у эксплантов *E. agavoides* hybr. через 3 недели после посадки. В литературе [7] подобный эффект отмечается для *Sedum spectabile* (Boreau) H. Ohba .

Для *Crassula* cv. Springtime отмечается образование рыхлого каллуса через 10 дней после посадки (рис. 3).



Рисунок 3 – Каллусообразование у эксплантов *Crassula* cv. Springtime: а – каллусообразование на 10 день после посадки; б – рыхлый каллус на 30 день после посадки

Через 3-4 недели после посадки у *E. agavoides* hybr. и *Crassula* cv. Springtime наблюдается вторичный соматический эмбриогенез (процесс формирования зародышевых структур из соматических клеток каллуса) и образование микророзеток. Данные по жизнеспособности эксплантов представлены в таблице

Таблица – Процент выхода жизнеспособных эксплантов Толстянковых на твердой питательной среде Мурасиге и Скуга

Вид/гибрид	Вариант среды				
	1	2	3	4	5
<i>Echeveria agavoides</i> Lem.hybr.	44,4	0,0	100,0	0,0	89,7
<i>Echeveria purpusorum</i> (Rose) A.Berger	–	0,0	0,0	0,0	70,0
<i>Crassula</i> cv. Springtime	–	–	–	–	100,0

Примечание: 1 – ИУК 2 мг/л и кинетин 0,2 мг/л; 2 – ИУК 1 мг/л и кинетин 1 мг/л; 3 – 6-БАП 2 мг/л и ИУК 5 мг/л; 4 – контрольная среда без фитогормонов; 5 – 6-БАП 2 мг/л, НУК 2,5 мг/л и кинетин 2,5 мг/л; прочерк обозначает отсутствие данных

Наилучший результат по жизнеспособности эксплантов для всех изученных представителей *Crassulaceae* был отмечен при использовании варианта среды с фитогормонами 6-БАП 2 мг/л, НУК 2,5 мг/л и кинетин 2,5 мг/л. Выход жизнеспособных эксплантов составил: у *E. agavoides* hybr. – 89,7%, у *E. purpusorum* – 70%, у *Crassula* cv. Springtime – 100%. Также все экспланты оказались с признаками регенерации у *E. agavoides* hybr. на варианте среды с добавлением 6-БАП 2 мг/л и ИУК 5 мг/л. Статистически значимых различий для *E. agavoides* hybr. для большинства использованных вариантов среды не выявлено, за исключением 1 и 5 вариантов среды ($p=0,00$, $p<0,05$). Для *E. purpusorum* достоверно значимых отличий между вариантами среды не выявлено ($p=1,00$, $p<0,05$).

Вариант среды MS с добавлением 6-БАП 2 мг/л, НУК 2,5 мг/л и кинетина 2,5 мг/л является видоизмененным вариантом среды, использованной в работе А. Kumari, А., Р. Baskaran и J. Van Staden [8] для *Cotyledon orbiculata* L. В работе использовался вариант среды с добавлением комбинации 5 мг/л тидиазулона и 2,0 мг/л 6-БАП. В нашем исследовании тидиазулон, который при добавлении в среду оказывает на растительные клетки эффекты подобные цитокининам и ауксинам одновременно, был заменен на сочетание кинетина и НУК в концентрации по 2,5 мг/л каждый. Это привело не к индукции прямого органогенеза, а к каллусообразованию и дальнейшему соматическому эмбриогенезу и образованию микророзеток.

Таким образом, для получения стерильной культуры представителей семейства Толстянковые рекомендуется использовать режим стерилизации, при котором основными стерилизующими агентами являются: 20%-ный раствор хлорамина-Б с экспозицией 30 мин и 70%-ный раствор этанола с экспозицией 1 мин. Для *Crassula* cv. Springtime также рекомендован режим стерилизации, включающий в себя такие стерилизующие агенты, как 5%-ный раствор гипохлорита натрия с экспозицией 20 мин и 70%-ный раствор этанола с экспозицией 1 мин. При введении в культуру *in vitro* рекомендуется использовать твердую питательную среду Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 6-БАП в концентрации 2 мг/л, НУК в концентрации 2,5 мг/л и кинетина в концентрации 2,5 мг/л. Выход жизнеспособных эксплантов при использовании данного варианта среды у изученных представителей семейства варьировал от 70 до 100%.

Библиографический список

1. Сулейманова З. Н., Кашаева Г. Г., Якупова В. В. Использование некоторых видов семейства с rassulaceae DC. В экологии жилища // Известия Самарского научного центра РАН. – 2013. – №3-4. – С. 1447-1448.
2. Декоративное садоводство с основами ландшафтного проектирования: учебник // Исачкин А. В., Крючкова В. А., Скакова А. Г., Шарафутдинов Х. В. / под ред. А. В. Исачкина. – М.: ИНФРА-М, 2021. – 522 с..
3. Eid O., Ezzat S., Gonaïd M., Choucry M. Crassulaceae (chemistry and pharmacology) // Future Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Vol. 4. – Is. 2. – P. 234-240.
4. Malyarenko, V. A., Gaydarzhy, M.M. Abnormal type of growth of succulent plants and testing hypotheses of their origin. // Plant Introduction. – 2014. – Vol. 63. – P. 46-52.
5. Катаева Н. В., Бутенко Р. Г. Клональное микроразмножение растений. – М.: Наука, 1983. – 97 с.
6. Новаковская А.П. Некоторые аспекты введения в культуру *in vitro* родиолы розовой // Материалы Междунар. конф. «Сейфуллинские чтения-10». – 2014. – Т.1. – Ч.1. – С.69-71.
7. Yang C., Qin Y., Sun, X., Yuan S., Lin, H. Propagation of *Sedum spectabile* Boreau in leaf culture *in vitro* // Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. – 2012. – Vol. 40. – P. 107-112.
8. Kumari, A., Baskaran P., Van Staden, J. *In vitro* propagation and antibacterial activity in *Cotyledon orbiculata*: a valuable medicinal plant // Plant Cell Tiss Organ Cult. – 2016. – Vol. 124. – P. 97-104.

ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И γ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ *HORDEUM VULGARE* L.

Бабина К.В., Амосова Н.В.

ИАТЭ НИЯУ МИФИ, Обнинск, Россия

Аннотация. Исследование посвящено разделному и сочетанному влиянию Al^{3+} , Zn^{2+} , γ -облучения на ячмень. Изменения цитогенетических показателей при комплексном действии свидетельствуют о снижении токсичности Al через эффект антагонизма, гормезис. Положительные тенденции митотического индекса (МИ) и частоты aberrантных клеток (АК) при использовании Zn и радиации достоверно значимы. Однако, лишь облучение полностью нивелирует токсичность, вызывает стремительный рост МИ до уровней, превосходящих контроль.

Ключевые слова: ячмень, γ -облучение, тяжелые металлы.

INFLUENCE OF HEAVY METALS AND γ -IRRADIATION ON THE CYTOGENETIC INDICATORS OF *HORDEUM VULGARE* L.

Babina K. V., Amosova N. V.

IATE MEPHI, Obninsk, Russia

Abstract. The study is devoted to the separate and combined effects of Al^{3+} , Zn^{2+} , γ -irradiation on barley. Changes in cytogenetic parameters during complex action indicate a decrease in Al toxicity through the effect of antagonism, hormesis. The positive trends in the mitotic index (MI) and the frequency of aberrant cells (AC) with the use of Zn and radiation are significantly significant. However, only irradiation completely eliminates toxicity, causes a rapid increase in MI to levels that exceed control.

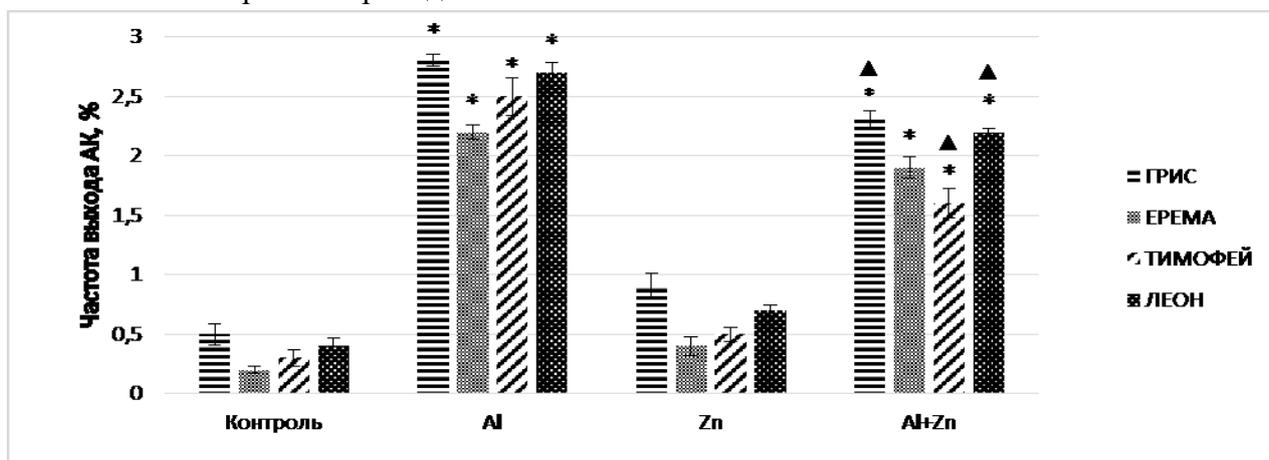
Keywords: barley, γ -irradiation, heavy metals.

Интенсивная производственная деятельность человека несомненно сказывается на состоянии окружающей природной среды. Мониторинг состояния компонентов биоценозов, их ответ на постоянно растущую антропогенную нагрузку – неотъемлемая часть современных научных изысканий. Одним из активно развивающихся направлений являются исследования последствий присутствия в биотопах химических элементов. Изучение негативных эффектов тяжелых металлов, в частности – некоторых конкретных подвижных форм, среди которых можно выделить ионы алюминия – потенциально значимо для сельскохозяйственного развития, так как токсичность металла в сочетании с такой характеристикой почвы, как кислотность, приводит к критическим снижениям качества и количества урожая, гибели культур [1, 2]. Кроме этого, наличие даже жизненно необходимых микроэлементов, таких как

цинк, может иметь неблагоприятный исход, так как их свойства напрямую зависят от их концентрации [3].

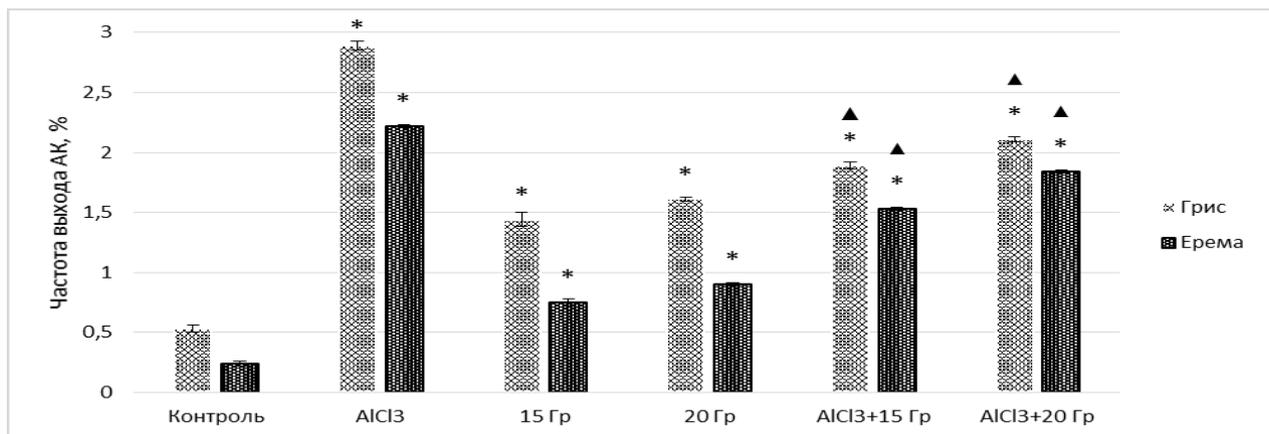
Стоит, однако, заметить, что анализ комбинированного действия элементов более уместен, поскольку биота подвергается поликомпонентному давлению [4, 5]. Причем в ряде случаев совместное воздействие агентов как физической, так и химической природы, может стать способом защиты или стимулом к развитию. Такое возможно, если используемые стрессоры обладают антагонизмом или реализуется эффект радиационного гормезиса [6].

Семена ячменя различных сортов проращивали в водных растворах, содержащих ионы цинка и алюминия, как отдельно, так и совместно, а также предварительно облучив семена в дозах 15 и 20 Гр (при мощности – 58 Гр/ч). Как показывают экспериментальные данные, представленные на рисунках 1 и 2, отдельное использование физических стрессовых факторов неизменно влечет за собой увеличение частоты выхода aberrantных клеток вне зависимости от сортовой принадлежности ячменя.



* - различия с контролем значимы при $p < 0,05$; ▲ - различия с вариантом Al^{3+} значимы при $p < 0,05$

Рисунок 1 – Частота aberrantных клеток (%) ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) при отдельном и комбинированном действии ионов Al^{3+} и Zn^{2+} в концентрациях, равных 0,5 мг/л и 5,0 мг/л соответственно.



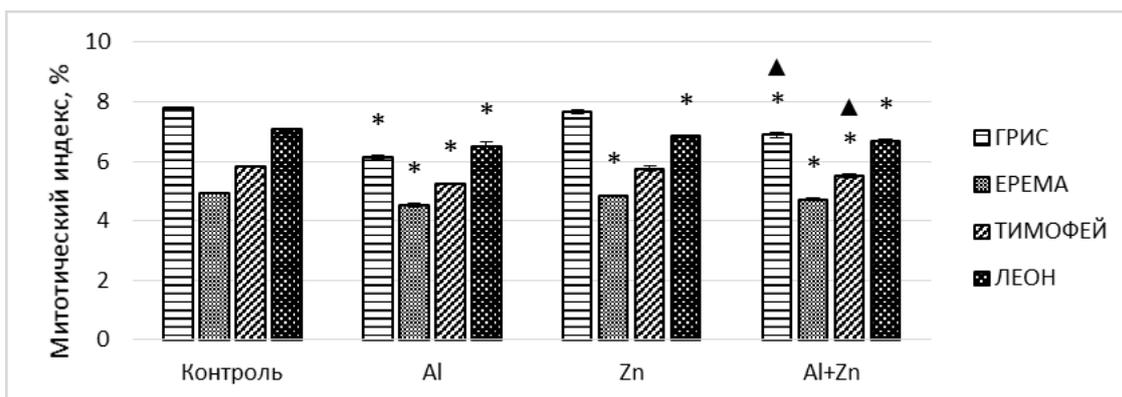
* - различия с контролем значимы при $p < 0,05$; ▲ - различия с вариантом Al^{3+} значимы при $p < 0,05$

Рисунок 2 – Частота aberrantных клеток (%) ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) при отдельном и комбинированном действии ионов Al^{3+} (0,5 мг/л) и γ -облучения в дозах 15 и 20 Гр (при мощности – 58 Гр/ч).

Статистически значимые отличие от контроля выявляются во всех вариантах опыта, кроме единоличного действия цинка. В связи с тем, что он – востребованный микроэлемент,

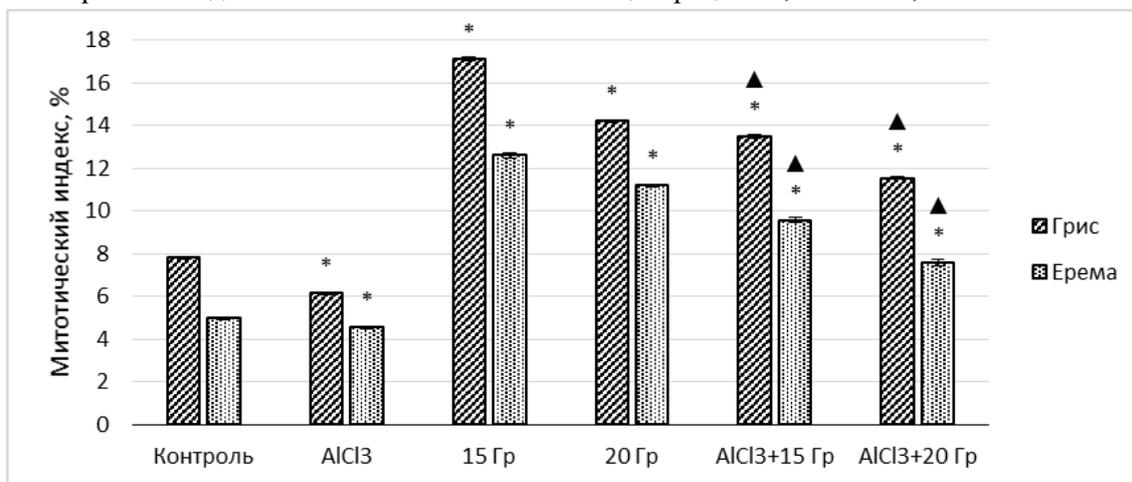
участвующий в процессах фотосинтеза и метаболизма, отсутствие резко выраженных негативных последствий очевидно.

Если учесть, что результатом содержания ионов алюминия в растворе для проращивания семян стало повышение числа АК в 7,4 раза и снижению митотического индекса на 11,9% в среднем по сортам по сравнению с контролем, о чем свидетельствуют рисунки 3 и 4, то ясно фиксируются защитное и стимулирующее свойства совокупности факторов, преимущество перед индивидуальным пребыванием Al^{3+} комбинирования ионов, выражающееся в снижении доли аберрантных клеток 1,3 раза и росту МИ в 1,1 раз в среднем по сортам, а также применения предпосевного гамма-облучения ячменя – показатель частоты выхода АК уменьшается в 4 и в 7 раз для сортов Грис и Ерема соответственно, МИ – возрастает в 1,9 раз.



* - различия с контролем значимы при $p < 0,05$; ▲ - различия с вариантом Al^{3+} значимы при $p < 0,05$

Рисунок 3 – Митотический индекс (%) ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) при раздельном и комбинированном действии ионов Al^{3+} и Zn^{2+} в концентрациях 0,5 мг/л и 5,0 мг/л соответственно.



* - различия с контролем значимы при $p < 0,05$; ▲ - различия с вариантом Al^{3+} значимы при $p < 0,05$

Рисунок 4 – Митотический индекс (%) ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) при раздельном и комбинированном действии ионов Al^{3+} и Zn^{2+} в концентрациях 0,5 мг/л и 5,0 мг/л соответственно.

В процессе исследования были выявлены хромосомные aberrации 5 видов: одиночные и парные фрагменты, центрические, ацентрические кольца и мосты. Их соотношение определяют, как комбинация стрессоров, так и сортовая принадлежность.

В случае с алюминием преобладают парные и одиночные фрагменты с сохранением данной тенденции при совместном присутствии ионов. Процент ацентрических колец не превышает 10%.

Опыт с γ -излучением характеризуется не только сокращением числа АК, но и перераспределением в процентном соотношении типов аберраций: доли мостов и центральных колец вышли на один уровень – 17-18%, ацентрические кольца превысили порог в 10%, но их количество по-прежнему значительно уступает остальным видам. Также, в отличие от предшествующего эксперимента, преобладают одиночные фрагменты. Соотношения видов аберраций отражены на рисунках 5-7.



Рисунок 5 – Доля аберрантных клеток каждого вида при действии ионов Al^{3+} в концентрации равной 0,5 мг/л для ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) различных сортов: А – Грис; Б – Ерема; В – Тимофей; Г – Леон.



Рисунок 6 – Доля аберрантных клеток каждого вида при комбинированном действии ионов Al^{3+} (0,5 мг/л) и Zn^{2+} (5,0 мг/л) для ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L) различных сортов: А – Грис; Б – Ерема; В – Тимофей; Г – Леон.

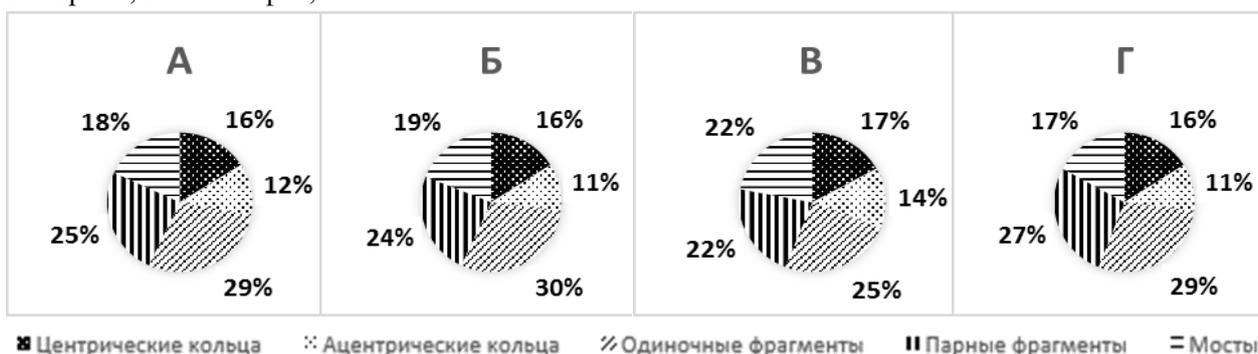


Рисунок 7 – Доля аберрантных клеток каждого вида при комбинированном действии ионов Al^{3+} (0,5 мг/л) и гамма-облучения для сортов Грис и Ерема: А – Al^{3+} + 15 Гр (Грис); Б – Al^{3+} + 15 Гр (Ерема); В – Al^{3+} + 20 Гр (Грис); Г – Al^{3+} + 20 Гр (Ерема).

Выявленные в ходе научной работы типы аберраций и их спектры сохраняются как в пределах сортов, так и при различных вводных условиях эксперимента. Данная ситуация может быть доказательством аналогичности моделей поступления и действия агентов, схожих ответных реакциях растительного организма на стресс и раздражители. Альтернативы

соотношения видов АК, вероятно, основываются на различных механизмах формирования эффектов антагонизма: в случае с ионами цинка, вероятно, активируются защитные системы, в ответе которых ведущая роль принадлежит активным формам кислорода, киназным каскадам и транскрипционным факторам, тогда как радиационный гормезис нивелирует неблагоприятные воздействия через стимулирование ростовых характеристик, а не запуском защитных механизмов растения.

Библиографический список

1. Тестирование устойчивости разных форм ячменя (*Hordeum vulgare* L.) к токсическому действию алюминия / Н. В. Кононенко, И. А. Чабан, Е. А. Смирнова [и др.] // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – № 2. – С. 121-130. – DOI 10.25750/1995-4301-2019-2-121-130. – EDN LGPVFJ.
2. Щенникова, И. Н. Методы и результаты селекции ячменя на устойчивость к кислым почвам / И. Н. Щенникова // Создание сортов овса и ячменя для кислых почв: Теория и практика. – Saarbrücken, Germany: Palmarium Academic Publishing, 2012. – С. 307-333. – EDN YWRTAD.
3. Казнина, Н. М. Влияние избытка цинка на качество семян ячменя / Н. М. Казнина, А. К. Задворная, Ю. В. Батова // Агрехимия. – 2021. – № 8. – С. 57-61. – DOI 10.31857/S0002188121060065. – EDN MVMAFK.
4. Петухова, Е. С. Выяснение особенностей рост-ингибирующего действия тяжёлых металлов на фоне различных форм минерального азота (на примере *Hordeum vulgare* L.) / Е. С. Петухова, Т. Я. Ашихмина // Теоретическая и прикладная экология. – 2016. – № 2. – С. 72-78. – EDN WEFRYR.
5. Singh N, Gupta VK, Kumar A and Sharma B (2017) Synergistic Effects of Heavy Metals and Pesticides in Living Systems. *Front. Chem.* 5:70. doi: 10.3389/fchem.2017.00070
6. Чурюкин, Р. С. Проявление эффекта гормезиса у растений ячменя (*Hordeum vulgare* L.) в контрастных условиях произрастания при γ -облучении семян / Р. С. Чурюкин, С. А. Гераськин // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 4. – С. 820-829. – DOI 10.15389/agrobiology.2017.4.820rus. – EDN ZFTYFL.

ВЫЧИСЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА УРОЖАЙНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФОРМ ЧЕРЕШНИ

Багиров О.Р.

*Нахчыванское Отделение Национальной Академии Наук Азербайджана, Нахчыван,
Азербайджан*

Аннотация. В представленной статье вычислен средний индекс производительности на основе показателя урожайности, объема кроны и проекционной площади 12 форм черешни, принадлежащим к местным и интродуцированным сортам и произведено сравнение с контрольным сортом Рамон Олива. Среди форм 50% средняя урожайность, у 66,7% урожайность по объему кроны и 58,3% проекционной площади оказалась выше. Предложены перспективные формы черешни с высокой урожайностью для посадки фруктовых садов и предложены в селекционных исследованиях.

Ключевые слова: черешня, форма, урожайность, объем кроны, проекционная площадь.

CALCULATION AND ANALYSIS OF BIOMETRICS PARAMETERS ON THE PRODUCTIVITY IN THE PERSPECTIVE SWEET CHERRY FORMS

Baghirov Orkhan Rza oglu

Nakhchivan Section of Azerbaijan National Academy of Science, Nakhchivan, Azerbaijan

Abstract. In the presented paper the productivity index of sweet cherry is calculated according to the average productivity index, size of umbrella and projection area by 12 forms having superior indexes and analyzed in comparison with Ramon Oliva sort in the area divided into districts. The middle productivity of the 50% of the forms, 66,7% of the forms according to the productivity index, size of umbrella and 58,3% projection area were superior. High productivity perspectives sweet cherry forms are offered for preparing fruit gardens and selection investigations.

Keywords: sweet cherry, form, productivity, volume of the umbrella, projection area.

Наряду с другими продуктами фрукты занимают важное место в продовольственном секторе. В настоящее время в Нахчыванской Автономной Республике ведутся работы по усилению контроля над оборотом генетически модифицированных организмов и их производных, восстановлению фруктовых садов и посадке новых, поощрению экспорта фруктов, селекции высокопродуктивных сортов, возникших на основе естественной селекции за счет природных условий, давности выращивания и интродуцированных сортов.

Процент выращиваемых местных сортов (27 %) и впервые обнаруженных форм (58,7%) преобладает над процентом интродуцированных (14,3%). В результате исследований выяснилось, что во время выращивания фруктовых растений народные селекционеры первым делом учитывали показатель продуктивности сортов. В связи с этим при посадке черешневых

садов нужно выбирать высококачественные, продуктивные сорта и формы. В зависимости от биологических особенностей выбранных форм черешни сравнительный анализ с местными и районизированными сортами выявил перспективность 12-и форм (Котам-1, Котам-6, Ордубад-7, Андамидж-5, Андамидж-12, Нюс-Нюс-7, Нюс-Нюс-18, Анабад-2, Дырныс-5, Башкент-3, Кюкю-1, Коланы-3) [1, 2]. Изучение индекса урожайности черешни в Нахчыван и подготовка рентабельных предложений является важным фактором. В настоящее время в мировой садоводческой системе индекс урожайности сортов вычисляется путем соотношения массы урожая, собранного с каждого дерева, на объем кроны, площадь проекции, на площадь поперечного сечения штамба и на поверхность листьев, а также с помощью других методов. Целью исследования является вычисление по объему кроны и проекционной площади индекса урожайности перспективных форм черешни, выращиваемых в Нахчыванской АР, на основе биометрических показателей.

В качестве материала использованы деревья 12-и перспективных форм черешни, а для сравнительного анализа в качестве контрольных сортов взяты районизированный сорт черешни Рамон Олива [5]. В исследовательской работе для вычисления показателя урожайности деревьев в качестве методических пособий использовались [3,4,6]. Во время исследования на основе биометрических показателей деревьев, объема кроны и проекционная площадь вычислялись по следующим формулам:

$$\text{Объем кроны: } V = 0,523 \cdot d^2 \cdot h, \text{ где}$$

V – объем кроны; h – высота кроны; d – средний диаметр кроны; 0,523 – постоянный коэффициент

$$\text{Проекционная площадь кроны: } S = 0,196(d_1 + d_2)^2, \text{ где}$$

S – проекционная площадь кроны; d₁ – междурядовой диаметр кроны; d₂ – диаметр кроны по расстоянию между растениями; 0,196 – постоянный коэффициент

Выявлено, что высота кроны у выращиваемых в Нахчывани перспективных сортов черешни составляет 3,5-7,0 м. Самый высокий показатель по высоте кроны обнаружен у формы Башкент-3 (7,0 м). Путем анализов выявлено, что у 75% сортов и форм черешни высота кроны составляет 4,0-5,5 м. Междурядовой диаметр у исследуемых форм черешни составил 3,0-5,0 м. Диаметр по расстоянию между рядами у форм черешни составил 4,5-6,5 м. Во время вычислений самый высокий показатель по объему и проекционной площади кроны обнаружен у формы черешни Дырныс-5 (121,5 м³, 25,9 м²). У форм черешни Дырныс-5, Андамидж-12 (120,6 м³, 23,7 м²) и Андамидж-5 (94,1 м³, 22,0 м²) в сравнении с контрольным сортом районизированным Рамон Олива (90,2 м³, 20,0 м²) объем кроны, и проекционная площадь оказалась больше. Несмотря на то, что у формы Коланы-3 объем кроны (70,4 м³) оказался меньше чем у контрольного сорта (Рамон Олива), проекционная площадь кроны (70,4 м²) оказалась выше. В общем, во время вычислений у 66,7% форм черешни объем кроны оказался больше 70,0 м³. У 58,3% форм черешни проекционная площадь кроны составляет 18,8-25,9 м².

Средняя урожайность исследуемых форм черешни вычислена на основе собранного годового фактического урожая. У форм черешни показатель средней урожайности меняется в интервале 29,00-40,65 кг. У 50% форм черешни средняя урожайность оказалась выше, чем у контрольного сорта – районизированного Рамон Олива (33,18 кг). Самая высокая средняя урожайность выявлена у формы черешни Башкент-3 (40,65 кг). Несмотря на то, что у большинства исследуемых форм черешни средняя урожайность в сравнении с контрольным сортом оказалась ниже, они по объему кроны и проекционной площади отличились высоким индексом урожайности.

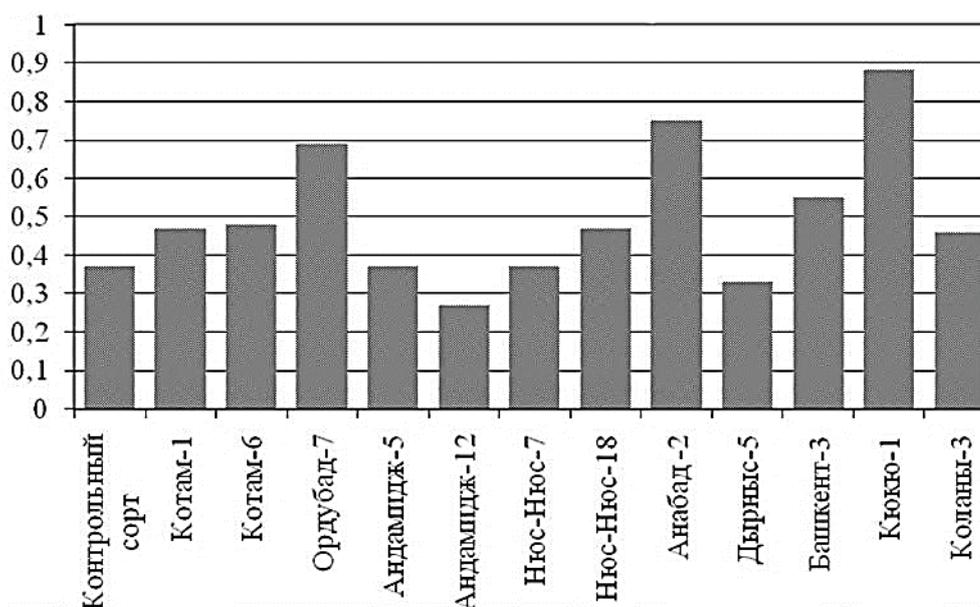


Рисунок 1 – Индекс урожайности черешни по объему кроны (кг/м³).

Самый высокий индекс урожайности по объему кроны и проекционной площади обнаружен у формы черешни Кюкю-1 (0,88 кг/м³, 3,14 кг/м²). Индекс урожайности по объему кроны у выращиваемых в Нахчыванской АР перспективных форм черешни составляет 0,27-0,88 кг/м³ (Рисунок 1). Путем вычислений выявлено, что индекс урожайности по объему кроны у 66,7% форм черешни соответственно выше, чем у районизированного сорта Рамон Олива (0,37 кг/м³). У 50% форм черешни индекс урожайности составляет 0,46-0,55 кг/м³. Несмотря на то, что во время исследований у форм черешни Котам-6, Нюс-Нюс-18, Анабад-2, Коланы-3 средняя урожайность дерева оказалась ниже, чем у контрольного сорта, индекс урожайности по объему кроны оказался сравнительно выше.

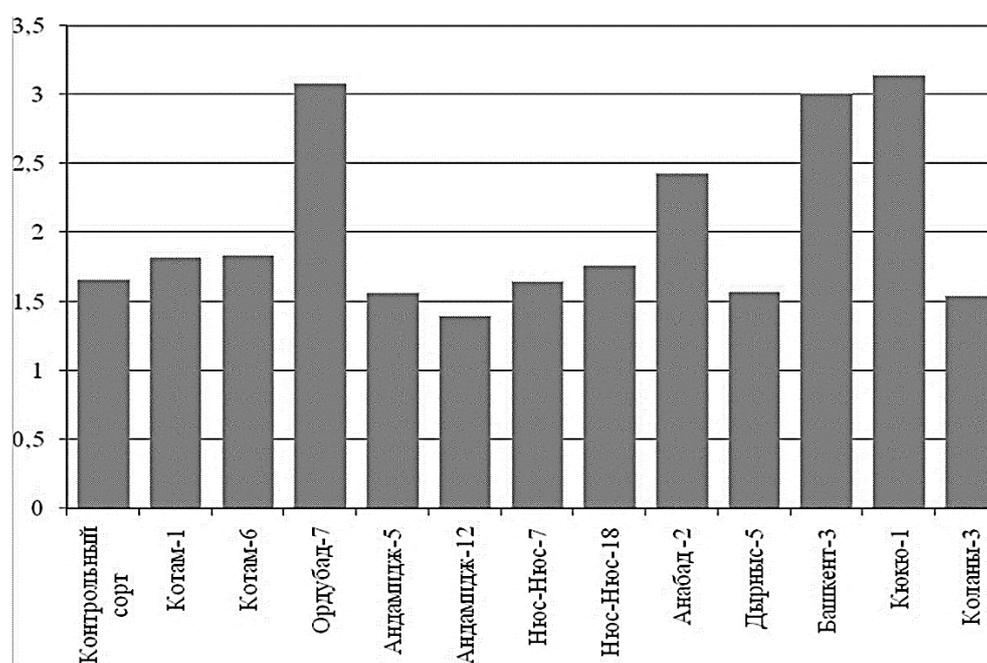


Рисунок 2 – Индекс урожайности черешни по проекционной площади кроны (кг/м²).

Индекс урожайности по проекционной площади кроны у форм черешни составляет 1,39-3,14-кг/м² (Рисунок 2). Индекс урожайности по проекционной площади кроны у 58,3% выращиваемых форм черешни выше, чем у районизированного сорта Рамон Олива (1,66 кг/м²). Несмотря на то, что во время исследований у форм черешни Котам-6, Нюс-Нюс-18, Анабад-2, Коланы-3 средняя урожайность дерева оказалась ниже, чем у контрольного сорта, как и в случае с объемом кроны, индекс урожайности по проекционной площади кроны оказался сравнительно выше. А у формы черешни Дырныс-5 наоборот средняя урожайность дерева оказалась выше, чем у контрольного сорта Рамон Олива, но объем кроны, и проекционная площадь оказалась ниже. У формы черешни Андамидж-2 низкий показатель всех трех вычисленных показателей в сравнении с контрольными сортами Рамон Олива обусловлен относительно молодым возрастом дерева.

В результате высокого индекса урожайности по средней урожайности, объему кроны и проекционной площади, выращиваемые в Нахчыванской Автономной Республике формы черешни Ордубад-7, Кюкю-1, Башкент-3, Котам-1 признаны наиболее выгодными. Перспективные формы черешни с высоким показателем индекса урожайности могут быть использованы в посадке высокопродуктивных промышленных садов и в селекционных работах.

Библиографический список

1. Багиров О.Р., Талыбов Т.Г. Генофонды вишни и черешни в Нахчыванской Автономной Республике. Баку: Наука и образование, 2013, 180 с.
2. Багиров О. Формы черешни кандидатов в сорта в расположенной на Южном Кавказе Нахчыванской Автономной Республики / Материалы XX Международной научной конференции «Биологическое разнообразие Кавказа и Юга России», посвященной памяти выдающегося ученого, доктора биологических наук, Заслуженного деятеля науки РД и РФ, академик Г.М.Абдурахманова (г. Махачкала, 6-8 ноября 2018). Махачкала: Типография ИПЭ РД, 2018, с. 127-129 (644с.).
3. Гасанов З.М., Алиев Д.М. Плодоводство (учебник). Баку.: МБМ, 2007, 496 с.
4. Гасанов З.М., Алиев Д.М. Плодоводство (лабораторный практикум). Баку.: МБМ, 2010, 343 с.
5. Государственный реестр разрешенных и защищенных селекционных достижений, используемых для производства для сельскохозяйственного производства на территории Азербайджанской Республики. Баку, 2020, 185 с.

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ *PICEA OBOVATA* LEDEB.

Ваганова Е.А., Боронникова С.В., Жуланов А.А., Корякова А.С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Выявлены эффективные ISSR-праймеры для ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb., *Pinaceae*). Пробы ДНК выделены из образцов хвои 180 деревьев, собранных на территории Пермского края. Из 22 ISSR-праймеров с тотальной ДНК *Picea obovata* Ledeb. 5 продемонстрировали высокую эффективность, так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК. Для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа *P. obovata* были отобраны следующие 5 праймеров: M1 ((AC)₈CG), X9 ((ACC)₆G), X10 ((AGC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT).

Ключевые слова. *Picea obovata* Ledeb., ель сибирская, эффективные праймеры, ПЦР, ISSR-PCR праймеры.

SELECTION OF EFFECTIVE ISSR-PRIMERS FOR *PICEA OBOVATA* LEDEB.

Vaganova E.A., Boronnikova S.V., Zhulanov A.A., Koryakova A.S.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

Abstract. Effective ISSR-primers for Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb., *Pinaceae*) have been identified. DNA samples were isolated from needle samples of 180 trees collected in the Perm Territory. From 22 ISSR primers with total DNA of *Picea obovata* Ledeb. 5 showed high efficiency, as they revealed the largest number of clearly amplifying DNA fragments. For further molecular genetic analysis of *P. obovata*, the following 5 primers were selected: M1 ((AC)₈CG), X9 ((ACC)₆G), X10 ((AGC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT).

Keywords: *Picea obovata* Ledeb., Siberian spruce, effective primers, PCR, ISSR-PCR primers.

Введение. Сохранение генетических ресурсов видов хвойных растений важно для их адаптации в условиях изменения климата. Для характеристики генетического разнообразия гетерогенных природных популяций растений необходим их молекулярно-генетический анализ с использованием высоко полиморфных молекулярных маркеров. Эффективны в исследованиях генетического разнообразия видов древесных растений ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats), выявляющие полиморфизм фрагментов ДНК, заключенных между тандемно повторяющимися элементами – микросателлитами [1].

Специфичность амплификации в первую очередь зависит от праймеров, поэтому они являются важным компонентом ПЦР. Для изучения полиморфизма ДНК разных видов растений с помощью ПЦР необходимо подбирать праймеры, которые фланкируют полиморфные фрагменты ДНК. Подбор эффективных для изучения генетического разнообразия праймеров является первым этапом молекулярно-генетического анализа. Микросателлитные последовательности окружают многие гены и могут использоваться как якорные последовательности при подборе праймеров к этим генам, что и лежит в основе ISSR-анализа [2].

Цель исследований – выявление эффективных ISSR-праймеров для *P. obovata* на примере популяций этого вида, расположенных в Пермском крае.

Методика исследований. Образцы хвои собраны в 2021-22 годах с 180 деревьев из 6 популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb., *Pinaceae*), расположенных в Гайнском, Чердынском, Красновишерском, Березниковском, Кудымкарском, Осинском лесничествах Пермского края. Выделение ДНК проводили по методике С. Роджерса [3], с небольшими модификациями [4], то есть в качестве сорбента использовали PVPP (polyvinylpyrrolidone). Навеска растительного материала составляла 50 мг. Концентрацию и качество ДНК определяли на приборе Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA) и выравнивали в пределах 10 нг/мкл. Отбор эффективных ISSR-праймеров осуществлялся по выявлению наибольшего числа фрагментов, включая и полиморфные, на ISSR-спектре; а также по воспроизводимости результатов ПЦР. Эффективность ISSR-праймеров рассчитывалась в соответствии со шкалой 1-5: от низкой (1) до высокой (5) [5]. Для полимеразной цепной реакции реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 0,2 мкл 1 единицы Таг-полимеразы («Силекс М», Россия); 1 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 10 пМ праймера («Евроген», Россия); 1 mM MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 mM dNTP («Fermentas», Литва); 1 мкл тотальной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере MJ Mini-Cycler («Bio-Rad», USA) по следующей программе для ISSR-анализа: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; температура отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; температура отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин. при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 56 до 64°C для ISSR-праймеров. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1x TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.2 + 1.5 + 2 + 3 Kb DNA Ladder); «ООО-СибЭнзим-М», Москва), определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One («Bio-Rad», USA).

Результаты исследований и их обсуждение. Для выявления эффективности были протестированы 22 ISSR-праймера, с ди- и тринуклеотидным составом и с одним или двумя нуклеотидами на конце праймера, то есть в качестве «якорей». Для определения генетического разнообразия растений наиболее часто используются именно эти ISSR-праймеры [1]. Длина анализируемых ISSR-праймеров варьировала от 13 (X1) до 22 (ISSR9) нуклеотидов (табл.). Каждый из 22 ISSR-праймеров был проанализирован индивидуально в ПЦР с тотальной ДНК *P. obovata*. В результате амплификации в ПЦР с 22 анализируемыми ISSR-праймерами были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 200 до 1200 н.п. Из 22 проанализированных ISSR-PCR праймеров с тотальной ДНК *P. obovata* 5 продемонстрировали высокую

эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся фрагментов ДНК: M1 ((AC)₈CG), X9 ((ACC)₆G), X10 ((AGC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT).

Таблица – Эффективность ISSR-праймеров *P. obovata*

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера
M1	(AC)₈CG	5	ISSR-5	(AG) ₈ CA	3
M2	(AC) ₈ CC	4	ISSR-6	(AG) ₈ CG	4
M3	(AC) ₈ CT	3	ISSR-7	(CTC) ₆ C	2
M27	(GA) ₈ C	2	ISSR-8	(GAG) ₆ C	3
X1	(CA) ₆ G	3	ISSR-9	(ACG) ₇ G	4
X9	(ACC)₆G	5	ISSR-10	(ATG) ₇ C	2
X10	(AGC)₆C	5	CR-212	(CT)₈TG	5
X11	(AGC) ₆ G	3	CR-215	(CA)₆GT	5
ISSR-1	(AC) ₈ T	2	CR-216	(GA) ₆ GG	2
ISSR-3	(TG) ₈ AA	1	CR-217	(TG) ₆ GG	3
ISSR-4	(TG) ₈ GC	2	CR-218	(GA) ₆ CC	1

Примечание: жирным шрифтом выделены эффективные праймеры

Три праймера обнаружили среднюю (4): ISSR-6 ((AG)₈CG), ISSR-9 ((ACG)₇G), M2 ((AC)₈CC), а 14 праймеров показали невысокую (3 и ниже) эффективность. Эффективность праймеров подтверждена в повторных ПЦР.

Таким образом, для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК *P. obovata* были отобраны следующие 5 праймеров: M1 ((AC)₈CG), X9 ((ACC)₆G), X10 ((AGC)₆C), CR-212 ((CT)₈TG), CR-215 ((CA)₆GT). Отобранные эффективные праймеры позволят выявить генетическое разнообразие популяции *P. obovata*. Среди отобранных три динуклеотидных и два тринуклеотидных праймера.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта МИГ №26/776 от 31.03.2022.

Библиографический список

1. Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография/ С.В. Боронникова. – Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. С. 239.
2. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редкого вида *Adonis wolgensis* Stev. / Н.Н. Бельтюкова и др. // Современные научные исследования и разработки. 2018. № 08(25). С. 26-29.

3. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // *Plant Molecular Biology*. 1985. Vol. 1. № 19. – P. 69-76.
4. Нечаева Ю.С., Бельтюкова Н.Н., Пришневская Я.В. и др. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края // *Материалы междунар. конф. «Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование»*. Пермь, 2011. С. 278–282.
5. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно–генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // *Материалы 4 Моск. междунар. конгресса*. М.: Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2007. Ч. 2. С. 121.

ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ *ACE*, *NOS3* И *PPARGC1A* У ЕДИНОБОРЦЕВ С РАЗНОЙ СПОРТИВНОЙ УСПЕШНОСТЬЮ

Вострикова А.В.^{1,2}, Гребёнкина Е. И.¹, Ситникова Е.А.¹, Степанова О.А.¹, Боронникова С.В.¹

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России, Пермь, Россия

Аннотация. Цель – выявление взаимосвязи полиморфных вариантов генов *ACE*, *PPARGC1* и *NOS3*, ассоциированных с выносливостью, у занимающихся единоборствами спортсменов с разной спортивной успешностью, с использованием ПЦР. В зависимости от спортивной квалификации 100 единоборцев в возрасте от 10 до 16 лет были распределены на две группы. Анализ взаимосвязи между аллельными вариантами генов у единоборцев и их спортивной квалификацией установил достоверно значимые отличия для генотипа G/G гена *NOS3*, генотипов Gly/Gly и Gly/Ser гена *PPARGC1A*, а также генотипа D/D гена *ACE*.

Ключевые слова: гены *ACE*, *NOS3* и *PPARGC1A*, единоборцы, спортивная успешность.

POLYMORPHISM OF THE *ACE*, *NOS3* AND *PPARGC1A* GENES IN SINGLE COMPETITORS WITH DIFFERENT SPORT SUCCESS

Vostrikova A. V.^{1,2}, Grebenkina E. I.¹, Sitnikova E. A.¹, Stepanova O. A.¹, Boronnikova S. V.¹

¹ Perm State University, Perm, Russia

² Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

Abstract. Objective is identifying the relationship of polymorphic variants of the *ACE*, *PPARGC1* and *NOS3* genes associated with endurance in martial arts athletes with different sports success using PCR. Depending on the sports qualification, 100 martial artists aged 10 to 16 were divided into two groups. An analysis of the relationship between allelic variants of genes in combatants and their sports qualifications established significantly significant differences for the G/G genotype of the *NOS3* gene, the Gly/Gly and Gly/Ser genotypes of the *PPARGC1A* gene, and the D/D genotype of the *ACE* gene.

Keywords: *ACE*, *NOS3* and *PPARGC1A* genes, martial artists, sports success.

В современном спорте в высокой конкурентной борьбе побеждают, в основном, те спортсмены, которые наиболее предрасположены к специфическим особенностям конкретного вида спортивной деятельности [1]. Целесообразно проводить исследования генотипов спортсменов, так как при их высокой физической активности, включающей в себя физические упражнения различной направленности, имеется большая вероятность выделить генетические детерминанты, определяющие развитие какой-либо характеристики. К числу наиболее значимых факторов, определяющих физическую работоспособность, обычно относят скоростно-силовую подготовленность, а также выносливость спортсмена, уровень

развития его биоэнергетических возможностей (аэробных и анаэробных), технику выполнения упражнений, тактику ведения спортивного поединка и психологическую подготовку [2].

В единоборстве большой интерес представляют полиморфизмы таких генов, как *ACE*, *ACTN3*, *AMPD1*, *PPARG*, *PPARA*, *PPARD*, *PGC1A* (*PPARGC1A*), *NOS3*, и *BDKRB2* [3]. Основные направления генетического отбора у спортсменов – это их предрасположенность к развитию физических качеств скорость-сила и выносливость [4].

Ген *ACE* (*Angiotensin-1 Converting Enzyme*, ангиотензин-1-превращающий фермент, АПФ) картирован в локусе 17q23. У лиц с D/D-генотипом определяется максимальный уровень АПФ крови, с I/I-генотипом – уровень АПФ крови вдвое ниже, а у гетерозигот уровень фермента крови промежуточный [5]. Ген *ACE* имеет два аллеля: I и D. Обнаружение у человека аллеля I показывает на предрасположенность к развитию выносливости, а аллеля D показывает – к развитию силы и скорости реакции. Ген имеет три генотипа: I/I, I/D и D/D [6].

Ген *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) локализован в локусе 4p15.1, экспрессируется преимущественно в скелетных мышцах, миокарде, в почках [7]. Аллель Ser ассоциирован со снижением уровня экспрессии гена *PPARGC1A*, уменьшением окислительных процессов и митохондриального биогенеза, ожирением у мужчин, ведущих физически неактивный образ жизни [8]. Ген *PPARGC1A* имеет полиморфизм – Gly482Ser, аллелем силы-скорости является Ser, а выносливости – Gly. Ген имеет следующие генотипы: Gly/Gly, Gly/Ser и Ser/Ser [6].

Ген *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*, ген эндотелиальной NO-синтазы) картирован на длинном плече 7-й хромосомы (7q36) и состоит из 26 экзонов, кодирует фермент – эндотелиальную NO-синтазу, который катализирует образование окиси азота (NO) из L-аргинина. Аллель G этого гена (Glu298 или E298) является маркером предрасположенности к выполнению физических нагрузок [9]. В многочисленных исследованиях [10, 11] показана значимость соответствующих генотипов в порядке убывания для качества выносливость: G/G, G/T и T/T [12].

Сопоставление требований к двигательным способностям, предъявляемым в конкретном виде спорта, и наследственной предрасположенности спортсмена к развитию определенных физических качеств позволяет более рационально и целенаправленно организовать тренировку на определенном этапе становления спортивного мастерства [13].

Цель работы – выявление взаимосвязи полиморфных вариантов генов *ACE*, *PPARGC1* и *NOS3*, ассоциированных с выносливостью, у занимающихся единоборствами спортсменов с разной спортивной успешностью.

Молекулярно-генетический анализ проведен у 100 единоборцев, занимающихся ациклическими видами спорта в школах МБОУ ДОД «СДЮШОР по карате»; КГБУ ДО «СДЮСШОР по дзюдо и самбо»; МАУ ДО «СДЮСШОР по дзюдо и самбо» города Перми в России. Возраст испытуемых варьировал от 10 до 16 лет. К ациклическим видам спорта относятся единоборства (карате, самбо, дзюдо), в которых важное значение имеют такие физические качества как «скорость/сила» и «выносливость». Для данного исследования были избраны три гена, из которых ген *ACE*, *NOS3* и *PPARGC1A*. Аллельные варианты этих генов ассоциированы с развитием физического качества «выносливость». В соответствии со спортивной успешностью (спортивным разрядом) сформированы две группы единоборцев в зависимости от спортивной квалификации: Группа I с высокой квалификацией, включает 50 единоборцев со вторым и третьим взрослым разрядами, а также КМС и первым юношеским разрядом; среди которых 39 спортсменов мужского пола и 11 женского пола. Группа II с низкой квалификацией включает 50 спортсменов, имеющих второй и третий юношеские

разряды, а также единоборцев, еще не имеющих спортивного разряда, из которых 43 спортсмена мужского пола и 7 женского. Единоборства являются преимущественно мужскими видами спорта, поэтому в выборках преобладают лица мужского пола, а число лиц женского пола в обеих группах составляют пятую часть. Применялся лабораторный метод исследований с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР), который включал в себя определение полиморфизма генов: I/D-полиморфизм гена *ACE*, Gly/Ser-полиморфизм гена *PPARGC1A* и G/T-полиморфизм гена *NOS3*, ассоциированные с выносливостью.

Забор биологического материала (буккальный эпителий) для генетического анализа проводили с помощью соскоба эпителиальных клеток ротовой полости. От каждого спортсмена было получено добровольное согласие на забор материала.

ДНК выделяли сорбентным методом с помощью набора «Проба ГС», изготовленного компанией ООО «ДНК-Технология» (г. Протвино РФ). Концентрацию проб ДНК определяли с помощью спектрофотометра Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 «Thermo scientific» (USA) и выравняли до 5 нг/мкл. Последовательности праймеров для амплификации полиморфных локусов четырех избранных для изучения генов (табл. 1) взяты из литературных источников и синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва, Россия). К реакционной смеси добавляли 5 мкл пробы ДНК индивидуально каждого единоборца. В качестве отрицательного контроля (К⁻) в реакционную смесь добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. ПЦР для амплификации полиморфных локусов генов *ACE*, *NOS3* и *PPARGC1A* проводили по программам, соответствующим литературным источникам. Для выявления однонуклеотидных замен ампликоны инкубировали совместно с эндонуклеазой рестрикции для *PPARGC1* – MspI «Thermo Fisher Scientific» (USA). Сайт рестрикции: 5'-C↓CGG-3', 3'-GGC↑C-5'. Смесь инкубировали при 37°C [14]. Для гена *NOS3* пробы ПЦР дополнительно инкубировали совместно с эндонуклеазой рестрикции Eco24I фирмы «Thermo Fisher Scientific» (USA). Сайт рестрикции: 5'-GRGCT↑C-3', 3'-C↑YCGRG-5'. Смесь инкубировали при 37°C [15].

Таблица 1 – Праймеры для амплификации полиморфных локусов четырех генов у единоборцев

Ген / полиморфный локус	Последовательность праймеров (прямой и обратный)	Литературный источник
<i>ACE</i> / I/D	5'CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' 5'-GATGTGGCCTACACATTCGTCAGAT-3'	5
<i>NOS3</i> / G894T	5'-AAGGCAGGAGACAGTGGATGGA-3' 5'-CCCAGTCAATCCCTTTGGTGCTCA-3'	15
<i>PPARGC1A</i> / Gly482Ser	5'-GAGCCGAGCTGAACAAGCAC-3' 5'-GGAGACACATTGAACAATGAATAGGATTG-3'	14

Примечание: ген *ACE* (*Angiotensin-1 Converting Enzyme*) полиморфизм I/D; ген *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) полиморфизм G894T; ген *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) полиморфизм Gly482Ser

Конечные продукты полиморфных позиций анализируемых генов *ACE*, *NOS3* и *PPARGC1A* фракционировали при помощи электрофореза в 2 % агарозном геле с окраской бромистым этидием и фотографированием в системе гель-документации GelDoc XR «Bio-Rad» (USA) в проходящем ультрафиолетовом свете. ПЦР и электрофорезы повторяли не менее

трех раз. Определение длин фрагментов ДНК проводилось при помощи программы Quantity One 4.6.2 «Bio-Rad», (USA) с использованием маркера молекулярной массы (50 bp DNA Ladder); ООО «СибЭнзим-М» (г. Москва РФ).

Анализ полученных данных проводился с использованием программы STATISTICA 6.0 с определением нормальности распределения. Сравнение несвязанных выборок (генотипы спортсменов между Группой I с высокой квалификацией и Группой II с низкой квалификацией) осуществлялось критерием Фишера, F-критерий Фишера стандартный равен 1,96 (при $p = 0,05$).

Анализ частоты более благоприятного для развития физического качества «выносливость» генотипа I/I гена *ACE* (табл. 2) показал незначимые различия ($F_{оп} 1,20 < 1,96$ при $p = 0,05$) между Группой I с высокой квалификацией (частота 0,16) и Группой II с низкой квалификацией (частота 0,08). Однако генотип D/D в Группе II встречается достоверно чаще, чем в Группе I ($F_{оп} 2,14 > 1,96$ при $p = 0,05$).

Таблица 2 – Частоты генотипов генов *ACE*, *NOS3*, *PPARGC1A* у единоборцев города Перми с разной квалификацией (n=100)

Ген	Генотипы	Частоты генотипов в группах спортивной квалификации		Всего (100 человек)	$F_{оп} < F_{ст}$
		Группа I (высокая квалификация, 50 человек)	Группа II (низкая квалификация, 50 человек)		
<i>ACE</i>	I/I	0,16 (8)	0,08 (4)	0,12 (12)	1,20 < 1,96
	I/D	0,50 (25)	0,36 (18)	0,43 (43)	1,36 < 1,96
	D/D	0,34 (17)	0,56 (28)	0,45 (45)	2,14 > 1,96
<i>NOS3</i>	G/G	0,12 (6)	0	0,06 (6)	3,39 > 1,96
	G/T	0,30 (15)	0,26 (13)	0,28 (28)	0,43 < 1,96
	T/T	0,58 (29)	0,74 (37)	0,66 (66)	1,63 < 1,96
<i>PPARGC1A</i>	Gly/Gly	0,80 (40)	0,58 (29)	0,68 (68)	2,32 > 1,96
	Gly/Ser	0,14 (7)	0,36 (18)	0,25 (25)	2,50 > 1,96
	Ser/Ser	0,06 (3)	0,06 (3)	0,06 (6)	0,71 < 1,96

Примечание: ген *ACE* (*Angiotensin-1 Converting Enzyme*) полиморфизм I/D; ген *NOS3* (*Nitric Oxide Synthase 3*) полиморфизм G894T; ген *PPARGC1A* (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*) полиморфизм Gly482Ser; Группа I – спортсмены с высокими спортивными разрядами (1 юн, 2 взр, 3 взр, КМС); Группа II – спортсмены с низкими спортивными разрядами (без разряда, 2 юн, 3 юн); $F_{оп}$ – F-критерий Фишера, $F_{ст}$ – критерий Фишера стандартный равен 1,96 (при $p=0,05$); полужирным шрифтом выделены значимые отличия

Отличия по генотипу G/G гена *NOS3*, ассоциированному с физическим качеством «выносливость», между Группой I с высокой квалификацией и Группой II с низкой квалификацией оказались значимыми ($F_{оп} 3,39 > 1,96$ при $p = 0,05$). Также менее благоприятный генотип T/T найден не значительно, но больше в Группе II с низкой квалификацией ($F_{оп} 1,63 < 1,96$ при $p = 0,05$).

Анализ генотипов гена *PPARGC1A* показал значимые различия по благоприятному генотипу Gly/Gly ($F_{оп} 2,32 > 1,96$ при $p = 0,05$). В Группе I с высокой квалификацией с данным генотипом определено 40 спортсменов (частота 0,80), при этом в Группе II – 29 человек

(частота 0,58). Кроме этого, определены значимые различия по генотипу Gly/Ser ($F_{оп} 2,50 > 1,96$ при $p=0,05$). Число спортсменов по данному генотипу преобладает в Группе II – 18 человек (частота 0,36) по сравнению с Группой I – 7 единоборцев (частота 0,14). При этом спортсменов с неблагоприятным генотипом Ser/Ser оказалось одинаковое число в обеих группах: по три спортсмена (частота 0,06).

Полученные данные доказывают, что в процессе отбора отсеиваются спортсмены с неблагоприятными генотипами, так как у них не формируется выносливость в нужной для занятий единоборствами степени. Это происходит по многим причинам, одной из которых является их низкая работоспособность, обусловленная генетически, и долгое время восстановления после тренировки. Данные генетического анализа будут полезны в процессе подготовки единоборцев в спортивных школах, так как на их основе можно составлять индивидуальные программы подготовки с учетом генотипа и особенностей физической подготовки конкретного спортсмена [12].

Библиографический список

1. Ridderstrale M., Johansson L.E., Rastam L., et al. Increased risk of obesity associated with the variant allele of the PPARGC1A Gly482Ser polymorphism in physically inactive elderly men // *Diabetologia*, – 2006. – Vol. 49. – N 3. – P. 496–500.
2. Kambouris M., Ntalouka F., Ziogas G., Maffulli N. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance // *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*. – 2012. – Vol. 6 – №3. – P. 229–239.
3. Rogozkin V. A., Назаров И. Б., Казаков В. И. Генетические маркеры физической работоспособности человека // *Теория и практика физической культуры*. – 2000. – № 12. – С. 34–36.
4. 4 Вострикова А. В., Боронникова С. В., Закиров Р. М. Молекулярно-генетический анализ генов *ACTN3* и *AMPD1* у дзюдоистов спортивной школы по самбо и дзюдо «Витязь» г. Перми // *Бюллетень науки и практики*. – 2020. – №4. – С. 27–36
5. Williams R.P. *Biochemical individuality: The basis for Genotrophic concept*. – New York, – 2005. – 327 p.
6. Ахметов И.И. Молекулярная генетика спорта: состояние и перспективы // *Педагогико-психологические и медико-биологические проблемы физической культуры и спорта*. – 2007. – № 5. URL: http://kamgifik.ru/magazin/n5_0407.htm (дата доступа – 19.04.2022).
7. Finck, B. N. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease / Finck B. N., Kelly D. P. // *J. Clin. Invest.* — 2006. — Vol. 116. — P. 615–622.
8. Lehman J. J., Barger P. M., Kovacs A. PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) promotes cardiac mitochondrial biogenesis // *J. Clin. Invest.* — 2000. — Vol. 106. — P. 847–856.
9. Eynon N., Meckel Y., Alves A.J., Yamin C., Sagiv M., Goldhammer E., Sagiv M. Is there an interaction between PPAR δ T294C, PPARGC1A Gly482Ser polymorphisms and endurance performance? // *Exp. Physiol.* – 2009. – Vol. 94. – P. 1147-52.9. Finck B.N., Kelly D.P. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease // *J. Clin. Invest.*, – 2006. – Vol. 116. – P. 615–622.
10. Braun A., Kammerer S., Arnold N., Roscher A.A. The Human Bradykinin B2 Receptor Gene: Full-Length cDNA, Genomic Organization and Identification of the Regulatory Region // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1995. – Vol. 211. – P.226–233.

11. Wolfarth B., Rankinen T., Muhlbauer S., et al. Association between a beta2-adrenergic receptor polymorphism and elite endurance performance // *Metabolism*, – 2007. – Vol. 56, – N 12. – P. 1649–1651.
12. Макарова Г. А. Спортивная медицина. М.: Советский спорт. – 2003. – С. 9.
13. Скорина А.А. Врублевский Е.П., Врублевская Л.Г. Организация подготовки юных дзюдоистов с учетом данных генетического анализа // *Наука и спорт: современные тенденции*. Полесский государственный университет, Пинск, Беларусь, – 2015. – Том 6. – № 1. – С 56–60.
14. Rigat B., Hubert C., Corvol P., Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1) // *Nucleic Acids Research*. – 1992. – Vol. 20 – №6. – P. 1433.
15. Gomez-Gallego F., Ruiz J. R., Buxens A., et al. The -786 T/C polymorphism of the NOS3 gene is associated with elite performance in power sports // *Eur. J. Appl. Physiol*. – 2009. – Vol. 107. – P. 565–569.

ИНТРОДУКЦИЯ РАСТЕНИЙ В ТАТАРСТАНЕ

Галиакберова В.Н., Архипова Н.С., Шимкович Е.Д.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. В статье обращается внимание на необходимость разработки прогноза успешности интродукции растений Татарстана.

Ключевые слова: интродукция растений, флора Татарстана, растительность.

INTRODUCTION OF PLANTS IN TATARSTAN

Galiakberova V.N., Arkhipova N.S., Shimkovich E.D.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Kazan (Volga Region) Federal University», Kazan, Russia

Abstract. The article draws attention to the need to develop a forecast for the success of the introduction of plants in Tatarstan.

Keywords: introduction of plants, flora of Tatarstan, vegetation.

Интродукция растений возникла при развитии земледелия. Она связана с выращиванием растений, всегда была целенаправленным действием и опиралась на полученные научные знания [5]. Майр [9] высказал теоретическое предположение о том, что растения могут быть интродуцированы из своего естественного ареала в районы с аналогичным климатом. Эти районы он назвал климатическими аналогами. В. П. Малеев [7] проведя анализ подходов, используемых в интродукции растений – климатических и фитогеографических – предлагает использовать их комбинирование. Среди климатических он различает метод климатических аналогов Майра и метод лимитирующих факторов. Методы фитогеографические основываются на сходстве видового состава и сходстве типов растительности.

Однако В. П. Малеев [7] отмечает, что в этих методах много общего, т. к. они основаны на сходстве между территориями по признакам географического масштаба. И продолжая мысли В. П. Малеева, можно сказать, что характеристика территорий имеет определенные географические признаки, которые можно выразить через типы растительности, климатические характеристики и др., а сходные типы растительности будут иметь сходные климатические характеристики [9].

Таким образом, под климатическими аналогами Майра мы понимаем регионы со схожими диапазонами лимитирующих факторов [9]. И. Ю. Коропачинский с соавторами [5] для целенаправленной интродукции растений вводит понятие района-донора, под которым понимаются регионы климатические аналоги и регионы, характеризующиеся более экстремальными значениями лимитирующих факторов.

В республике Татарстан интродукция ведётся в ботаническом саду Казанского университета, Зооботаническом саду Казани, созданном в 1806 году, но, к сожалению, древесных интродуцентов здесь сохранилось мало. В 25 км от Казани находится Волжско-Камский заповедник. Он был заложен в 1921 году Н.К. Веховым.

Вполне естественно авторы приходят к заключению что, необходимо сначала изучить эти технологии и сорта в условиях Татарстана, а затем рекомендовать их фермерам в производство [1].

Поиски способов достоверного прогноза успешности интродукции растений природной флоры в конкретную флористическую область или природно-климатический район до работ Н.И. Вавилова [2] по географической изменчивости растений и растений в более северные районы нашей страны не выходили за рамки аналогий (климатических, флористических, экологических и других).

В вопросе прогнозирования успешности интродукции растений Н.И. Вавилов особое значение придавал прямым географическим опытам, указывая при этом на то: «чтобы уверенно определить пригодность культуры, вида или сорта нужен прямой опыт [цит. из 2 С. 548].

Это высказывание академика Н.И. Вавилова особенно актуально в наше время, при массовом завозе в условия Республики Татарстан видов, сортов и высокоурожайных гибридов для повышения урожайности сельскохозяйственных культур в новых для этих растений условиях республики.

Для интродуцентов культурной флоры, обладающими особо ценными полезными качествами (высокая урожайность и высокое качество продукции) весьма важным моментом при выращивании этих растений в новых условиях обитания является сохранение, а возможно и увеличение продуктивности и урожайности при соблюдении определённых технологий выращивания применительно для конкретных сортов и гибридов.

Учёт климатических, флористических, экологических и фитоценологических аналогов существенно дополняют эколого-интродукционный анализ и повышают достоверность интродукционного прогноза.

Информация о биологических, экологических, фенологических и физиологических свойствах растения в процессе интродукционного эксперимента крайне необходима для оценки практической значимости интродуцентов и разработки проблем сохранения генетического фонда растений и особенно прогноза успешности исхода самого интродукционного эксперимента.

Знание действия каждого экологического фактора в применении к земледелию позволяет проводить каждый агротехнический прием и всю их совокупность (пахоту, посев в благоприятное время и на оптимальную глубину, полив и рыхление почвы, внесение удобрений и т.д.) экологически грамотно, что позволяет агроному получать максимум урожая в конкретных условиях выращивания конкретной агрокультуры.

При оценке успешности интродукции растений природной флоры Татарстана особое внимание следует обратить на регулярность (не менее трёх лет эксперимента) семенного возобновления самосево, особенности возобновления ежегодно. Различная способность интродуцентов к возобновлению и выживаемости самосева в конкретных условиях среды мы считаем одним из основных показателей успешности интродукционного эксперимента. Конкурентная способность к сорным травам и другим аборигенным видам в условиях интродукции и степень успешности интродукции имеют высокую степень корреляции [3].

Эколого-исторический метод в интродукции растений не всегда может дать положительный ответ на вопрос о возможности культуры того или иного вида в определённом природном районе, хотя он вполне приемлем для объяснения реакции интродуцента на новые условия обитания, отличающихся от природных.

Н.И. Вавилов [2] в вопросе прогнозирования успешности интродукции растений особое значение придавал прямым географическим опытам. Экологическая приуроченность растений и их ассоциаций к определенным условиям среды иногда оказывается весьма консервативным признаком, обусловленным развитием в течение длительного времени в специфической мало изменяющейся среде.

Растения водоёмов, мокрых солончаков, песков, гипсов – яркий пример экологической консервативности. Если все виды рода или даже семейства строго приурочены к специфическим одинаковым условиям обитания, надеяться на успех интродукции этих таксонов в новую экологическую обстановку в большинстве случаев не реально.

Наоборот, при лабильности признака экологической приуроченности, на что всегда указывает экологическая характеристика близких видов, можно с гораздо большей уверенностью надеяться на успех при интродукции растений. Предварительное изучение экологической лабильности всех представителей таксона и, особенно, систематически близких единиц позволяет с большой степенью вероятности прогнозировать успех интродукции в иные условия среды. Однако, для повышения точности прогноза необходим интродукционный эксперимент [2].

Эколого- интродукционный метод изучения растений основных типов растительности Татарстана – комплексной метод, он органически входит в группу методов экспериментального изучения флоры и растительности. Суть его заключается в привлечении в эксперимент видов характерных каждому типу растительности. И прежде всего, эдификаторов и доминантов, а также других видов свойственных данным типам растительности [3]. Комплексность эколого- интродукционного метода заключается в привлечении и использовании смежных ботанических дисциплин: ботанической географии, геоботаники, экологии, физиологии, морфологии, анатомии и др. Современный уровень интродукционного изучения растений эколого–интродукционным методом предполагает получение максимума информации о свойствах и поведении растительного организма в новых условиях обитания. Следовательно, разделение и изучение растений их по сумме свойств помогает вскрыть закономерности филогенетического порядка.

Эколого- интродукционный метод предполагает выявление «суммы свойств» вида, являющихся «сгустком» их истории [3].

Например, многие виды и роды семейства маревых – эдификаторы и доминанты галофильной растительности Татарстана. При этом совершенно разные таксоны этого семейства сходны по физиологическим особенностям и экологически принадлежат к группе соленакопляющих галофитов (саксаул, сарсазан, поташник, шведка и др.). Многие адаптации вида, обусловленные филогенетически и не очень заметные в местах естественного обитания, зачастую ярко выявляются в интродукционном эксперименте, в условиях резко отличных от естественных, при устранении конкуренции других видов или частичном ослаблении её.

Привлекая в интродукцию эдификаторы, из фитоценозов различных типов растительности Татарстана, мы вправе ожидать адекватную реакцию на новые условия обитания. Это особенно важно для выявления возможностей культивирования эндемичных и реликтовых, редких и исчезающих видов растений природной флоры Татарстана.

По реакции интродуцентов на искусственно измененные условия обитания (резкое ослабление конкуренции, выравненность эдафических условий и т.д.) мы выявляем потенциальные интродукционные возможности того или иного вида природной флоры Татарстана.

Интродукция вида может быть полезной, когда вид занимает пустующую экологическую нишу и включается в биогеоценозы принося только пользу, но она может вызвать непредсказуемые экологические катастрофы. Интродуцированные виды способны существенно изменить сложившуюся экосистему региона и стать причиной значительного сокращения или даже вымирания отдельных видов местной флоры и фауны. Такую интродукцию часто называют биологическим загрязнением, а введенные виды инвазивными.

Библиографический список

1. Афонин А.Н., Соколова Ю.В. Эколого–географический анализ и моделирование распространения биологических объектов с использованием ГИС. Учебное пособие. СПб: ВВМ. 2018. 114 с.
2. Вавилов Н.И. Избранные труды. В 5 т. Т. 5. Проблемы происхождения, географии, генетики, селекции растений и агрономии. М., Л.: Наука, 1965. 786 с.
3. Егоров А.А., Афонин А.Н. Эколого–географический потенциал ели сизой (*Picea glauca* (Moench) Voss, Pinaceae) и возможность ее интродукции в Северную Евразию // Журнал общей биологии. Т. 78 (1). 2017. С. 67–76.
4. Егоров А.А., Афонин А.Н. Современные технологии эколого–географического анализа и моделирования в интродукции растений // Ботаника в современном мире. Труды XIV съезда «Ботаника в современном мире» (г. Махачкала, 18–23 июня 2018 г.). Т. 2. Махачкала. 2018. С. 255–257.
5. Карпун Ю.Н. Основы интродукции растений // Hortus botanicus. 2. 2004. С. 17–32.
6. Коропачинский И.Ю., Встовская Т.Н., Томошевич М.А. Очередные задачи интродукции древесных растений в Азиатской России // Сибирский экологический журнал. Т. 18 (2). 2011. С. 147–170.
7. Малеев В. П. Теоретические основы акклиматизации. Л.: гос. изд–во колх. и совх. лит. 1933. 160 с.
8. Egorov A.A., Afonin A.N. Ecogeographical potential of the white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss, Pinaceae), and the possibility of its introduction into Northern Eurasia // Biology Bulletin Reviews. 2018. Vol. 8 (3). P. 203–211.
9. Mayr H. Waldbau auf naturgeschichtlicher Grundlage. Berlin: Verlagsbuchhandlung Paul Parey. 1909. 568 p.

МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ПОРТУЛАК ОГОРОДНЫЙ (*PORTULACA OLERACEA* L.)

Дробышева А. А.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация: Актуальным направлением в развитии современной науки является изучение отечественной сырьевой базы и расширение списка фармакопейных растений, из числа видов, широко применяемых в народной медицине. Одним из них может стать портулак огородный, известное сорное растение. Данная работа посвящена ботаническому описанию портулака огородного и изучению макроскопических признаков травы портулака, как возможного лекарственного сырья.

Ключевые слова: портулак огородный, трава, макроскопический анализ.

MACROSCOPIC EXAMINATION OF PURSLANE GRASS VEGETABLE GARDEN (*PORTULACA OLERACEA* L.).

Drobysheva A. A.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. The current direction in the development of modern science is the study of the domestic raw material base and the expansion of the list of pharmacopoeia plants from among the species widely used in folk medicine. One of them may be purslane, a well-known weed plant. This work is devoted to the botanical description of garden purslane and the study of macroscopic signs of purslane grass as a possible medicinal raw material.

Keywords: vegetable purslane, grass, macroscopic analysis.

Портулак огородный (*Portulaca oleracea* L.), растение семейства Портулаковые (Portulacaceae), распространен во многих регионах земного шара с тёплым климатом. На территории России произрастает на юге европейской части, на Кавказе и на Дальнем Востоке [1]. Благодаря широкому географическому распространению и неприхотливости, портулака его лечебные свойства упоминаются во многих научных и медицинских трудах, начиная со второго века нашей эры. Изучение литературных данных показало упоминание этого растения и его лечебных свойств в трудах Галена, Гиппократ, Теофраста, Плиния и Одо из Мена [2]. Впервые описал терапевтическую активность портулака огородного Ибн Сина. Основным лекарственным растительным сырьем, врач считал семена. Именно в них находятся наибольшее количество биологически активных веществ. Ибн Сина предлагал применять портулак как жаропонижающее, эффективное болеутоляющее, кровоостанавливающее, желчегонное, мочегонное средство [3]. Арабские врачи использовали траву портулака

огородного в лечении сахарного диабета. В Китае в основном применяли как противовоспалительное и мочегонное, а также при инфекциях половых путей.

Портулак огородный является космополитом. Произрастет на хорошо увлажненных местообитаниях. У многих народностей используется как пищевое растение, часто называется «овощем, продлевающим жизнь».

Согласно литературным данным портулак огородный содержит большое количество БАВ, здесь обнаружены флавоноиды, каротиноиды, гормоны, органические кислоты, терпеноиды, различные макро- и микроэлементы, витамины и антиоксиданты [4]. Это позволяет применять растение в народной медицине при многих заболеваниях и недугах. В настоящее время проведены исследования, которые обнаружили наличие противовоспалительного, антиоксидантного, антибиотического, иммуномодулирующего, противоартритного, антидиабетического, нейропротекторного, гепатопротекторного, антигиперлипидемического, нефропротекторного, слабительного свойств [2].

В современной официальной медицине, лекарственное растительное сырье портулака огородного практически не используется, из-за недостаточности научно-обоснованных данных о химическом составе и нормативной документации на проведение полного фармакогностического анализа. Последние исследования активности как минеральных, так и химических веществ находят терапевтическую значимость при исследовании портулака как лекарственного растительного сырья для изготовления препаратов и средств аптечного и фармацевтического изготовления [3].

Объектом исследования является трава портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.), собранная на территории г. Волгограда, в окрестностях кафедры фармакогнозии и ботаники ВолгГМУ в сентябре 2022 г.

Портулак огородный однолетнее растение (терофит), имеет симподально ветвящийся стебель 10-35 см длиной, распростертый, чаще прижатый к земле или приподнимающийся, ветвистый от основания, округлый в сечении (рисунок). Корневая система стержневая, слаборазветвленная.



Рисунок - Портулак огородный. Внешний вид растения.

Цельная трава представляет собой облиственные побеги, с цветами и плодами различной степени зрелости. Стебель гладкий, мясистый, с продольными бороздами, цвет варьируется от ярко-кирпичного до темно-коричневого. Листья очередные, верхние почти супротивные, клиновидно-обратно-овальные, продолговато-клиновидные, лопатчатые, тупые, к основанию суженные, мясистые, короткочерешковые. Черешок крыловидный 1-2 мм длиной. Жилкование перистое. Размер листовой пластинки от 8 мм до 2,7 см (средний) – 1,8 см; ширина в средней части от 7 мм до 1,3 см (средняя) – 0,9 см. Цвет от светло-зеленого, до темно-зеленого, светло-коричневого по краям. Прилистники пленчатые, часто редуцированы до мелких щетинок. Цветки одиночные или пучками по 2-3, сидящие в разветвлениях стебля или в пазухах листьев, 8-12 мм в диаметре. Завязь полунижняя. Чашелистики в числе двух наверху тупые с колпачковидной верхушкой, передние более крупные и охватывают задние, при плодах опадающие. Лепестков 4-6 обратно яйцевидной формы; желтые, рано опадающие, столбик с линейными рыльцами глубоко разделён на 3-6 ветвей, тычинок 6-15. Плод ценочкарпный, яйцевидная или кругловатая коробочка 5-8 мм длиной, одногнездная, раскрывается поперек, крышечкой. Крышечка светло-зеленая, длина – 2,1 мм, ширина – 2 мм. Семена многочисленные, почковидные, тупобугорчатые, блестящие, размером в длину и ширину около 1 мм, от темно-коричневого до черного цвета. Запах слабый, травянистый. Вкус слизистый, кислый.

В настоящее время все больше проводятся исследования на выявление не только БАВ портулака, но и непосредственное их действие на организм. Согласно литературным данным, проводятся клинические рандомизированные, и плацебо-контролируемые исследования на лабораторных животных [1]. Предполагается исследовать траву портулака для изучения нейропротективного, миорелаксирующего, антигипоксического, бронхорасширяющего, антиоксидантного эффекта (был найден олерацеин Е, который способен предупреждать развитие болезни Паркинсона) и предупреждения физической усталости, ингибирования процесса остеокластогенеза [2]. Что делает макро- и микроскопическое исследование портулака огородного актуальным и перспективным в изучении свойств растения с широким спектром действия. В последующем планируется изучение микродиагностических признаков травы портулака и количественного анализа БАВ для возможной разработки нормативной документации.

Библиографический список

1. Кароматов И.Д., Абдухалилова М.Х.К. НОВАЯ ЖИЗНЬ В МЕДИЦИНЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ ПОРТУЛАК ОГОРОДНЫЙ// Биология и интегративная медицина. 2017. № 6. С. 211-230.
2. Фарходов Ф.Ф., Убайдуллаев К.А., Дусматов А.Ф. ОПРЕДЕЛЕНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО СОСТАВА ТРАВЫ ПОРТУЛАКА ГОРОДНОГО (*PORTULACA OLERACEA L.*)// Science Time. 2019. № 2 (62). С. 67-71.
3. Глеубаева М.И., Датхаев У.М., Абдуллабекова Р.М. *PORTULACA OLERACEA L.* В МЕДИЦИНЕ// В сборнике: Сборник материалов международных научно-практических конференций. 2018. С. 144-154.
4. Глеубаева М.И., Еркасымова А.Е., Ишмуратова М.Ю., Датхаев У.М., Абдуллабекова Р.М. ПРИМЕНЕНИЕ В НАРОДНОЙ МЕДИЦИНЕ ПОРТУЛАКА ОГОРОДНОГО // Фармация Казахстана. 2019. № 11. С. 43-47

5. Нассер Р.А. Фармакогностическое исследование портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.) 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия// Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук. М.: – 2021, С. 211.
6. Баймурадов Р.Р., Тогбоев К.Т. ЗНАЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ ПОРТУЛАК ОГОРОДНЫЙ ПРИ МЕТАБОЛИЧЕСКОМ СИНДРОМЕ// Биология и интегративная медицина. 2019. № 2 (30). С. 175-183.
7. Нассер Р.А., Никулин А.В., Потанина О.Г. СОДЕРЖАНИЕ ФЛАВОНОИДОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ PORTULACA OLERACEA L// В сборнике: Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. Сборник научных трудов Международной научной конференции. М.: 2020. С. 245-250.

ВСТРЕЧАЕМОСТЬ *ACER NEGUNDO* В МЕСТООБИТАНИЯХ ЕКАТЕРИНБУРГА И ПРИЛЕГАЮЩИХ ТЕРРИТОРИЙ

Дубровин Д.И., Золотарева Н.В., Подгаевская Е.Н., Пустовалова Л.А., Коржиневская А.А., Дубровина Д.П., Веселкин Д.В.

Институт экологии растений и животных УрО РАН, Екатеринбург, Россия

Аннотация. На основании анализа 1034 геоботанических описаний оценена встречаемость инвазионного древесного растения *Acer negundo* в 11 типах урбанизированных и неурбанизированных местообитаний. Установлено, что данный вид обладает высоким потенциалом к расселению в городских местообитаниях, где его встречаемость достигает 77%, и меньшим – в загородных (до 19%). Наиболее подверженными инвазии оказались пойменные местообитания, наименее подверженными – болота.

Ключевые слова: инвазии растений, биоразнообразии, инвазительность, местообитания, урбанизация.

THE OCCURRENCE OF *ACER NEGUNDO* IN HABITATS OF YEKATERINBURG AND SURROUNDING TERRITORIES

Dubrovin D.I., Zolotareva N.V., Podgaevskaya E.N., Pustovalova L.A., Korzhinevskaya A.A., Dubrovina D.P., Veselkin D.V.

Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russia

Abstract. Based on 1034 vegetation description analysis, we assessed the occurrence of alien invasive plant *Acer negundo* in 11 different urbanized and rural habitats in the city of Yekaterinburg and around it. We found, that this species has increased dispersal potential in urbanized habitats, where its occurrence reaches up to 77%. In rural habitats, its occurrence is less and reaches up to 19%. Floodplain habitats were the most susceptible to invasion, and swamp habitats were the least susceptible.

Keywords: Ash-leaved maple, anthropogenic disturbances, urbanization, plant communities invasibility.

Для определения степени трансформированности разных типов местообитаний и сообществ в результате проникновения чужеродных и инвазионных растений проанализировали встречаемость североамериканского клена ясенелистного (*Acer negundo* L.) в урбанизированных и неурбанизированных местообитаниях в Екатеринбурге и его окрестностях.

Acer negundo – дерево высотой до 20(25) м и диаметром ствола до 90(100) см. Нативный ареал охватывает Северную Америку от Скалистых гор до Атлантического побережья и от

Канады до Флориды, растет в пойменных, мезотрофных лиственных и хвойных лесах, в дубовых редколесьях, в прериях, на полях и болотах [1]. Во вторичном ареале заселяет прибрежные фитоценозы, мезофитные и сосновые леса, занимает нарушенные и полустественные местообитания [2, 3]. *A. negundo* проявляет признаки вида-трансформера: в частности, в сообществах с его доминированием отмечаются повышенное затенение [4] и влажность почвы [5]. В сообществах с его доминированием отмечается меньшее α - и γ -разнообразие трав [6, 7]. Установлено, что высокая сомкнутость крон – реальный действующий механизм влияния клена на богатство напочвенного растительного покрова [8].

Использованы данные 1034 геоботанических описаний, выполненных в 11 типах местообитаний (болота; петрофитные местообитания [местообитания на вершинах увалов с выходами горных пород]; обочины дорог; луга [травяные сообщества с относительно сомкнутым покровом, в котором доминируют злаки]; хвойные леса; отдельно – искусственные посадки хвойных деревьев; лиственные леса, включая небольшие куртины лиственных деревьев; поймы, включая как безлесные участки, так и участки с доминированием разных видов деревьев; пустыри – сильно нарушенные и нарушаемые участки рудеральной растительности, как правило, на искусственных субстратах; дворы жилых домов; скверы [искусственные насаждения с рекреационными функциями в черте города]). Проанализированы 583 описания, выполненных в черте г. Екатеринбурга, и 451 описание, выполненное на территории в радиусе 60 км от Екатеринбурга.

Встречаемость – доля описаний, в которых отмечен *A. negundo*, от общего числа описаний.

Средняя встречаемость *A. negundo* во всем массиве описаний составила 39%. Встречаемость *A. negundo* значительно выше в городских местообитаниях (62%), по сравнению с загородными (10%). В крупном городе, каким является Екатеринбург, наименее подвержены вторжению *A. negundo* болотные местообитания, где его встречаемость составила 14%. В других типах городских местообитаний встречаемость клена варьировала от 45% на лугах до 77% в поймах (рисунок). Во всех городских местообитаниях, даже на болотах (!), встречаемость *A. negundo* статистически выше нулевой, о чем свидетельствует отсутствие пересечений доверительных интервалов величин встречаемости с нулевыми значениями.

Единственный тип местообитаний, где *A. negundo* не зарегистрирован, – загородные болота. Для остальных типов местообитаний за городом его встречаемость варьировала от 3% в лиственных лесах до 19% в посадках лесных культур. В части загородных местообитаний (пустыри, поймы, хвойные леса и искусственные посадки хвойных деревьев) встречаемость клена была статистически выше нулевой.

Из естественных местообитаний наиболее подвержены вторжению *A. negundo* пойменные. Высокие значения встречаемости клена ясенелистного в пойменных описаниях отмечена и в городских (77%), и в загородных (14%) местообитаниях. Скорее всего, это объясняется тем, что в нативном ареале *A. negundo* занимает именно пойменные местообитания [1] и сходное сочетание факторов среды обуславливает активное заселение аналогичных местообитаний во вторичном ареале. Не исключено, что фактором активного освоения *A. negundo* пойменных местообитаний служит их периодическое нарушение во время половодий или частые нарушения антропогенного происхождения. На загородных территориях высока также встречаемость *A. negundo* в лесных культурах – в искусственных посадках хвойных деревьев. Это может объясняться сильными прошлыми (в моменты проведения рубок и создания культур) или постоянными текущими (как правило, участки

лесных культур приурочены к активно посещаемым территориям) нарушениями этих местообитаний.

О потенциально высоком (ведущем) значении фактора нарушения сообществ для распространения *A. negundo* свидетельствует его почти одинаково высокая встречаемость в большинстве типов местообитаний на урбанизированных территориях. Например, близка встречаемость *A. negundo* в таких эдафически контрастных типах местообитаний, как пойменные и петрофитные. Наши результаты свидетельствуют об отсутствии во вторичном ареале сильной экопической детерминации распространения *Acer negundo*. Вместе с тем, можно сформулировать гипотезу о значении биотического фильтра распространения *A. negundo*. В условиях урбанизации самая низкая встречаемость *A. negundo* зарегистрирована в местообитаниях с сомкнутым живым напочвенным покровом: на лугах и на обочинах дорог, где, как правило, высокое проективное покрытие травяного яруса. Определяющее значение в отсутствии клена большей части болот имеет, возможно, их удаленность от источников семян и слабая посещаемость.

Таким образом, на большом массиве эмпирических данных надежно установлено, что инвазионный *Acer negundo* обладает высоким потенциалом к расселению в городских местообитаниях, и (пока) меньшим – на территориях, не испытывающих урбанизации или с низким уровнем урбанизации. Высокая (50–75%) встречаемость *A. negundo* в городских местообитаниях свидетельствует, что в настоящее время он уже является фоновым древесным видом на урбанизированных территориях в условиях южной тайги.

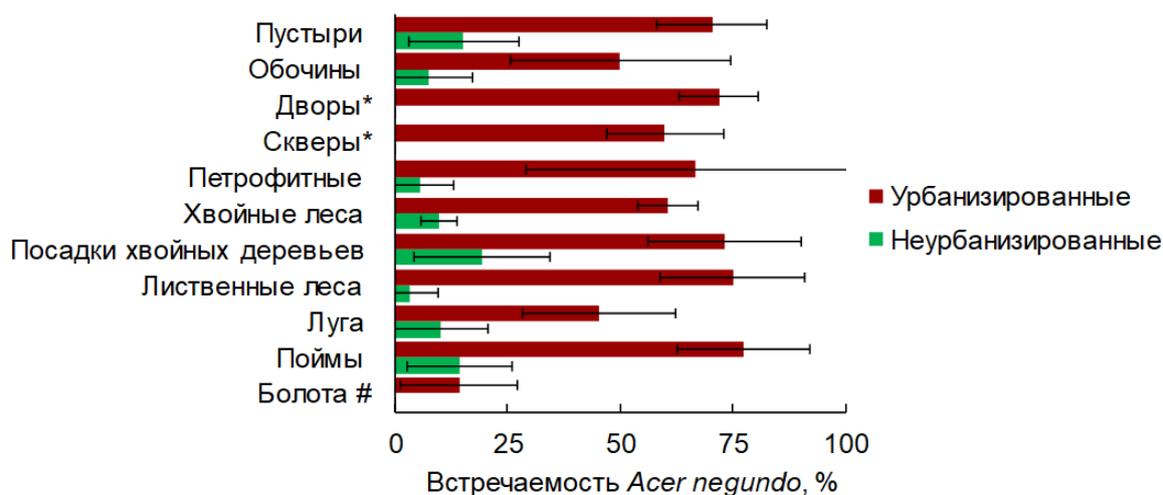


Рисунок - Доли описаний урбанизированных и неурбанизированных местообитаний, в которых отмечен инвазионный *Acer negundo*. Размахи – 95%-е доверительные интервалы для долей [9]. * – местообитания, описанные только в черте города; # – встречаемость *A. negundo* на загородных болотах равна нулю.

Для точного прогноза направлений, интенсивности и скорости расселения *A. negundo* необходимы: (1) переход от анализа встречаемости *A. negundo* к анализу показателей его обилия; (2) исследования успешности возобновления, возрастной и половой структуры ценопопуляций *A. negundo* в разных типах местообитаний и в разных условиях; (3) исследования по оценке соотношения экопического (абиотические условия) и биотического (включая оценку конкурентных и симбиотических взаимоотношений, взаимодействий с фитофагами) контроля его расселения, а также оценка взаимосвязи между нарушенностью местообитаний и расселением *Acer negundo*.

Настоящее исследование выполнено в рамках проекта РФФ № 22-24-20149.

Библиографический список

1. Fire Effects Information System (FEIS). USDA ForestService, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences laboratory [Online]. URL: https://www.feis-crs.org/feis/faces/index.xhtml?_afPfm=643C2E17A6A3897DE7A5164F7B70016B (дата обращения – 10.10.2022).
2. Дубовик Д.В., Дмитриева С.А., Ламан В.Н. и др. Черная книга флоры Беларуси: чужеродные вредоносные растения // Минск: Беларуская навука. – 2020. – 407 с.
3. Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах Средней России // М.: ГЕОС. – 2010. – Т. 2. – 512 с.
4. Veselkin D.V., Dubrovin D.I., Rafikova O.S. et al. Shading and light interception in thickets of invasive *Acer negundo* and *Sorbaria sorbifolia* // Rus. J. Biol. Invas. – 2022. – № 4. – P. 30-42.
5. Dubrovin D.I., Rafikova O.S., Veselkin D.V. Soil moisture in urbanized habitats invaded by alien *Acer negundo* // Russ. J. Ecol. – №53. – P. 347-356 (2022).
6. Veselkin D.V., Dubrovin D.I. Diversity of the grass layer of urbanized communities dominated by invasive *Acer negundo* // Rus. J. Ecol. – 2019. – V. 50. – P. 413–421.
7. Дубровин Д.И. Разнообразие урбанизированных растительных сообществ с доминированием инвазивного *Acer negundo* L. // Экология: факты, гипотезы, модели. Материалы конф. молодых ученых, 10–13 апреля 2018 г. ИЭРиЖ УрО РАН – Екатеринбург: «Резкшен». – 2018. – С. 30-33.
8. Veselkin D.V., Dubrovin D.I., Pustovalova L.A. High canopy cover of invasive *Acer negundo* L. affects ground vegetation taxonomic richness // Sci. Rep. – 2021. – V. 11. – №20758. – P. 1-12.
9. Браунли К.А. Статистическая теория и методология в науке и технике: пер. с англ. / К. А. Браунли. – М.: Наука, 1977. – 407 с.

ИНТРОДУКЦИОННОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ГЛАДИОЛУСА (*GLADIOLUS* L.) БОТАНИЧЕСКОГО САДА ИМ. А. Г. ГЕНКЕЛЯ ПГНИУ

Кинёва Ж.А., Шумихин С.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Проведено интродукционное изучение 3 видов гладиолуса (*Gladiolus* L.), в том числе 50 сортов гладиолуса гибридного. Изученные виды и сорта по направлениям использования подразделяются: для озеленения – 2 сорта *G. × hybridus* и *G. murielae*; для срезки – 17 сортов *G. × hybridus*. По срокам цветения в условиях Пермского края изученные таксоны подразделяются: ранние – 5 сортов *G. × hybridus* и *G. dalenii* subsp. *dalenii*; средние – 10 сортов *G. × hybridus* и *G. murielae*; среднепоздние – 18 сортов *G. × hybridus*; поздние – 15 сортов *G. × hybridus*.

Ключевые слова: гладиолус, интродукция, сортоизучение, Пермский край.

Introduction study of gladiolus (*Gladiolus* L.) collection in A.G. Genkel Botanical Garden, Perm State Research University

Kinyova J.A., Shumikhin S.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Introduction study of 3 species of gladiolus (*Gladiolus* L.), including 48 varieties of hybrid gladiolus has been carried out. The studied species and varieties according to the directions of use are subdivided: for landscaping – 2 varieties *G. × hybridus* and *G. murielae*; for cuttings – 17 varieties of *G. × hybridus*. The studied taxa are subdivided according to flowering dates in Perm Krai: early – 5 varieties of *G. × hybridus* and *G. dalenii* subsp. *dalenii*; medium – 10 varieties of *G. × hybridus* and *G. murielae*; medium-late – 18 varieties of *G. × hybridus*; late – 15 varieties of *G. × hybridus*.

Keywords: gladiolus, introduction, variety study, Perm Territory.

В современных условиях важнейшими задачами в области интродукции растений являются внедрение инновационных технологий, расширение используемого видового и сортового разнообразия с целью обогащения используемого ассортимента в условиях конкретного региона. При этом определяющим является комплексное изучение адаптационных и репродуктивных способностей интродуцентов, особенно в связи с влиянием факторов окружающей среды. Гладиолус (*Gladiolus* L.) – одна из самых популярных среди цветоводов и селекционеров декоративных культур. Он ценится за относительную неприхотливость к условиям выращивания, продолжительный период цветения, сортовое многообразие форм и расцветок.

Целью исследования являлось интродукционное изучение коллекции гладиолуса Ботанического сада ПГНИУ. Исследования проводились в 2022 году на базе Учебного Ботанического сада им. А.Г. Генкеля Пермского государственного национального

исследовательского университета (ПГНИУ). Город Пермь расположен в центральной части Пермского края, который входит в умеренно-холодную агроклиматическую зону [1], со средней температурой июня +15,6°C, июля +18,3°C и августа +15,2°C. Почва экспериментального участка темно-гумусовая искусственного происхождения, влагоемкая, хорошо структурированная. Агрофон участка выровненный.

Материалом для исследования служила коллекция гладиолуса Учебного Ботанического сада ПГНИУ. Коллекция рода гладиолус – одна из самых представленных коллекций декоративных культур Ботанического сада. Её формирование началось в 2000 г. Коллекция включает 6 видов: *G. tenuis* Bieb. (триплоидная и тетраплоидная формы), *G. murielae* Kelway, *G. dalenii* Van Geel *subsp. dalenii*, *G. palustris* Gaudin, *G. illyricus* W.D.G Koch, *G. × hybridus* hort. Коллекция гладиолуса гибридного представлена 169 сортами. Для исследования были выбраны 50 сортов гладиолуса гибридного (*G. × hybridus* hort.) отечественной и зарубежной селекции, а также *G. murielae* Kelway, *G. dalenii* Van Geel *subsp. dalenii*.

Интродукционное изучение проводили по методическим рекомендациям, описанным И.Ф. Сацыперовой, А.М. Рабиновичем [2] и Г.П. Семёновой [3]. Сортоизучение и оценку культиваров гладиолуса при интродукции в Пермском крае проводили по общепринятой методике В.Н. Былова [4]. При этом описывали фенологию, декоративные и хозяйственно-важные признаки образцов. Наблюдение за ритмикой сезонного развития проводили по методике Р.А. Карпионовой [5].

Изучение коллекции сортов гладиолуса гибридного по признаку диаметр цветка в условиях Пермского края показало, что 14 сортов из 50 изученных относятся к среднецветковым (9–11,5 см), 26 – к крупноцветковым (11,5–14 см), 10 – к гигантским (от 14 см). По признаку высоты растений 33 из 50 изученных сортов являются среднерослыми (120–150 см), 13 слаборослыми (100–120 см), 1 – сильнорослым (свыше 150 см) и 3 – низкорослыми (до 100 см). По признаку длины соцветия 3 сорта гладиолуса вошли в группу с длинными соцветиями (70–90 см), 15 сортов – в группу с короткими соцветиями до 50 см, остальные 32 сорта относятся к группе с средними значениями данного признака (50–70 см). Количество цветков в соцветии у изученных сортов варьирует от 9 до 21 (в среднем 15,12±0,41 цветков), одновременно в соцветиях открыто от 3 до 10 цветков (в среднем 6,15±0,19 цветков).

Среди исследованных сортов гладиолуса, 5 сортов гладиолуса гибридного и *G. murielae* имели белую окраску: ‘Звездный Блеск’, ‘Седой Урал’, ‘White Friendship’, ‘Дмитрий Солунский’, ‘Князь Серебряный’; 4 сорта жёлтую окраску: ‘Golden Wave’, ‘Селенит’; ‘Голден Иарс’; ‘Promenade’; 4 сорта оранжевую окраску: ‘Профессор Паролек’, ‘Юрий Никулин’, ‘Янтарная Балтика’, ‘Майя Плисецкая’; 1 сорт лососевую окраску: ‘Лото Миллион’; 10 сортов розовую окраску: ‘Добрый День’, ‘Долгожданный Дебют’, ‘Ольга’, ‘Розовая Чайка’, ‘Профессор Александр Генкель’, ‘Резные Узоры’, ‘Суприме’, ‘Россия’, ‘Баджер Роуз’, ‘Always’; 7 сортов гладиолуса гибридного и *G. dalenii subsp. dalenii* красную окраску: ‘Дон Жуан’, ‘Конго’, ‘Эсмеральда’, ‘Джангл Флауэр’, ‘Ред Джинджер’, ‘Perless’, ‘Liesmoysais Samts’; 2 сорта малиновую окраску: ‘Гладиатор’, ‘Гладиолус-светофор’; 7 сортов фиолетовую и сиреневую окраску: ‘Лавандовая Мечта’, ‘Пермский Сувенир’, ‘Лавандер Раффлз’, ‘Блю Бьюти’, ‘Аэлита’, ‘Ольга II’, ‘Модница’; 2 сорта голубую окраску: ‘Модру Программ’, ‘Паудер Блю’; 2 сорта кремовую окраску: ‘Сказка’, ‘Уралочка’; и 4 сорта дымчатую и коричневую: ‘Конек Горбунок’, ‘Юная колдунья’, ‘Серебряный ручей’, ‘Сидарбо Гия’.

По описаниям оригинаторов согласно общепринятой классификации 22 исследованных сорта гладиолуса являются крупноцветковыми (11,5–14,0 см), 19 гигантскими (более 14,0 см), 3 средними (9–11,5 см) и 4 мелкоцветковыми (6,5–9 см). Однако в условиях Пермского края

данный признак не проявляет себя в полной мере. Максимальный диаметр цветка (15,5 см) среди исследованных сортов наблюдался у сорта 'Лото Миллион'. Изначально заявленный оригинаторами крупноцветковый класс сохраняется только у 11 сортов: 'Профессор Александр Генкель', 'Модру Программ', 'Звёздный Блеск', 'Golden Wave', 'Сказка', 'Дон Жуан', 'Майя Плисецкая', 'Профессор Паролек', 'Лавандовая Мечта', 'Баджер Роуз', 'Модница'. Также 7 сортов, такие как: 'Эсмеральда', 'Аэлита', 'Конго', 'Лото Миллион', 'Гладиолус-светофор', 'Янтарная Балтика', 'Гладиатор' сохранили классность гигантских. Такие сорта как: 'Юная Колдунья', 'Паудер Блю', 'Сидарбо Гия' меняют класс с крупноцветкового (11,5-14 см) на гигантский (от 14 см). Сорт 'Уралочка', а также *Gladiolus dalenii ssp. dalenii*, *Gladiolus murielae* меняют класс с мелкоцветкового (6,5-9 см) на средний (9-11,5 см), а сорт 'Liesmoysais Samts' с мелкоцветкового (6,5-9 см) на крупный (11,5-14 см).

Самыми низкорослыми (100-115 см) оказались сорта 'Уралочка', 'Ред Джинджер' и *Gladiolus murielae*. Данные таксоны рекомендуется использовать в целях озеленения, поскольку они не требуют подвязки к опоре. К группе сильнорослых (свыше 150 см) относится сорт 'Баджер Роуз'. Большинство изученных сортов являются среднерослыми и достигают высоты 110–150 см. Сильнорослые и среднерослые сорта мы рекомендуем использовать для выращивания на срезку как сорта выставочного типа.

Наименьшие значения по количеству цветков в соцветии (8–9 цветков) отмечены у ботанических видов *Gladiolus dalenii ssp. dalenii*, *Gladiolus murielae*, наибольшие (19–21 цветок) – у сортов 'White Friendship', 'Дон Жуан', 'Гладиолус-Светофор', 'Конёк Горбунок', 'Liesmoysais Samts'. Сорта с наибольшим количеством цветков в соцветии рекомендуются для срезки.

Природно-климатические условия Пермского края достаточно сильно влияют на отдельные признаки сортов гладиолуса гибридного, такие как высота растений, количество цветков в соцветии, количество одновременно открытых цветков в соцветии, а также на размер цветка. Особенно сильно климатические особенности сказываются на фенологических характеристиках гладиолуса. Так, только у 7 из 50 изученных сортов сроки цветения в условиях Пермского края по сравнению с данными оригинаторов не изменились, а 38 исследованных сортов зацвели позже сроков, описанных оригинаторами.

В результате проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Наибольшее количество изученных видов и сортов коллекции гладиолуса Учебного Ботанического сада ПГНИУ представлены среднерослыми (66%), крупноцветковыми (52%), со средней длинной соцветия (64%). Преобладающей окраской изученных сортов гладиолуса гибридного является розовая (20%).

2. Для получения раннего цветения в условиях Пермского края рекомендуется использование таких сортов гладиолуса гибридного, выведенных в Ботаническом саду им. А.Г. Генкеля ПГНИУ, как: 'Селенит', 'Пермский Сувенир', а также 'Баджер Роуз', 'Голден Иарс' и *Gladiolus dalenii ssp. dalenii*.

3. На срезку рекомендуется использовать 17 наиболее высокодекоративных сортов гладиолуса гибридного выставочного типа, являющихся средне- или сильнорослыми, имеющих крупные или гигантские цветки и наибольшее количество одновременно открытых цветков. К таким сортам относятся: 'Профессор Александр Генкель', 'Модру Программ', 'Звёздный Блеск', 'Golden Wave', 'Сказка', 'Дон Жуан', 'Майя Плисецкая', 'Профессор Паролек', 'Баджер Роуз', 'Модница', 'Эсмеральда', 'Аэлита', 'Конго', 'Лото Миллион', 'Гладиолус-светофор', 'Янтарная Балтика', 'Гладиатор'.

4. В целях озеленения, а также для оранжировки и составления растительных композиций рекомендуется использовать низкорослые сорта гладиолуса. К таким сортам относятся: ‘Уралочка’, ‘Ред Джинджер’, а также *G. murielae*.

Библиографический список

1. Мамаев С.А. Основные итоги и важнейшие проблемы интродукции растений на Урале // Интродукция и акклиматизация декоративных растений. 1982. С. 3-23
2. Сацыперова И.Ф., Рабинович А.М. Проект общесоюзной программы исследований по интродукции лекарственных растений // Растительные ресурсы. 1990. Т. 26, вып. 4. С. 587–59
3. Семенова Г.П. Редкие и исчезающие виды флоры Сибири: биология, охрана. Новосибирск: Гео, 2007. 408 с.
4. Былов В.Н. Основы сравнительной сортооценки декоративных растений // Интродукция и селекция цветочно-декоративных растений: сб. статей. М.: Наука, 1978. С. 7-32.
5. Карписонова Р.А. Методика фенологических наблюдений за травянистыми многолетниками в отделе флоры СССР // Методика фенологических наблюдений в ботанических садах СССР. М., 1972. С. 47–52.

БИОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ФЛОРЫ ЛИШАЙНИКОВ ПРИРОДНОГО ПАРКА «ЩЕРБАКОВСКИЙ»

Ковшарева В.С., Серебрянская В.В., Веденеев А.М.

Волгоградский государственный социально-педагогический университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Приводятся данные о биоморфологической структуре лишенофлоры природного парка «Щербаковский», жизненных формах и экологических группах лишайников.

Ключевые слова: лишенофлора, биоморфологическая структура, экологические группы, лишайники, природный парк.

BIOMORPHOLOGICAL STRUCTURE OF THE LICHEN FLORA OF THE NATURAL PARK «SHCHERBAKOVSKY»

Kovshareva V. S., Makarova V. V.

Volgograd State Socio-Pedagogical University, Volgograd, Russia

Abstract. Data on the biomorphological structure of the lichen flora of the Shcherbakovsky Natural Park, life forms and ecological groups of lichens are presented.

Keywords: lichen flora, biomorphological structure, ecological groups, lichens, natural park.

В настоящее время в нашем регионе большое количество времени уделяется на комплексное изучение и мониторинг биоты особо охраняемых природных территорий. В рамках федеральной программы «Лишайники России» вот уже несколько лет подряд экспедиционный отряд ИЕНО, ФК и БЖ нашего университета занимается изучением лишенобиоты особо охраняемых природных территорий, расположенных в нашем регионе, которой и является природный парк «Щербаковский». Общая площадь природного парка составляет 3256 га, протяженность границ 26,7 км. Основу природного комплекса составляет зональные степные сообщества. Лесные сообщества в основном представлены интразональными и искусственными насаждениями.

Нами экспедиционные выезды на данную территорию проводятся планомерно с 2006 года. В данной статье приведены результаты исследований 2022 года. В результате проведенных исследований для территории природного парка «Щербаковский» выявлен современный видовой состав лишенофлоры, спектр биоморф.

Было выявлено 59 видов лишайников из 28 родов и 11 семейств: *Bryoria subcana*, *Caloplaca citrina*, *Caloplaca decipiens*, *Caloplaca ferruginea*, *Caloplaca holocarpa*, *Candelariella aurella*, *Cetraria steppae*, *Cladonia cariosa*, *Cladonia chlorophaea*, *Cladonia fimbriata*, *Cladonia foliacea*, *Cladonia pyxidata*, *Cladonia rangiferina*, *Cladonia rei*, *Diploschistes scruposus*,

Endocarpon pusillum, Evernia mesomorpha, Evernia prunastri, Hypogymnia physodes, Hypogymnia tubulosa, Lecanora bicincta, Lecanora dispersa, Lecanora hagenii, Lecanora muralis, Lecanora varia, Melanelixia glabra, Melanelixia subargentifera, Melanohalea exasperata, Melanohalea exasperatula, Melanohalea septentrionalis, Neofuscelia pulla, Neofuscelia ryssolea, Parmelia sulcata, Parmeliopsis ambigua, Peltigera didactyla, Peltigera rufescens, Phaeophyscia nigricans, Phaeophyscia orbicularis, Physcia adscendens, Physcia stellaris, Physconia distorta, Physconia enteroxantha, Pleurosticta acetabulum, Ramalina capitata, Ramalina farinacea, Ramalina pollinaria, Rhizocarpon geographicum, Rinodina archaea, Rinodina bischoffii, Tuckermannopsis chlorophylla, Usnea hirta, Vulpicida pinastri, Xanthoparmelia camtschadalis, Xanthoparmelia loxodes, Xanthoparmelia somloensis, Xanthoparmelia subdiffluens, Xanthoria candelaria, Xanthoria parietina, Xanthoria polycarpa [5].

Часть видов, которые указывались ранее для природного парка «Щербаковский», в этом году не были обнаружены: *Acarospora fuscata, Anaptychia ciliaris, Aspicilia cinerea, Arthonia dispersa, Arthonia patellulata, Arthonia radiata, Aspicilia cinerea, Aspicilia contorta, Buellia alboatra, Buellia stigmata, Circinaria hispida, Collema minor, Diploschistes muscorum, Lobothallia alphoplaca, Physcia dubia* [1, 2].

Тем не менее мы не можем утверждать, что эти виды исчезли из лишенофлоры парка. Скорее всего, они не были обнаружены из-за недостаточного времени для обследования территории.

Наибольшее количество видов имеют следующие семейства: Parmeliaceae (23 вида), Physciaceae (7 видов), Cladoniaceae (7 видов), Teloschistaceae (7 видов), Lecanoraceae (5 видов).

Наибольшим числом видов представлены следующие роды лишайников: Cladonia (7 видов), Lecanora (5 видов), Caloplaca и Xanthoparmelia (по 4 вида), Melanohalea, Neofuscelia, Ramalina, Xanthoria (по 3 вида).

Широкий количественный диапазон видового разнообразия лишенофлоры на территории природного парка «Щербаковский» может объясняться многообразием субстратов, неоднородностью природно-климатических условий, сохранностью степных участков, в т.ч. байрачных лесов, искусственных сосновых посадок и березовых колок.

В ходе анализа распределения видов лишайников по экологическим группам относительно субстрата были выделены следующие виды: эпифитные, эпигейные, эпилитные и эврисубстратные. Наибольшее количество насчитывают эпифитные (34 вида) и эпигейные лишайники (15 видов). В меньшей степени распространены эпилитные и эврисубстратные виды (по 5 видов).

Наибольшее количество лишайников приурочено к строго определенному типу субстрата. Лишь 5 видов проявляет более широкую экологическую валентность и заселяет различные субстраты. Это такие виды как *Physcia adscendens, Candelariella aurella, Cladonia fimbriata, Lecanora muralis* и *Xanthoria parietina*.

Исходя из анализа состава жизненных форм лишенофлоры, можно выделить 3 основных морфологических типа: накипные, листоватые и кустистые. Наибольшая численность представлена листоватыми лишайниками – 31 вид, накипных насчитывается 15 видов, а кустистых – 13 видов.

Такая картина является исключением для нашего региона, где преобладают накипные формы. Можно предположить, что это связано с наличием достаточно взрослых хорошо

развитых пойменных и байрачных лесов, березовых колок, к которым и приурочена основная масса листоватых видов.

Таблица 1 – Биоморфологическая структура лишайников

Отдел	Тип	Класс	Группа	Подгруппа	Виды
Эпигенные	Плагитропные	Накипные	Однообразно-накипные	Лепрозные	-
				Зернисто-бородавчатые	<i>Diploschistes scruposus</i> , <i>Endocarpon pusillum</i> <i>Lecanora bicincta</i> , <i>Lecanora dispersa</i> , <i>Lecanora hagenii</i> , <i>Lecanora varia</i> , <i>Caloplaca citrina</i> , <i>Caloplaca ferruginea</i> , <i>Caloplaca holocarpa</i>
				Плотнокорковые	-
				Ареолированные	<i>Candelariella aurella</i> , <i>Rhizocarpon geographicum</i> , <i>Rinodina archaea</i> , <i>Rinodina bischoffii</i>
			Диморфные	Розеточные	<i>Caloplaca decipiens</i>
				Лопастные	<i>Lecanora muralis</i>
			Чешуйчатые	Однообразно-чешуйчатые	-
		Листоватые	Рассеchenнолопастные ризоидальные		<i>Neofuscelia pulla</i> , <i>Neofuscelia rysssolea</i> , <i>Melanelixia glabra</i> , <i>Melanelixia subargentifera</i> , <i>Melanohalea exasperata</i> , <i>Melanohalea exasperatula</i> , <i>Melanohalea septentrionalis</i> , <i>Parmelia sulcata</i> , <i>Physcia adscendens</i> , <i>Physcia stellaris</i> , <i>Parmeliopsis ambigua</i> , <i>Phaeophyscia nigricans</i> , <i>Phaeophyscia orbicularis</i> , <i>Physconia distorta</i> , <i>Physconia enteroxantha</i> , <i>Pleurosticta acetabulum</i> , <i>Tuckermannopsis chlorophylla</i> , <i>Vulpicida pinastri</i> , <i>Xanthoparmelia camtschadalis</i> , <i>Xanthoparmelia loxodes</i> , <i>Xanthoparmelia somloensis</i> , <i>Xanthoparmelia subdiffuens</i> , <i>Xanthoria parietina</i> , <i>Xanthoria candelaria</i> , <i>Xanthoria polycarpa</i>
				Вздутолопастные неризоидальные	<i>Hypogymnia physodes</i> , <i>Hypogymnia tubulosa</i>
				Широколопастные ризоидальные	<i>Peltigera didactyla</i> , <i>Peltigera rufescens</i>

Таблица 1 – (окончание)

Отдел	Тип	Класс	Группа	Подгруппа	Виды	
Эпигейные	Плaгио-ортотропные	Умбиликатные	Умбиликатно-листоватые		-	
		Чешуйчатокустистые	Шило- или сцифовидные		<i>Cladonia cariosa</i> , <i>Cladonia chlorophaea</i> , <i>Cladonia fimbriata</i> , <i>Cladonia foliacea</i> , <i>Cladonia pyxidata</i> , <i>Cladonia rangiferina</i> , <i>Cladonia rei</i>	
	Ортотропные	Кустистые	Кустистые повисающие		Плосколопастные	<i>Evernia prunastri</i>
					Радиально-угловато-лопастные	<i>Evernia mesomorpha</i> , <i>Ramalina capitata</i> , <i>Ramalina farinacea</i> , <i>Ramalina pollinaria</i>
					Радиально-лопастные	<i>Bryoria subcana</i> , <i>Usnea hirta</i>
			Кустистые прямостоячие	Плоско-лопастные	<i>Cetraria steppae (aculeata)</i>	

В природном парке преобладают эпигейные плагиотропные жизненные формы (47 видов или 78,3%). Среди плагиотропных форм преобладает класс листоватых (31 вид или 66%), затем накипных (16 видов или 34%) биоморф. Плагио-ортотропные (7 видов или 11,7%), ортотропные (6 видов или 10%) жизненные формы отличаются бедностью видового состава.

Лишайники не имеют специальных структур, играющих заметную роль в защите от испарения, поэтому содержание воды в их слоевищах достаточно тесно коррелирует с содержанием воды в воздухе. Влажность – один из ведущих факторов, влияющих на распространение лишенобиоты.

Преобладание эпигейных видов лишайников связано с большим разнообразием степных участков и песчаников, а распространение листоватых видов объясняется наличием байрачных и пойменных лесов, сосновых посадок и березовых колок. Таким образом, биоморфы лишенофлоры точно характеризуют экологические условия биотопов и могут являться фитоиндикационными объектами.

Данные переданы в дирекцию природного парка «Щербаковский» для проведения мониторинговых работ на его территории, что будет способствовать сохранению биоразнообразия, а также помогут в решении вопроса о происхождении и этапах развития региональной лишенофлоры.

Библиографический список

1. Веденеев А.М., Заварухина Д.В. Лишайниковый компонент биоты природного парка «Щербаковский» // Изучение и сохранение естественных ландшафтов: сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 80-летию юбилею Волгоградского государственного социально-педагогического университета и естественно-географического факультета ВГСПУ (12-15 сентября 2011 г.) – М: Планета, 2011. – С. 99 – 102.
2. Веденеев А.М., Коваленко Д.В., Бондарчук А.А. К вопросу о лишенобиоте природного парка «Щербаковский» // Изучение, сохранение и восстановление естественных ландшафтов: Сборник статей V Международной научно-практической конференции, г. Волгоград, 12 – 16 октября 2015 г. / Коллектив авторов. – М.: Планета, 2015. – С. 42 – 45.
3. Веденеев А.М. Лишайники / Красная книга Волгоградской области. Книга в двух томах. 2-е изд., перераб. и доп. Т. 2 Растения и другие организмы / под ред. д.б.н., проф. О. Г. Барановой, д.б.н., проф. В. А. Сагалаева. Воронеж: ООО «Издат-Принт», 2017. – С. 212 – 223.
4. Мучник Е. Э., Инсарова И. Д., Казакова М. В. Учебный определитель лишайников Средней России: учеб.-метод. пособие. – Рязань: Ряз. гос. ун-т им. С.А. Есенина, 2011. – 360 с.
5. Определитель лишайников России / отв. ред. Н. С. Голубкова. – Спб.: Наука, 1996, 1998. Вып. 6,7.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕРЕНОСИМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ ТАЕЖНЫМИ КЛЕЩАМИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Лапаева Т.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Проведен анализ клещей с целью выявления патогенных инфекций, передающихся клещами. С помощью ПЦР-анализа в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с использованием набора реагентов «Амплиценс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL» было исследовано 864 клеща *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) из Пермского края. В 325 образцах обнаружен генетический материал возбудителей инфекций, переносимых клещами, наблюдалось инфицирование клещей двумя возбудителями.

Ключевые слова: ПЦР-анализ, инфекции, переносимые клещами.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF INFECTIOUS DISEASES TRANSMITTED BY TAIGA TICKS IN THE PERM TERRITORY

Lapaeva T. A.

Perm State University, Perm, Russia

Abstract. Ticks were analyzed to identify pathogenic infections transmitted by ticks. 864 ticks *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) from the Perm region were examined using real-time PCR analysis (RT-PCR) using a set of reagents «Amplisens® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL». In 325 samples, the genetic material of infectious agents carried by ticks was found, infection of ticks with two pathogens was observed.

Keywords: PCR analysis, tick-borne infections.

Территория Российской Федерации входит в состав одного из наибольших в мире ареалов иксодовых клещей, простирающегося через всю Евразию [1]. В Пермском крае основным переносчиком трансмиссивных инфекций является клещ таежный *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930). *I. persulcatus* имеет обширный поясной бореальный евразийский ареал (рисунок). Его большая часть находится в России, за пределы которой на запад этот вид распространен весьма ограниченно. Таежный клещ приурочен главным образом к различным вариантам тайги, но встречается и в некоторых других растительных формациях [2]. Иксодовые клещи являются переносчиками возбудителей целого ряда заболеваний человека, объединяемых термином – инфекции, переносимые клещами (ИПК) [1]. На территории Пермского края особое значение среди ИПК имеют иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ),

клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) [3].

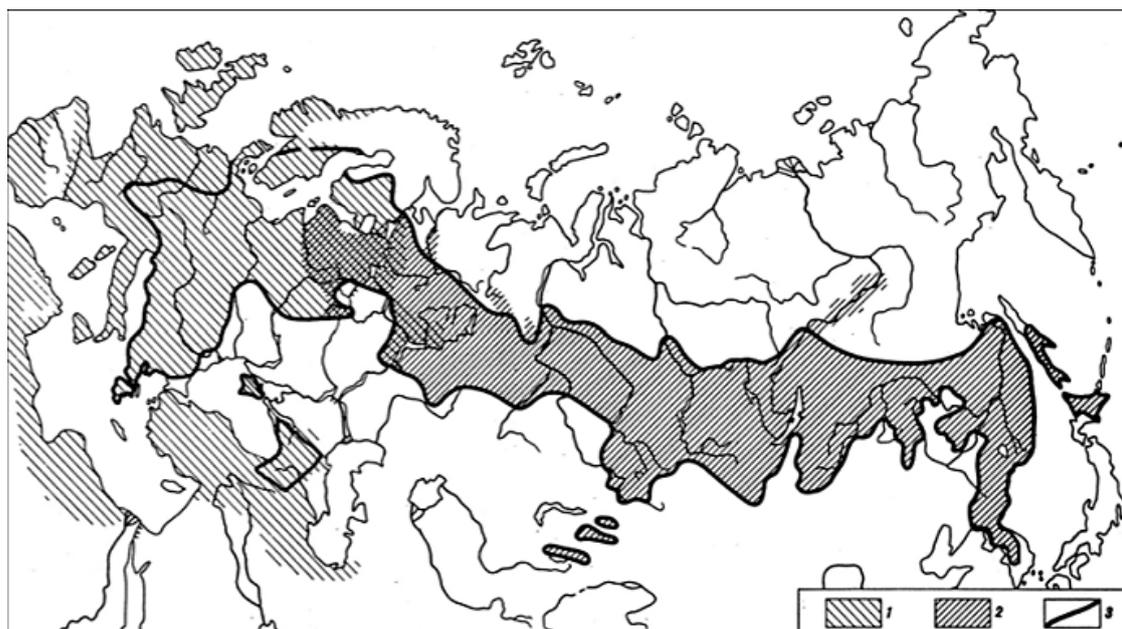


Рисунок – Ареалы клещей и КВЭ: 1 – *I. ricinus*; 2 – *I. persulcatus*; 3 – вируса клещевого энцефалита [2].

Наблюдается выраженная сезонность данных заболеваний – весна-лето с пиком в июне-июле, что связано с максимальной сезонной численностью имаго *I. persulcatus* [2]. По данным оперативного мониторинга Роспотребнадзора в лечебно-профилактические организации Пермского края за эпидемический сезон 2021 года обратилось 17661 пострадавших от укусов клещей [4].

Клещевой энцефалит (КЭ) – острая вирусная природно-очаговая трансмиссивная инфекция, поражает преимущественно центральную нервную систему (серое вещество головного и спинного мозга). Возбудителем является РНК-содержащий вирус, который относится к роду *Flavivirus* семейства *Togaviridae* [2, 5, 6]. Внутренний компонент вируса (нуклеокапсид) представлен однонитчатой РНК и структурным белком С [5]. Заражение человека происходит при укусе клеща, в слюнных железах которого вирус находится в больших количествах. Возможен пищевой путь передачи (сырое молоко коз и коров). Вирус попадает в кровь, далее проникает в клетки центральной нервной системы (ЦНС), вызывая тяжелые изменения, параличи и парезы. Лабораторным подтверждением диагноза служит появление на 5–7 день болезни Ig M и нарастание титра антител Ig G, выявляемое с помощью иммуно-ферментного анализа – ИФА [6].

Иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ) – это группа этиологически самостоятельных хронических или рецидивирующих спирохетозных природно-очаговых трансмиссивных инфекций, возбудители которых передаются иксодовыми клещами [3]. Возбудители относятся к семейству *Spirochaetaceae*, порядку *Spirochaetales*, роду *Borrelia*. Вид, который наиболее часто встречается в Пермском крае – *Borrelia burgdorferis sl.* При заражении боррелиозом, в раннем периоде болезни, в месте укуса возникает покраснение кожи – эритема. Возбудитель через кровь разносится в различные органы, где развивается воспаление [1, 5].

Для выявления больных боррелиозом проводят исследование крови на антитела к боррелиям (метод ИФА), что позволяет определить произошло ли заражение после укуса клеща, а также освобожден ли организм от возбудителя после проведенного лечения [6].

Моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) – это классические природно-очаговые, передающиеся иксодовыми клещами облигатно-трансмиссивные инфекции. Вызываются облигатно-внутриклеточными грамм-отрицательными протеобактериями родов *Ehrlichia* и *Anaplasma*, которые размножаются в цитоплазматических вакуолях лейкоцитов, образуя микроколонии – морулы, и вызывают острые гриппоподобные лихорадочные заболевания. Возбудитель МЭЧ поражает моноциты и мононуклеарные фагоциты, а ГАЧ – гранулоциты, обычно нейтрофилы. Существование природных очагов обоих возбудителей в России впервые было показано в Пермском крае. Возбудитель МЭЧ был определен методом ПЦР и последующим секвенированием ампликонов у взрослых голодных клещей *I. persulcatus*, собранных с растительности. В тех же таежных лесах Приуралья (Чусовской район Пермского края) был обнаружен возбудитель ГАЧ. Возбудители МЭЧ (*E. chaffeensis* и *E. muris*) относятся к семейству *Anaplasmataceae*, роду *Ehrlichia*; возбудитель ГАЧ (*A. phagocytophilum*) – к роду *Anaplasma* того же семейства [2].

Отсутствие характерных для данных заболеваний симптомов (преобладают общие симптомы, характерные для многих заболеваний) существенно затрудняет распознавание инфекции без проведения анализа крови. В лаборатории отделения особо опасных инфекций проводится исследование крови на эрлихиоз и анаплазмоз методом ИФА [6].

Наличие единого механизма передачи инфекций, общих хозяев и переносчиков возбудителей определяют существование сочетанных очагов природно-очаговых инфекций. Нередко при укусе клеща происходит одновременное инфицирование несколькими возбудителями, что приводит к возникновению микстинфекций. Каждый из возбудителей после проникновения в организм человека занимает свою «экологическую нишу»: вирус КЭ, поступающий с жидкой слюной клеща в кровоток, поражает нервную систему, начальный период размножения боррелий происходит в кожном покрове, эрлихии и анаплазмы являются паразитами клеток крови – лейкоцитов [3, 6]. Любое заболевание, возникающее после укуса клеща, может быть моно- или смешанной инфекцией, вызванной одним, двумя или даже тремя микроорганизмами.

Цель исследования – провести анализ проб клеща на наличие патогенных инфекций методом ПЦР-РВ, определить встречаемость ИПК и микстинфекций.

Материалы и методы. Материалами исследования являлись пробы предположительно инфицированных клещей, полученные Центральной клинико-диагностической лабораторией (ЦКДЛ) г. Перми в период с 15.04.2022 по 06.07.2022.

Выявление ИПК методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) включало в себя 3 этапа: экстракцию РНК/ДНК из образцов биологического материала, проведение реакции обратной транскрипции и получение кДНК на матрице РНК, амплификацию участка кДНК/ДНК данных микроорганизмов и гибридационно-флуоресцентную детекцию, которая производится непосредственно в ходе ПЦР. Экстракцию РНК/ДНК из биологического материала проводили набором реагентов «РИБО-преп» вариант 100. Затем с полученными пробами была проведена реакция обратной транскрипции РНК и амплификации участков кДНК/ДНК TBEV, *B.burgdorferi* sl, *E.chaffeensis* / *E.muris* при помощи специфичных к этим участкам кДНК/ДНК праймеров и фермента TaqF-полимеразы. Амплификация проводилась с использованием набора реагентов «АмплиСенс® TBEV, *B.burgdorferi* sl, *A.phagocytophilum*, *E.chaffeensis* /

Е.muris-FL» предназначен для выявления РНК TBEV – вируса клещевого энцефалита (Tick-borne encephalitis virus), Borrelia burgdorferi sl – возбудителя иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ), Ehrlichia chaffeensis/Ehrlichia muris – возбудителей моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), ДНК Anaplasma phagocytophilum – возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) в клещах, крови, ликворе, аутоптатах методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации [7]. Амплификация и анализ результатов проведены при помощи прибора «ДТ-96» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) с соблюдением рекомендуемых параметров программ [8].

Результаты и обсуждение. В ходе исследования были протестированы 864 пробы клеща таежного, 325 (37,6%) из них показали положительный результат. В 297 (91,4% от числа положительных проб) пробах были обнаружены моноинфекции, передаваемые иксодовыми клещами, данные по количеству положительных проб представлены в табл.1. Исходя из полученных результатов, можно сказать, что число клещей, инфицированных ИКБ, а, следовательно, несущих потенциальную опасность заражения человека, во много раз превосходит число положительных результатов на другие инфекции. Далее по убыванию МЭЧ – 5, ГАЧ – 3 и КВЭ – 2.

Таблица 1 – Положительные пробы с одной выявленной инфекцией. Количество проб (% от общего количества положительных проб)

ИКБ	КВЭ	МЭЧ	ГАЧ
287 (88,3)	2 (0,6)	5 (1,5)	3 (0,9)

В 28 (8,6% от числа положительных проб) пробах было обнаружено инфицирование клещей двумя возбудителями. Распределение положительных проб микстинфекций представлено в табл.2. По результатам исследования можно сказать, что наиболее встречаемое сочетание ИПК – это наличие в пробе сразу двух инфекций: иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ) – 15. Далее по убыванию представлены микстинфекции ИКБ+ГАЧ – 6, ИКБ+КВЭ – 4, ГАЧ+МЭЧ – 2 и КВЭ+ГАЧ – 1.

Таблица 2 – Положительные пробы с микстинфекциями (% от общего количества положительных проб)

ИКБ+ГАЧ	ИКБ+КВЭ	ИКБ+МЭЧ	КВЭ+ГАЧ	ГАЧ+МЭЧ
6 (1,8)	4 (1,2)	15 (4,6)	1 (0,3)	2 (0,6)

Заключение. Таким образом, в ходе исследования при помощи метода ПЦР-анализа в режиме реального времени было выявлено 4 патогенные инфекции, а именно: иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ), клещевой вирусный энцефалит (КВЭ), моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ). В пробах возбудители обнаруживаются как в виде моноинфекций, так и микстинфекций различных сочетаний. Наибольшее количество положительных проб, полученных в ходе исследования, имеет ИКБ – 88,3%, наименьшая встречаемость наблюдается для микстинфекции КВЭ+ГАЧ – 0,3% от общего числа положительных проб.

Для эффективной верификации инфекций, передающихся иксодовыми клещами необходим комплекс лабораторной диагностики: ПЦР-анализ на наличие инфекции в

носителе, а также ИФА крови человека, имеющего подозрение на заражение данными инфекциями.

Библиографический список

1. Бондаренко Е.И. и др. Комплексный подход к выявлению возбудителей инфекций, переносимых клещами, с помощью ПЦР-анализа с детекцией в режиме реального времени // Сибирский медицинский журнал. №4. Иркутск, 2012. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kompleksnyy-podhod-k-vyyavleniyu-vozbuditeley-infektsiy-pereenosimyh-kleschami-s-pomoschyu-ptsr-analiza-s-deteksiey-v-rezhime-realnogo> (дата обращения: 03.10.2022)
2. Коренберг Э.И., Помелова В.Г., Осин Н.С. Природноочаговые инфекции, передающиеся иксодовыми клещами. М, 2013. 464 с
3. Тетерин В.Ю., Коренберг Э. И. и др. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013. №4. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/kliniko-laboratornaya-diagnostika-infektsiy-peredayuschih-sya-iksodovymi-kleschami-v-permskom-krae> (дата обращения: 03.10.2022)
4. Итоги сезона клещевой активности [Электронный ресурс] // Роспотребнадзор. URL: https://59.rospotrebnadzor.ru/265/-/asset_publisher/y5CG/content/итоги-сезона-клещевой-активности (Дата обращения: 04.10.2022)
5. Дороженкова Т.Е., Раевская И.А., Чистенко Г.Н. Клещевые инфекции. // Учебно-методическое пособие. Минск, 2020. 52 с
6. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» [Электронный ресурс]. URL: <http://40.rospotrebnadzor.ru/center/stats/85760> (Дата обращения: 02.10.2022)
7. Инструкция к набору реагентов «АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis E.muris-FL». Утв. от 19.07.2021. 23 с
8. Методические рекомендации к набору реагентов «АмплиСенс® TBEV, B.burgdorferi sl, A.phagocytophilum, E.chaffeensis / E.muris-FL». Утв. От 23.07.2021. 39 с.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЧЕРЕШКА В ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА *GLYCYRRHIZA* L.

Недилько О.В., Бацунов А.И., Федоров Д.Р.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Данная статья посвящена сравнительному изучению петиолярных признаков листьев *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza echinata* L., произрастающих на территории Волгоградской области. В ходе проведенного анализа были выявлены специфические признаки анатомического строения черешков листьев изучаемых растительных объектов: форма поперечного сечения рахиса и черешка, наличие на поверхности простых волосков и железок, характер расположения ассимилирующей паренхимы и механических элементов, количество и взаимное расположение проводящих пучков.

Ключевые слова: *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza echinata* L., петиолярная анатомия, микроскопия.

THE USE OF FEATURES OF THE ANATOMICAL STRUCTURE OF THE PETIOLE IN THE IDENTIFICATION OF SOME SPECIES OF THE GENUS *GLYCYRRHIZA* L.

Nedilko O.V., Batsunov A.I., Fedorov D.R.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. This article is about the comparative study of petiolar features of leaves of *Glycyrrhiza glabra* L. and *Glycyrrhiza echinata* L. growing in the Volgograd region. The analysis identified specific features of the anatomical structure of leaf petioles of the studied plant objects: the shape of the rachis and petiole transverse section, the presence of simple hairs and glands on the surface, the location of the assimilating parenchyma and mechanical elements, the number and mutual location of conductive bundles.

Keywords: *Glycyrrhiza glabra* L., *Glycyrrhiza echinata* L., petiolar anatomy, microscopy.

Надземная часть солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) семейства Бобовые (*Fabaceae*) является перспективным объектом изучения в качестве источника важных групп биологически активных веществ таких, как тритерпеновых сапонинов, флавоноидов, веществ белковой природы [1, 2]. Внедрение в медицинскую практику данного вида растительного сырья в качестве лекарственного требует проведения комплекса фармакогностических исследований. В частности, в области изучения диагностических анатомических признаков надземной части лекарственного растения, необходимых для его идентификации.

Современным методом диагностики и подтверждения подлинности растительных объектов является петиолярная анатомия (анатомические признаки черешка листьев) [3].

В связи с тем, что строение черешка отличается большим разнообразием и видовой специфичностью, особое значение данный метод диагностики имеет для установления таксономической категории изучаемого объекта.

Петиолярная анатомия представляет практический, с точки зрения фармакогностического анализа близкородственных видов, интерес. Так, на территории Волгоградской области совместно с *G. glabra* L. встречается *G. echinata* L. – недопустимая примесь к официальному виду солодки [4]. Ввиду того, что оба вида произрастают в идентичных экотопах сравнительное изучение петиолярных признаков листьев *G. glabra* L. и *G. echinata* L. актуально с целью их идентификации.

Целью данной работы являлось сравнительное изучение петиолярных признаков *G. glabra* L. и *G. echinata* L., которые могут в дальнейшем применяться для идентификации растительного сырья данных видов.

Материалом для исследования служили собранные в фазу цветения образцы листьев *G. glabra* L. и *G. echinata* L., произрастающих на территории Алексеевского, Кумылженского, Среднеахтубинского и Иловлинского районов Волгоградской области.

Собранный материал предварительно фиксировали в смеси спирт-вода-глицерин (1:1:1) [5]. Изучение анатомических признаков поперечных срезов рахисов и черешков листьев срединной формации проводили на большом и малом увеличениях микроскопа Optika B – 500 TPL (Optika Microscopes, Italy). Поперечные срезы окрашивали 1% спиртовым раствором флороглюцина и концентрированной соляной кислотой. Для большей достоверности полученных результатов изучали образцы листьев *G. glabra* L. и *G. echinata* L. в 6 повторностях. Фотографии микрообъектов выполнены с помощью цифровой камеры микроскопа, оснащенной калибровочным слайдом стеклом для установления базовых измерений изучаемых анатомических структур.

При изучении поперечного среза рахиса *G. glabra* L. установлено, что он имеет округлое неровно ребристое очертание (Рис. 1).



Рисунок 1 – Поперечный срез рахиса *G. glabra* L. (4×).



Рисунок 2 – Поперечный срез рахиса *G. glabra* L. (4×): 1 – простой волосок; 2 – эпидерма; 3 – железка; 4 – колленхима; 5 – вместилище.

По всей наружной поверхности рахиса встречаются простые с многоклеточным основанием волоски, а также железки. Под эпидермой располагается в 1-3 слоя колленхима уголково-пластинчатая колленхима. Проводящая система рахиса *G. glabra* L. представлена

тремя крупными проводящими пучками, самый крупный из которых располагается с обращенной к стеблю стороны. Во флоэме находятся вместилища, заполненные желтым секретом (Рис. 2). Центральная часть рахиса представлена крупными округлыми или многоугольной формы клетками с одревесневшими клеточными стенками.

На поперечном срезе рахис *G. echinata* L. имеет ромбовидную форму с двумя четко выраженными ромбовидными выростами с абаксиальной стороны (Рис. 3).



Рисунок 3 – Поперечный срез рахиса *G. echinata* L. (4×).



Рисунок 4 – Поперечный срез рахиса *G. echinata* L. (10×): 1 – эпидерма; 2 – клетки колленхимы; 3 – вместилище.

На каждом выросте встречаются от 3 до 5 простых волосков с многоклеточным основанием и вытянутой вдоль толстостенной конечной клеткой. Колленхима пластинчатая. Количество слоев колленхимы варьирует от 1 до 5 (7). Наибольшее количество слоев колленхимных клеток наблюдается в области ребер и выростов рахиса.

Под колленхимой прерывающимися в местах образования ребер тяжами располагается ассимилирующая паренхима. Проводящая система рахиса *G. echinata* L. как и у *G. glabra* L. представлена тремя проводящими пучками, однако они примерно равны по размеру. Иногда между ними встречаются более мелкие проводящие пучки. Также по одному закрытому коллатеральному пучку находятся в центре каждого выступа рахиса. Для флоэмы характерно наличие 1 или 2 вместилищ (Рис. 4). Клетки центральной части рахиса *G. echinata* L. крупные многоугольной формы, при этом процессы лигнификации в них отсутствуют.

При сравнительном изучении поперечных срезов черешков *G. echinata* L. и *G. glabra* L., каких-либо значительных отличий кроме наличия обильного опушения из простых толстостенных волосков с расширенным основанием из 2-3 клеток у последней установлено не было.

У обоих видов изучаемых солодок черешки в очертании имеют округло-треугольную форму с одним коллатеральным проводящим пучком в центре. Во флоэме черешков *G. glabra* L. и *G. echinata* L. располагаются 2-3 вместилища с желтоватым или бесцветным содержимым.



Рисунок 5 – Поперечный срез черешка *G. glabra* L. (10×).

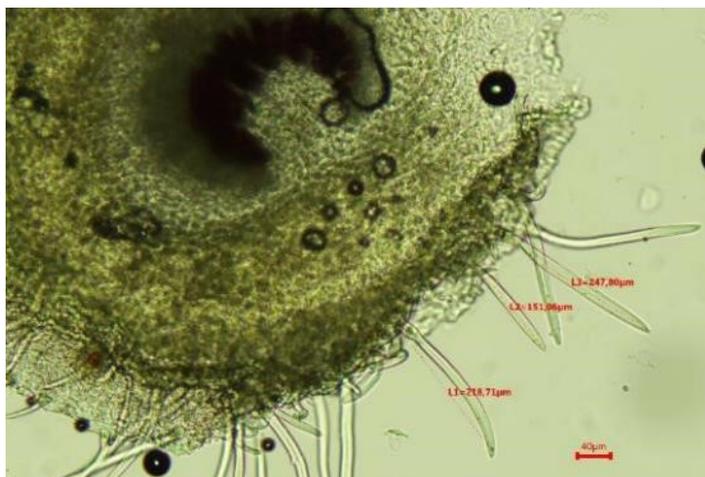


Рисунок 6 – Поперечный срез черешка *G. glabra* L. (40×).

Таким образом, впервые было проведено сравнительное изучение особенностей анатомического строения рахисов и черешков *G. glabra* L. и *G. echinata* L., произрастающих на территории Волгоградской области. Выявлен комплекс диагностических петиолярных признаков, позволяющих с высокой вероятностью отличить официальный вид солодки от недопустимой примеси.

Библиографический список

1. Яницкая А.В., Недилько О.В., Овсянкина О.В., Страхов В.В. Сравнительное изучение содержания отдельных аминокислот в надземной части *Glycyrrhiza glabra* L. и *Glycyrrhiza echinata* L.// Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2020. – №4 (76). – С. 173-175.
2. Яницкая А.В., Землянская И.В., Недилько О.В. Выявление основных анатомических диагностических признаков травы солодки голой// Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2015. – №3. – С. 103-106.
3. Сдобнина А.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина. – Пенза: Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского. – 2008. – 420 с.
4. Яницкая А.В., Недилько О.В., Землянская И.В. Сравнительное изучение анатомического строения подземных органов солодки голой и солодки щетинистой// Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – №2. – С. 278-283.
5. ОФС.1.5.3.0003.15 Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СОРТОВ *BRASSICA NAPUS* L.

Рябова Е.А.¹, Бельтюкова Н.Н.¹, Огородов И.П.², Дмитриева И.В.³.

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.*

² *Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Пермь, Россия.*

³ *Общество с ограниченной ответственностью «Компак», Ижевск, Россия.*

Аннотация. Для ценной культуры в хозяйственно-агроническом отношении *Brassica napus* L. выявлены эффективные ISSR-праймеры с пробами ДНК этого вида, выделенными из листьев растений вегетативного периода, собранных в 2022 году. Отбор ISSR-праймеров осуществлялся по эффективности выявления полиморфизма ДНК и по воспроизводимости результатов. Из 22 проанализированных 5 ISSR-праймеров с тотальной ДНК *B. napus* продемонстрировали высокую эффективность (5), так как выявили наибольшее число четко амплифицирующихся ISSR-PCR маркеров, пять праймеров обнаружили среднюю эффективность (4), а 12 ISSR-праймеров показали невысокую (3 и ниже) эффективность. Для дальнейшего проведения молекулярно-генетического анализа полиморфизма ДНК *B. napus* были отобраны следующие 5 ISSR-праймеров, из которых четыре динуклеотидных (M1(AC)8CG, M2(AC)8CC, M27(GA)8C, ISSR5(AG)8CA), а один тринуклеотидный ISSR-праймер (ISSR7(CTC)6C).

Ключевые слова: *Brassica napus* L., эффективные праймеры, ISSR-PCR маркеры, сельскохозяйственная культура.

EFFECTIVE OF ISSR PRIMERS *BRASSICA NAPUS* L.

Ryabova E.A.¹, Beltyukova N.N.¹, Ogorodov I. P.², Dmitrieva I.V.³

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia.*

² *Perm Scientific Research Institute of Agriculture, Perm, Russia.*

³ *Limited Liability Company «Kompak», Izhevsk, Russia.*

Abstract. For a valuable crop in economic and agronomic terms, *Brassica napus* L. effective ISSR primers with DNA samples of this species isolated from the leaves of plants of the vegetative period collected in 2022 have been identified. ISSR primers were selected based on the effectiveness of DNA polymorphism detection and reproducibility of the results. Of the 22 analyzed, 5 ISSR primers with total *B. napus* DNA demonstrated high efficiency (5), as they revealed the largest number of clearly amplifying ISSR-PCR markers, five primers showed average efficiency (4), and 12 ISSR primers showed low efficiency (3 and below). For further molecular genetic analysis of *B. napus* DNA polymorphism, the following 5 ISSR primers were selected, of which four dinucleotide (M1(AC)8CG, M2(AC)8CC, M27(GA)8C, ISSR5(AG)8CA), and one trinucleotide ISSR primer (ISSR7(CTC)6C).

Keywords: *Brassica napus* L., effective primers, ISSR-PCR markers, agricultural culture.

Введение. Рапс является ценной культурой в хозяйственно-агрономическом отношении. Причина этому то, что он хороший предшественник для других культур. После себя в почве оставляет корневые остатки, эквивалентные 15-20 тонн органики на гектар, которые еще и губительно действуют на возбудителей корневой гнили в почве. Особая ценность рапса заключается в том, что благодаря развитой и глубоко проникающей в почву корневой системе он усваивает нитраты, предотвращая их попадание в грунтовые воды [5].

Для повышения эффективности научного обеспечения отрасли рапсосодеяния РФ необходимо приоритетное использование в селекционном процессе новейших генетических, биотехнологических, биофизических и др. перспективных методов, в т.ч. использование молекулярных маркеров в методах ПЦР диагностики [3]

Ввиду высокой информативности молекул ДНК в мировой научной практике наблюдается стремительный рост числа методов молекулярно-генетического анализа культурных растений с использованием молекулярных маркеров, которые известны также под названием ДНК-маркеров [6]. Эти же методы анализа молекул ДНК могут быть использованы для оценки генетического полиморфизма рапса, в целях создания сортов пищевого назначения.

Цель исследования. Выявление эффективных ISSR-праймеров для проведения молекулярно-генетического анализа сортов ценной и перспективной масличной культуры *Brassica napus* L.

Методика исследований. Пробы ДНК *Brassica napus* L., выделены из листьев растений вегетативного периода. В работе использовались три озимых сорта: Вавожский местный, Гордон, Лауреат. Всего было собрано 90 проб. Подбор праймеров производился на выборке из 30 проб на каждый ISSR-праймер. Всего с тотальной ДНК было проанализировано 22 ISSR-праймеров.

Выделение ДНК проводилось по методике С. Роджерса [7], с небольшими модификациями, то есть в качестве сорбента использовали PVPP (polyvinylpyrrolidone) [4]. Навеска растительного материала составляла 20 мг. Концентрацию и качество ДНК определяли на приборе Spectrofotometr TM NanoDrop 2000 («Thermo scientific», USA) и выравнивали в пределах 5 нг/мкл.

Определение эффективности ISSR-праймеров с использованием ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)-метода полиморфизма ДНК или межмикросателлитного анализа с применением ПЦР. Отбор эффективных ISSR-праймеров осуществлялся по выявлению наибольшего числа фрагментов, включая и полиморфные, на ISSR-спектре [2] и воспроизводимости результатов ПЦР. Эффективность ISSR-праймеров рассчитывалась в соответствии со шкалой 1–5: от низкой (1) до высокой (5).

Для полимеразной цепной реакции реакционная смесь объемом 10 мкл содержала: 0,2 мкл 1 единицы Таg-полимеразы («Силекс М», Россия); 1 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 10 пМ праймера («Евроген», Россия); 1 мМ MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 мМ dNTP («Fermentas», Литва); 1 мкл тотальной ДНК.

Аmplификация была проведена в термоциклере MJ Mini-Cycler («Bio-Rad», USA). Программа для амплификации ISSR-анализа: предварительная денатурация 94°C, 2 мин.; первые пять циклов 94°C, 20 сек.; температура отжига, 10 сек.; 72°C, 10 сек.; в последующих тридцати пяти циклах 94°C, 5 сек.; температура отжига, 5 сек.; 72°C, 5 сек. Последний цикл

элонгации длился 2 мин при 72°C. Температура отжига в зависимости от G/C состава праймеров варьировала от 56 до 64°C для ISSR-праймеров. Для проверки чистоты реактивов в качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды. Продукты амплификации были разделены путем электрофореза в 2 % борратном геле в 1x TBE буфере, окрашены бромистым этидием и сфотографированы в проходящем ультрафиолетовом свете. Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярной массы (100 bp + 1.2 + 1,5 + 2 + 3 Kb DNA Ladder); «ООО-СибЭнзим-М», Москва), определение длин фрагментов проводилось с использованием программы Quantity One («Bio-Rad», USA).

Результаты исследований и их обсуждение. Для выявления эффективности были отобраны 22 ISSR-праймера с ди- и тринуклеотидным составом с одним или двумя нуклеотидами в качестве якорей. Для определения генетического разнообразия растений с использованием ISSR- фингерпринтинга наиболее часто используются именно эти ISSR-праймеры [1].

Длина анализируемых ISSR-праймеров варьировала от 13 (X1) до 22 (ISSR9) нуклеотидов (табл.). Каждый из 22 ISSR-праймеров был проанализирован индивидуально в ПЦР с тотальной ДНК *Brassica napus* L. Для дальнейшего анализа отобраны 5 эффективных для *Brassica napus* L. праймеров, так как они выявляют наибольшее число полиморфных ISSR-PCR маркеров и дают воспроизводимые результаты в повторных ПЦР.

Таблица – Эффективность ISSR-праймеров *Secale cereale* L.

Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера	Обозначение праймера	Нуклеотидная последовательность праймера (5'→3')	Эффективность праймера
M1	(AC)₈CG	5	ISSR-5	(AG)₈CA	5
M2	(AC)₈CC	5	ISSR-6	(AG) ₈ CG	4
M3	(AC) ₈ CT	4	ISSR-7	(CTC)₆C	5
M27	(GA)₈C	5	ISSR-8	(GAG) ₆ C	4
X1	(CA) ₆ G	2	ISSR-9	(ACG) ₇ G	4
X9	(ACC) ₆ G	1	ISSR-10	(ATG) ₇ C	2
X10	(AGC) ₆ C	4	CR-212	(CT) ₈ TG	3
X11	(AGC) ₆ G	4	CR-215	(CA) ₆ GT	2
ISSR-1	(AC) ₈ T	3	CR-216	(GA) ₆ GG	4
ISSR-3	(TG) ₈ AA	4	CR-217	(TG) ₆ GG	1
ISSR-4	(TG) ₈ GC	2	CR-218	(GA) ₆ CC	4

Примечание: жирным шрифтом выделены эффективные праймеры [2].

Каждый праймер индивидуально был проанализирован в ПЦР с тотальной ДНК исследуемого вида. В результате амплификации в ПЦР с 22 анализируемыми ISSR праймерами были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 200 до 1300 н.п.. Эффективными праймерами для *Brassica napus* L. являются четыре динуклеотидных ((AC)₈CG, (AC)₈CC, (GA)₈C, (AG)₈CA), и один тринуклеотидный ISSR-праймер ((CTC)₆C)).

Таким образом, пять эффективных ISSR-праймеров могут быть рекомендованы для молекулярно-генетических исследований *Brassica napus* L.

Закключение. Таким образом, для молекулярно-генетического анализа сортов *Brassica napus* L. с использованием ISSR-PCR маркеров был произведен подбор ISSR-праймеров по эффективности выявления полиморфизма ДНК.

Отобранные эффективные праймеры позволят выявить генетическое разнообразие сортов ценной и перспективной культуры *Brassica napus* L.

Исследования проводились на материале, предоставленном Пермским НИИСХ.

Библиографический список

1. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края: монография // С.В. Боронникова. Перм. гос.нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2013. – С. 239.
2. Календарь Р.Н., Боронникова С.В. Анализ молекулярно-генетического полиморфизма природных популяций редких видов растений Урала с помощью ретротранспозонов // Материалы Четвертого Московского междунар. конгресса. М.: ЗАО «Экспо-биохим-технологии»; Изд-во РХТУ им. Д.И. Менделеева. – 2007. – Ч. 2. – С. 121.
3. Карпачев В.В., Харламов С.А., Савенков В.П. Повышение эффективности селекции, семеноводства, и технологии возделывания рапса и других масличных капустных культур // Материалы конференции «Повышение эффективности селекции, семеноводства, и технологии возделывания рапса и других масличных капустных культур». – 2015. – С. 4-5.
4. Нечаева Ю.С., Бельтюкова Н.Н., Пришнивская Я.В. и др. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края // Материалы междунар. конф. «Синтез знаний в естественных науках. Рудник будущего: проекты, технологии, оборудование». – Пермь, 2011. – С. 278–282.
5. Старых А. И. Влияние условий выращивания на урожайность и посевные качества семян ярового рапса // Современные научно-практические решения в апк: сборник статей всероссийской научно-практической конференции. – Тюмень. 2017. – С. 751-759.
6. Сухарева А. С., Кулуев Б. Р. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений // Биомика. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 069-084.
7. Rogers S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // S.O. Rogers, A.J. Bendich / Plant Molecular Biology. – 1985. – Vol. 1. – № 19. – P. 69-76.

ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ТРАВЫ ПИЖМЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКОВОЙ

Саркисян И.К., Яницкая А.В., Гашева М.С., Тишина А.И.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Согласно литературным данным пижма тысячелистниковая (*Tanacetum achilleifolium* M.) не применяется в медицине, но содержит флавоноиды и эфирные масла [1]. Возможность использования нового вида сырья делает необходимым изучение анатомического строения надземной части данного растения и выявление диагностических признаков. Ранее нами были исследованы листья и цветки, поэтому в данной работе приведены результаты дополнительного изучения стебля и черешка пижмы тысячелистниковой [2].

Ключевые слова: пижма тысячелистниковая, микроскопия, анатомо-диагностические признаки.

STUDY OF ANATOMICAL FEATURES OF THE HERB OF TANACETUM ACHILLEIFOLIUM

Sarkisyan I.K., Yanitckaya A.V., Gasheva M.S., Tishina A.I.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. According to the literature information, yarrow tansy (*Tanacetum achilleifolium* M.) is not used in medicine, but contains flavonoids and volatile oils [1]. The possibility of using a new type of raw material makes it necessary to study the anatomical structure of the above-ground part of this plant and the determination of diagnostic signs. Earlier we have studied leaves and flowers, therefore in this work the results of additional study of the stem and petiole of *Tanacetum achilleifolium* are given [2].

Keywords: tansy yarrow, microscopy, anatomical and diagnostic features.

Пижма тысячелистниковая (*Tanacetum achilleifolium* M.) – травянистое многолетнее растение высотой 10-35 см, имеет ползучее разветвленное корневище, опушенное волосками. Стебли многочисленные, прямостоячие. Листья серовато-зеленые, опушенные, прикорневые – черешковые, дважды-перисторассеченные, на верхушке заостренные, верхние и средние листья сидячие, листовые пластинки линейные. Корзинки собраны в щитковидное соцветие, обертки состоят из ланцетно-яйцевидных листочков со светлой, перепончатой каймой по краю. Цветки двух типов: краевые цветки – язычковые, желтые, в количестве 5-20, в центре – трубчатые цветки, лепестки с продольными ребрами и неправильно-зубчатой по краю коронкой. Плод – семянка [3].

Несмотря на то, что пижма тысячелистниковая не является официальным лекарственным растением, широкое распространение данного растительного объекта на территории Волгоградской области позволяет говорить о перспективности его изучения и возможности использования в качестве источника биологически активных веществ.

Поэтому целью работы явилось выявление основных анатомо-диагностических признаков травы пижмы тысячелистниковой.

Материалом для исследования служила трава пижмы тысячелистниковой, собранная на территории Волгоградской области в мае-июне 2022 года. Изучение растительного сырья проводили с помощью микроскопического анализа, изложенного в ГФ XIV издания [4,5]. Для этого стебель и черешки листа предварительно размягчали в смеси вода- спирт этиловый – глицерин (1:1:1). Для обнаружения одревесневших элементов стебля и черешка проводили гистохимические реакции с раствором флороглюцина и 25% раствором серной кислоты. Окрашенные срезы помещали в каплю хлоралгидрата. Анатомическое исследование проводили с помощью микроскопа Optika B – 500 TPL (Optika Microscopes, Italy).

При рассмотрении поперечного среза черешка листа контуры неровные, городчатые. С адаксиальной стороны имеется V-образный вырез с округлым выступом в середине (рис.1).



Рисунок 1 – Поперечный срез черешка листа (ув.х4).

Эпидермальные клетки неправильной формы, имеют утолщения клеточной стенки. На эпидерме располагаются простые головчатые трихомы (рис. 2).



Рисунок 2 – Простой волосок, фрагмент поперечного среза черешка (ув.х40).

Под эпидермой находится уголковая колленхима, клетки которой также имеют неправильную форму. Также присутствуют эфирномасличныеместилища размером 29,66-32 нм (рис. 3).

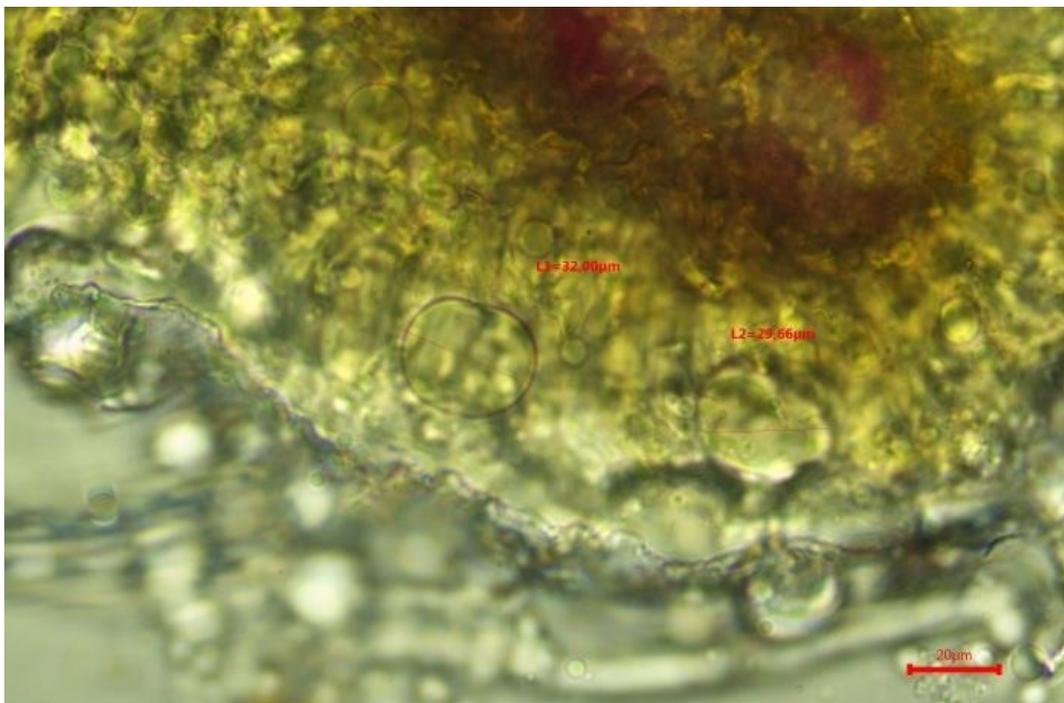


Рисунок 3 – Эфирномасличныеместилища, фрагмент поперечного среза черешка (ув.х40).

Затем располагается основная паренхима, с округлыми изодиаметрическими клетками. В мезофилле черешка находятся закрытые коллатеральные проводящие пучки. Самый крупный пучок – центральная жилка – расположен ближе к абаксиальной стороне черешка. Центральная жилка представлена флоэмой и ксилемой. Также в ней можно различить сосуды ксилемы (рис.4).

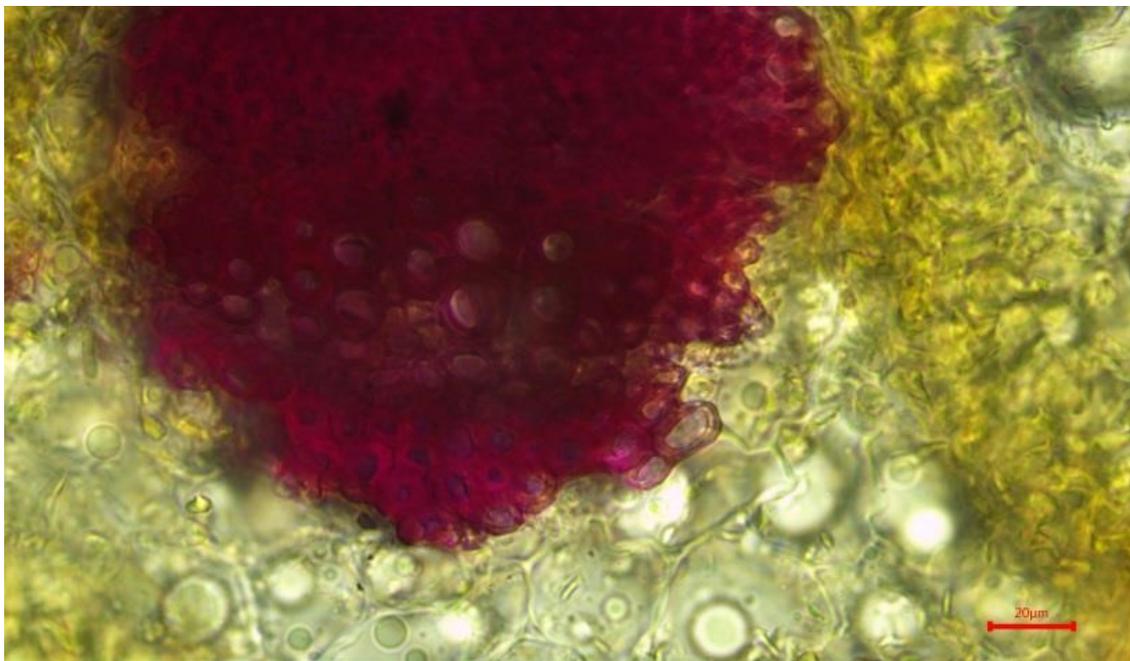


Рисунок 4 – Проводящий пучок, сосуды ксилемы, фрагмент поперечного среза черешка листа (ув.х40).

Покровная ткань стебля представлена эпидермой, клетки которой равномерно утолщены. На эпидерме располагаются простые головчатые трихомы, которые часто обламываются (рис.5).

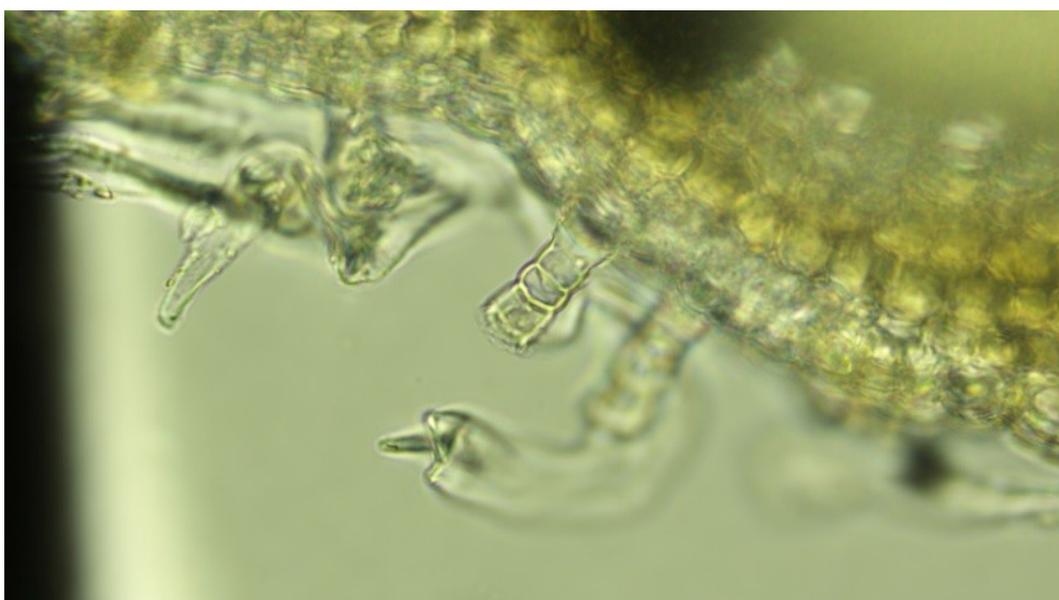


Рисунок 5 – Простые волоски, фрагмент поперечного среза стебля (ув.х40).

Под эпидермой находятся несколько рядов клеток угольной колленхимы. Под ней располагается хлоренхима. Также присутствует эндодерма, представленная клетками крахмалоносного влагалища. Проводящие пучки открытые коллатеральные, расположенные по кругу (рис. 6).

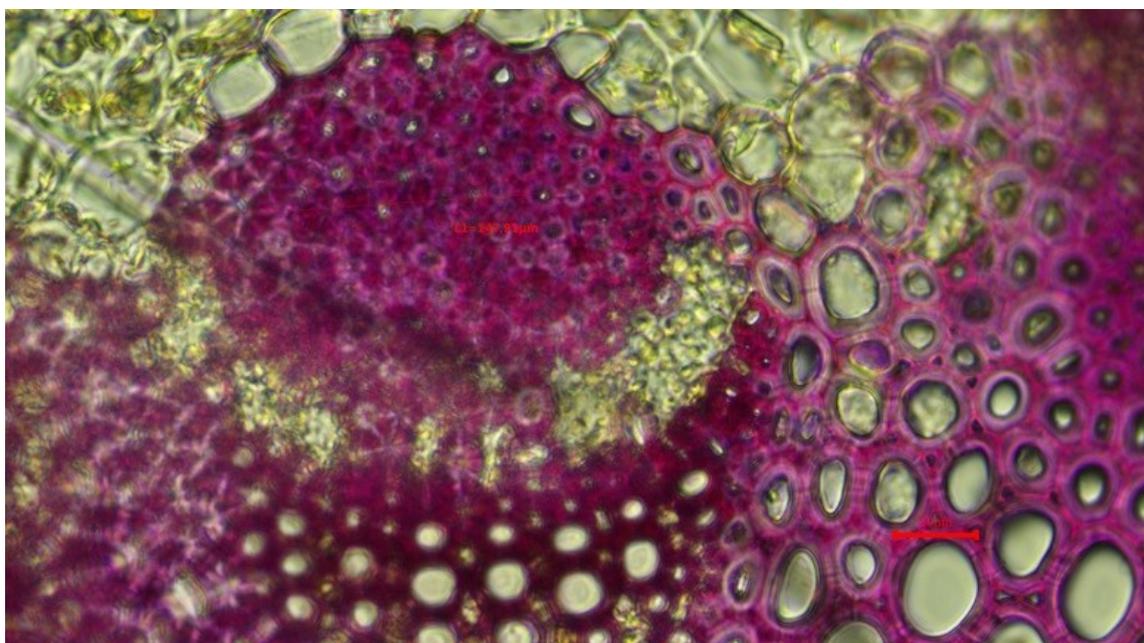


Рисунок 6 – Коллатеральный пучок, фрагмент поперечного среза стебля (ув. х40).

Затем располагается сердцевина, представленная основной паренхимой (рис.7).

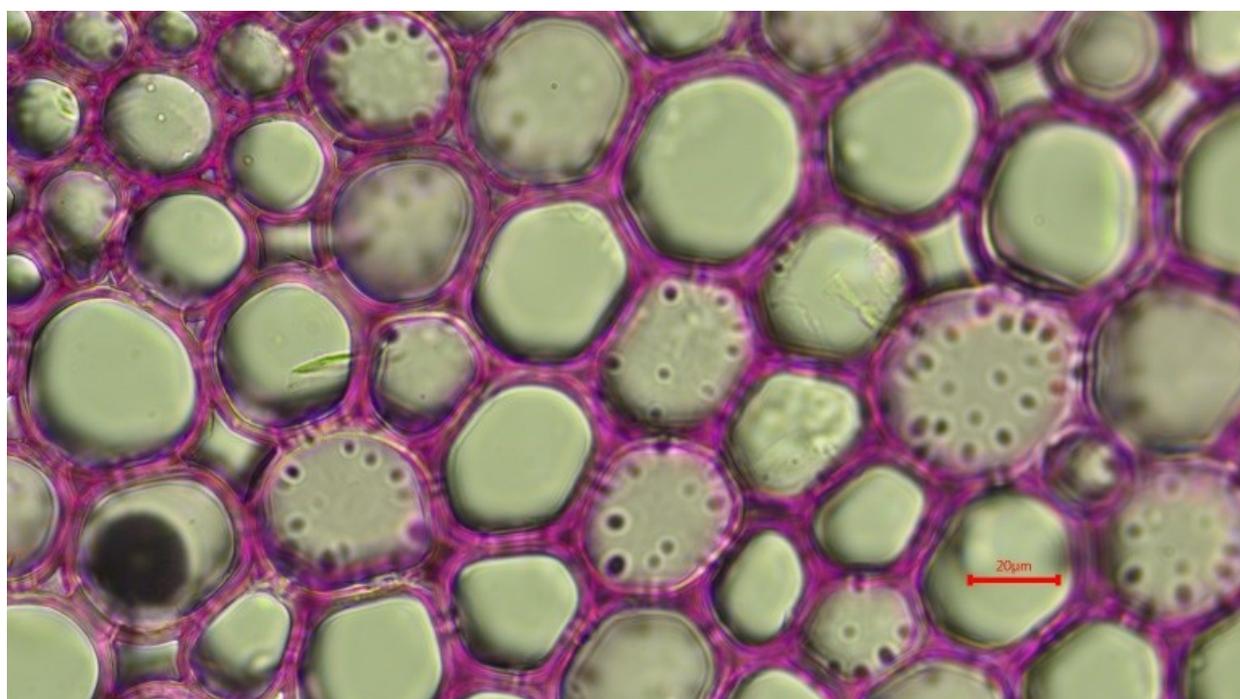


Рисунок 7 – Клетки сердцевины поперечного среза стебля (ув. х40).

В связи с тем, что изучение пижмы тысячелистниковой в качестве нового вида лекарственного растительного сырья является перспективным, полученные в ходе

проведенного микроскопического анализа данные могут быть использованы для его идентификации.

Библиографический список

1. Ivancheva S., Stancheva B. External Flavonoid Aglycones from *Tanacetum millefolium* L //Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences. – 2001. – Т. 54. – №. 4. – С. 4: 77.
2. Самылина И. А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие / И.А. Самылина, А.А. Сорокина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2020.– 208 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – Самара: Офорт, 2016. – 594 с
4. ОФС № 1.5.1.0002.15 «Травы» ГФ XIV издания, II том. С. 2220-2221.
5. ОФС № 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Государственная Фармакопея XIV издания, II том. С. XX-14-е изд. – Т.2 М.: МЗ РФ. С. 2327–2348.

ДИКИЕ РОДИЧИ ГОРОХА КАК ИСТОЧНИК ГЕНОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ

Соломенникова Ю.Н.¹, Трубников Ю.Н.²

¹ *Сибирский федеральный университет, Красноярск, Россия*

² *Институт вычислительного моделирования Сибирского отделения Российской академии наук, Красноярск*

Аннотация. Дикие родственники с.-х. культур обладают генетическим разнообразием, проверенным естественным отбором. С развитием современной геномики стало возможным пересмотреть дикие сорта и определить приоритеты их использования для селекции, обеспечивая источники генов устойчивости к болезням и толерантности к неблагоприятным условиям среды. В этом обзоре мы сосредоточимся на диких представителях гороха как на источнике хозяйственно-ценных признаков и обобщим текущее состояние и потенциал их соответствующих таксонов для улучшения урожая.

Ключевые слова: дикие представители сельскохозяйственных культур, генетическое разнообразие, устойчивость к патогенам, горох.

WILD RELATIVES OF PEAS AS A SOURCE OF GENES FOR ECONOMICALLY VALUABLE TRAITS

Solomennikova Y.N.¹, Trubnikov Y.N.², Yamskikh I.E.¹

¹ *Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Siberian Federal University», Krasnoyarsk, Russia*

² *Institute for Computational Modeling of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Krasnoyarsk, Russia*

Annotation. Wild relatives of agricultural crops have a genetic diversity verified by natural selection. With the development of modern genomics, it has become possible to review wild varieties and prioritize their use for breeding, providing sources of genes for disease resistance and tolerance to adverse environmental conditions. In this review, we will focus on wild representatives of pea as a source of economically valuable traits and summarize the current status and potential of their respective taxa for yield improvement.

Keywords: wild representatives of crops, genetic diversity, resistance to pathogens, peas.

Введение

Бобовые, включая горох, нут и чечевицу, являются основным источником пищевого белка для примерно 30% населения Земли [1]. Дикие представители бобовых имеют широкое генетическое разнообразие, которое было лишь частично отобрано во время одомашнивания и отбора редких генов/мутаций для уменьшения разрушения и дремлющего состояния семян,

но также для увеличения их размера, биомассы растений и индекса урожайности. В настоящее время назрела необходимость выведения культур, устойчивых к климатическим изменениям, особенно к жаре, засухе и холоду [2].

Процессы одомашнивания в прошлом привели к высокой степени родства между современными сортами сельскохозяйственных культур, что привело к сужению генетической базы культурной зародышевой плазмы, подверженной вредителям и болезням [3]. Дикие сородичи сельскохозяйственных культур (ДСХ) обеспечивают генетическое разнообразие, проверенное естественным отбором в различных условиях окружающей среды.

Разнообразие гороха, хранящееся в генофондах, активно изучалось в течение последних двух десятилетий [4], при этом исследования были сосредоточены в основном на разнообразии культурного гороха. В самых крупных образцах, проанализированных до настоящего времени (3020 и 4200 образцов), преобладали культурные виды и было относительно мало (45) маркеров ALU (инсерционные полиморфизмы на основе ретротранспозонов) [5]. Методы полногеномного секвенирования нового поколения недавно использовались для изучения разнообразия дикого гороха [6,7]. Недавнее исследование, в которое были включены 143 *P. sativum subsp. elatius* и 18 образцов *P. fulvum* показали, что, несмотря на присутствие разнообразия среди культивируемого и дикого материала, дикий материал обеспечивает явное генетическое разнообразие [8,9,10].

1.1. Дикие сородичи гороха как источники устойчивости к биотическим стрессам.

Задолго до того, как растения были одомашнены и выращены как монокультуры, патогены растений эволюционировали совместно с дикими растениями, растущими в сообществах смешанных видов. Эволюция продолжала происходить внутри одомашненных растений, развивающихся как избранные генотипы в более плотных популяциях, чем в дикой природе. Использование генетической устойчивости считается наиболее эффективной и устойчивой стратегией борьбы с фитопатогенами в сельскохозяйственной практике. Одомашнивание дикорастущих растений привело к распространению сельскохозяйственных культур вдали от их первоначальных центров [11], и их патогены последовали этому распространению [12]. Помимо абиотических стрессов, патогены растений являются серьезным препятствием для сельского хозяйства и угрожают глобальной продовольственной безопасности. Кроме того, продолжающееся изменение климата может ускорить временное и пространственное распространение и серьезность заболеваний.

Было опубликовано несколько крупных исследований, в которых изучались количественные реакции болезни [13,14]. Наибольшее внимание уделялось *P. fulvum* как донору устойчивости к брuxидам [15] и источнику новой устойчивости к мучнистой росе [16]. Устойчивость к гороховому долгоносику была выявлена у *P. fulvum* [17] с участием механизма устойчивости стручков и семян [18], и он был введен в культурные растения гороха [19, 20].

На данный момент сообщалось о трех отдельных генах устойчивости, названных *er1*, *er2* и *Er3* у гороха и его диких сородичей [21], которые обеспечивают неполную устойчивость к мучнистой росе, вызываемой *Erysiphe pisi*. Из них *er1* был идентифицирован как ген MLO [22]. Сочетание знаний о разнообразии зародышевой плазмы гороха со знаниями о гене *eIF4E* устойчивости к вирусам [23] и скрининг почти 3000 образцов с известным географическим происхождением, включая дикие виды *Pisum sp.* привели к идентификации новых аллелей устойчивости [24]. Эти данные подчеркивают важность регионов Эфиопии, Центральной Азии и Китая как вторичных центров разнообразия гороха, что соответствует разнообразию патогена.

1.2. Дикие представители гороха как источники устойчивости к абиотическим стрессам.

Помимо потенциального источника устойчивости к биотическим стрессам, дикий горох может быть источником устойчивости к различным абиотическим факторам. Одним из них является холодостойкость и возможность развития озимого гороха с использованием локуса цветения *Hr*, влияющего на устойчивость к зимним морозам [25]. Большинство культурных образцов гороха из более высоких широт имеют количественную реакцию на длинный день и выращиваются как яровая культура, в то время как у некоторых кормовых сортов сохранилась обязательная или почти обязательная потребность в длинном зимнем цикле [26].

Потенциальные признаки засухоустойчивости ДКР включают восковидность листьев, обнаруженную у *P. sativum*, архитектуру корней и ризобиальные ассоциации. *P. fulvum* также менее восприимчив к засухе и потенциально может быть источником засухоустойчивости [27]. Существуют неисследованные возможности изучения дикого гороха на устойчивость к абиотическим стрессам на основе параметров окружающей среды и определения приоритетности образцов для исследований в контролируемых условиях.

Заключение

Текущее глобальное изменение климата приводит к смещению и сокращению ареалов выращивания сельскохозяйственных культур. Потенциал диких сородичей сельскохозяйственных культур, в частности гороха, как важного источника генетического разнообразия для селекции иногда недооценивается. Создание гибридных популяций с дикими представителями сельскохозяйственных культур дает селекционерам значительные преимущества в качестве инструмента для предварительного скрещивания для выявления и использования диких аллелей и обеспечивает чрезвычайно ценные долгосрочные ресурсы. Необходимо усилить изучение полезных признаков дикого гороха и его природного разнообразия, которое стремительно исчезает.

Библиографический список

1. Afshin A. et al. Consumption of nuts and legumes and risk of incident ischemic heart disease, stroke, and diabetes: a systematic review and meta-analysis //The American journal of clinical nutrition. – 2014. – Т. 100. – №. 1. – С. 278-288.
2. Hatfield J. L., Prueger J. H. Temperature extremes: Effect on plant growth and development //Weather and climate extremes. – 2015. – Т. 10. – С. 4-10.
3. Kim M. Y. et al. Tracing soybean domestication history: From nucleotide to genome //Breeding Science. – 2012. – Т. 61. – №. 5. – С. 445-452.
4. Smýkal P. et al. Legume crops phylogeny and genetic diversity for science and breeding //Critical Reviews in Plant Sciences. – 2015. – Т. 34. – №. 1-3. – С. 43-104.
5. Jing R. et al. The genetic diversity and evolution of field pea (*Pisum*) studied by high throughput retrotransposon based insertion polymorphism (RBIP) marker analysis //BMC Evolutionary Biology. – 2010. – Т. 10. – №. 1. – С. 1-20.
6. Smýkal P. et al. Genomic diversity and macroecology of the crop wild relatives of domesticated pea //Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 1-12.
7. Smýkal P. et al. Genetic structure of wild pea (*Pisum sativum* subsp. *elatius*) populations in the northern part of the Fertile Crescent reflects moderate cross-pollination and strong effect of geographic but not environmental distance //PloS one. – 2018. – Т. 13. – №. 3. – С. e0194056.

8. Jing R. et al. Gene-based sequence diversity analysis of field pea (*Pisum*) //Genetics. – 2007. – Т. 177. – №. 4. – С. 2263-2275.
9. Holdsworth W. L. et al. A community resource for exploring and utilizing genetic diversity in the USDA pea single plant plus collection //Horticulture research. – 2017. – Т. 4.
10. Smýkal P. et al. Phylogeny, phylogeography and genetic diversity of the *Pisum* genus //Plant Genetic Resources. – 2011. – Т. 9. – №. 1. – С. 4-18.
11. Вавилов Н. И. Центры происхождения культурных растений //Труды по прикладной ботанике и селекции. – 1926. – Т. 16. – №. 2. – С. 248.
12. Whitehead S. R., Turcotte M. M., Poveda K. Domestication impacts on plant–herbivore interactions: a meta-analysis //Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017. – Т. 372. – №. 1712. – С. 20160034.
13. Infantino A., Porta-Puglia A., Singh K. B. Screening wild *Cicer* species for resistance to fusarium wilt. – 1996.
14. Tivoli B. et al. Screening techniques and sources of resistance to foliar diseases caused by major necrotrophic fungi in grain legumes //Euphytica. – 2006. – Т. 147. – №. 1. – С. 223-253.
15. Byrne O. M. et al. Genetic analysis of pod and seed resistance to pea weevil in a *Pisum sativum* × *P. fulvum* interspecific cross //Australian Journal of Agricultural Research. – 2008. – Т. 59. – №. 9. – С. 854-862.
16. Esen, A., Sari, H., Erler, F., Adak, A., Sari, D., Eker, T., ... Toker, C. (2019). Screening and selection of accessions in the genus *Pisum* L. for resistance to pulse beetle (*Callosobruchus chinensis* L.). *Euphytica*, 215(4), 74–82.
17. Hardie D. C., Baker G. J., Marshall D. R. Field screening of *Pisum* accessions to evaluate their susceptibility to the pea weevil (Coleoptera: Bruchidae) //Euphytica. – 1995. – Т. 84. – №. 2. – С. 155-161.
18. Fernandez, T. A., & Rubiales, D. (2019). Flower and pod source influence on pea weevil (*Bruchus pisorum*) oviposition capacity and preference. *Frontiers in Plant Science*, 10,1–7.
19. N., Byrne, O., Hardie, D. C., Khan, T., Siddique, K. H. M., & Yan, G. (2012). Large-scale density-based screening for pea weevil resistance in advanced backcross lines derived from cultivated field pea (*Pisum sativum*) and *Pisum fulvum*. *Crop & Pasture Science*, 63, 612–618.
20. Clemente A. et al. Eliminating anti-nutritional plant food proteins: the case of seed protease inhibitors in pea //PLoS One. – 2015. – Т. 10. – №. 8. – С. e0134634.
21. Fondevilla S., Rubiales D. Powdery mildew control in pea. A review //Agronomy for sustainable development. – 2012. – Т. 32. – №. 2. – С. 401-409.
22. Rispaill N., Rubiales D. Genome-wide identification and comparison of legume MLO gene family //Scientific reports. – 2016. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-12.
23. Ashby J. A. et al. Structure-based mutational analysis of eIF4E in relation to sbm1 resistance to pea seed-borne mosaic virus in pea //PLoS One. – 2011. – Т. 6. – №. 1. – С. e15873.
24. Konečná E. et al. Geographical gradient of the eIF4E alleles conferring resistance to potyviruses in pea (*Pisum*) germplasm //PLoS One. – 2014. – Т. 9. – №. 3. – С. e90394.
25. Lejeune-Henaut I. et al. The flowering locus *Hr* colocalizes with a major QTL affecting winter frost tolerance in *Pisum sativum* L //Theoretical and Applied Genetics. – 2008. – Т. 116. – №. 8. – С. 1105-1116.
26. Weller, J. L., Hecht, V., Liew, L. C., Sussmilch, F. C., Wenden, B., Knowles, C. L., & Vander Schoor, J. K. (2009). Update on the genetic control of flowering in garden pea. *Journal of Experimental Botany*, 60, 2,493–2,499.
27. Naim-Feil E. et al. Drought response and genetic diversity in *Pisum fulvum*, a wild relative of domesticated pea //Crop Science. – 2017. – Т. 57. – №. 3. – С. 1145-1159.

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИХ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ *EMPETRUM NIGRUM* ФЛОРЫ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ

Стоян В.А., Серебряная Ф.К.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Пятигорск, Россия

Аннотация: Расширенное исследование по поиску актуальных отечественных растительных источников для получения новых эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения является перспективной задачей фармации. Объектом исследования является *Empetrum nigrum*, который произрастает в дикой природе на территории Камчатского края, а также Сахалинской и Магаданской областей. На сегодняшний день, его используют в основном в народной медицине как противовоспалительное, спазмолитическое, гипотензивное, антиоксидантное, мочегонное и тонизирующее средство. Проведены морфолого-анатомические, морфометрические исследования образцов, собранных в различных местообитаниях. Установлены диагностические признаки, к ним относятся уплощенная форма листовой пластинки, наличие характерного опушения в месте смыкания латеральных фрагментов листовой пластинки, наличие железистых волосков. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Для плодов характерны следующие признаки, экзокарп однослойный, представлен мелкими многогранными клетками, удлинённой формы. Мезокарпий представлен 3-5 слоями клеток, дифференцирован на 2 зоны. Эндокарпий однослойный, представлен клетками веретеновидной формы, вытянутых вдоль оси плода, стенки клеток утолщены и одревесневают.

Ключевые слова: *Empetrum nigrum*, морфометрические показатели, гербарные образцы, морфолого-анатомические признаки.

STUDY OF MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL AND MORPHOMETRIC CHARACTERS OF *EMPETRUM NIGRUM* OF THE MAGADAN REGION FLORA

Stoyan V.A., Serebryanaya F.K.

Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – Branch of Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Volgograd State Medical University» Ministry of Health of the Russian Federation, Pyatigorsk, Russia

Abstract. An extended study on the search for relevant domestic herbal sources for obtaining new effective and safe herbal medicines is a promising task of pharmacy. The object of the study is *Empetrum nigrum*, which grows in the wild in Kamchatka region, as well as Sakhalin and Magadan regions. Today, it is used mainly in folk medicine as an anti-inflammatory, antispasmodic, hypotensive, antioxidant, diuretic and tonic. Morphological-anatomical, morphometric studies of samples collected in various habitats were carried out. Diagnostic signs have been established, these include the flattened shape of the leaf blade, the presence of characteristic pubescence at the junction of the lateral fragments of the leaf blade, the presence of glandular hairs. Stomatal apparatus of the

anomocytic type. The following signs are characteristic of fruits, the exocarp is single-layered, represented by small polyhedral cells, elongated shape. The mesocarp is represented by 3-5 layers of cells, differentiated into 2 zones. The endocarp is single-layered, represented by spindle-shaped cells elongated along the axis of the fetus, the cell walls are thickened and lignified.

Keywords: *Empetrum nigrum*, morphometric indicators, herbarium specimens, morphological and anatomical features.

ВВЕДЕНИЕ. Интерес к представителям семейства вересковые как источников антиоксидантов, содержащих флавоноиды, тритерпеноиды (урсоловая и олеановая кислоты), сапонины, витамины. В данной работе представлены результаты фрагмента комплексного исследования шикши (*Empetrum nigrum*), произрастающей в различных районах Магаданской области.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Объекты для исследования были собраны в Магаданской области (г. Магадан, 19 сентября 2021 года). Растительное сырье фиксировали в системе: спирт этиловый 70% – глицерин – вода в соотношении 1:1:1. Поперечные срезы стебля, корня, листовой пластинки и плода выполняли с помощью лезвий. Микроскопический анализ проводился на живых, свежесобранных и нефиксированных вегетативных органов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Морфологическая характеристика. Кустарники высотой 20 см. Корневая система представлена системой придаточных корней. Стебли простертые, тянущиеся, (густо разветвленные, 0,5-1 м, деревянистые), ветви зеленого, коричневого или красноватого цвета, дистально голые, скрыты в моховой подушке, покрыты точечными желёзками белого цвета. [1] Листья сидячие, расходящиеся, витые или спирально расположенные, черешок имеется, (очень короткий), лопасть (2,5-7 мм) – блестящая или непрозрачная, линейная, продолговатая или эллиптическая; сизоватая, края цельные, (сильно закрученные, закрывающие абаксиальную поверхность и образующие восковую хвоинкообразующую полость, представляющую собой желобок, поверхности голые, железистые или волосистые).

У одних видов листья совершенно голые и имеют глянцевитую поверхность, у других они по-разному опушены [3]. Опушение развивается обычно на нижней поверхности листа, где у большинства вересковых находятся устьица [6] (Рис. 1).

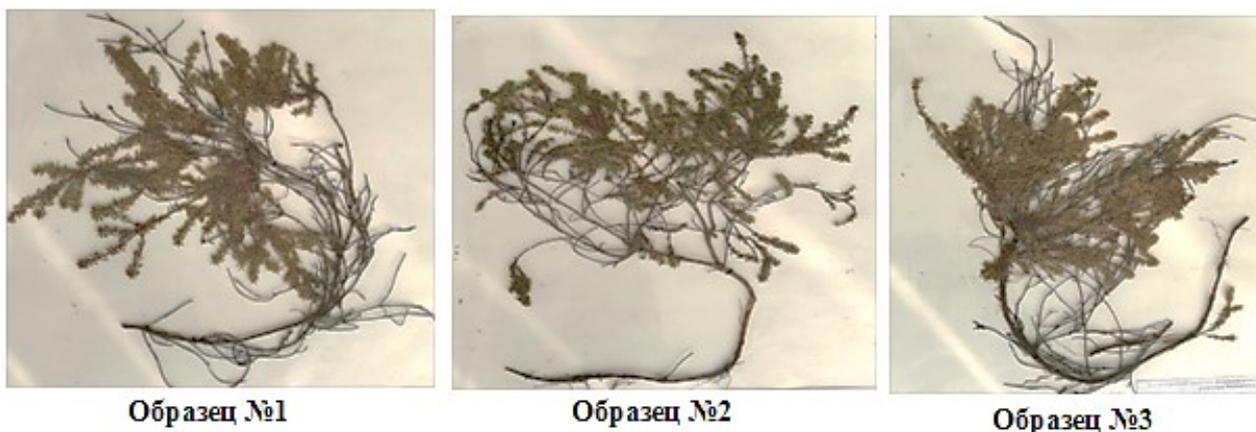


Рисунок 1 – Внешний вид гербарных образцов *Empetrum nigrum* (№1-3), собранных на территории Магаданской области.

Образцы 1,2,3 собраны в районе мемориала «Маска Скорби», город Магадан. Характерно развитие одревесневших стелющихся фрагментов побегов, количество листовых пластинок, для образцов 1 и 2 характерно обилие вегетативных и репродуктивных побегов.

Таблица 1 – Морфометрические показатели *Empetrum nigrum*, произрастающие на территории Магаданской области

	Образец №1	Образец №2	Образец №3
Высота побегов (см)	49	43	47
Ветвистость побегов (см)	Сильноветвистый	Сильноветвистый	Сильноветвистый
Размеры листа (см)	0,4 x 0,1	0,3 x 0,1	0,35 x 0,1
Размеры плодов (см)	0,65 x 0,70	0,7 x 0,85	0,9 x 1,0

Из данных таблицы можно сделать вывод о том, что собранные образцы вегетативных органов шикши представлены ветвистыми побегами высотой от 43 до 49 см, листовыми пластинками длиной от 0,3 до 0,4 и размерами плодов от 0,65 до 1,0. Плоды черные, непрозрачные, 5-10 мм в диаметре, крупно-бугорчатые, шаровидные, мясистые, окруженные не мясистой чашечкой, представляют собой септицидную или локулицидную коробочку, ягоду или костянку [2]. Семян 6-9, яйцевидные, не крылатые, светло-коричневые, диаметром 1,5-3 мм. $2n = 26, 39, 52$; семенник гладкий или с мелкими шипиками. (Рис. 2)



Рисунок 2 – Внешний вид плодов *Empetrum nigrum*, собранных на территории Магаданской области.

При проведении морфолого-анатомических исследований изучались поперечные срезы листовой пластинки, строение верхней и нижней эпидермы листовой пластинки, поперечные срезы стебля в верхней и нижней части, а также структура экзокарпа, мезокарпа и эндокарпа плодов шикши. Микроскопический анализ проводился на живых, свежесобранных и нефиксированных вегетативных органов. Листовая пластинка закручивается, образуя многочисленные волоски при сближении краев лопастей. Наружная эпидерма, которая расположена внутри листа, покрыта многочисленными головчатыми волосками. Тип строения листа – дорзовентральный, т.к. ассимиляционная часть листа представлена палисадным мезофиллом, образованная 1-3 слоями клеток вытянутой формы, расположенным средней части поперечного среза листа р над сосудистыми пучками листовой пластинки, и губчатым мезофиллом, расположенным под сосудистыми пучками, также имеющий 1-3 слоя клеток. Центральный сосудистый пучок хорошо развит с 1-2, меньшими по размеру с каждой стороны.

Коллатеральные сосудистые пучки окружены паренхимой, которая отделена от склеренхимы. Наружный эпидермис представлен сильно утолщенными клетками примерно 19-22 мкм на поперечном сечении, образован практически ровными клетками с гладкой поверхностью вместе с одноядерными клетками, расположенными в 1-3 слоя клетками и простыми одноклеточными головчатыми волосками вдоль изогнутой линии эпидермиса. Внутренний эпидермис состоит из тонких клеток толщиной 10-14 мкм на поперечном срезе. (Рис. 3)

Верхняя эпидерма листовая пластинки состоит из основных клеток с извилистыми или зигзагообразными антиклинальными стенками. Устьичный аппарат аномоцитного типа. Нижняя эпидерма листовая пластинки имеет клетки с извилистыми антиклинальными стенками, устьичный аппарат аномоцитного типа. Околоустьичных клеток 5-6. Характерным признаком является наличие друз оксалата кальция [4] (Рис. 3).

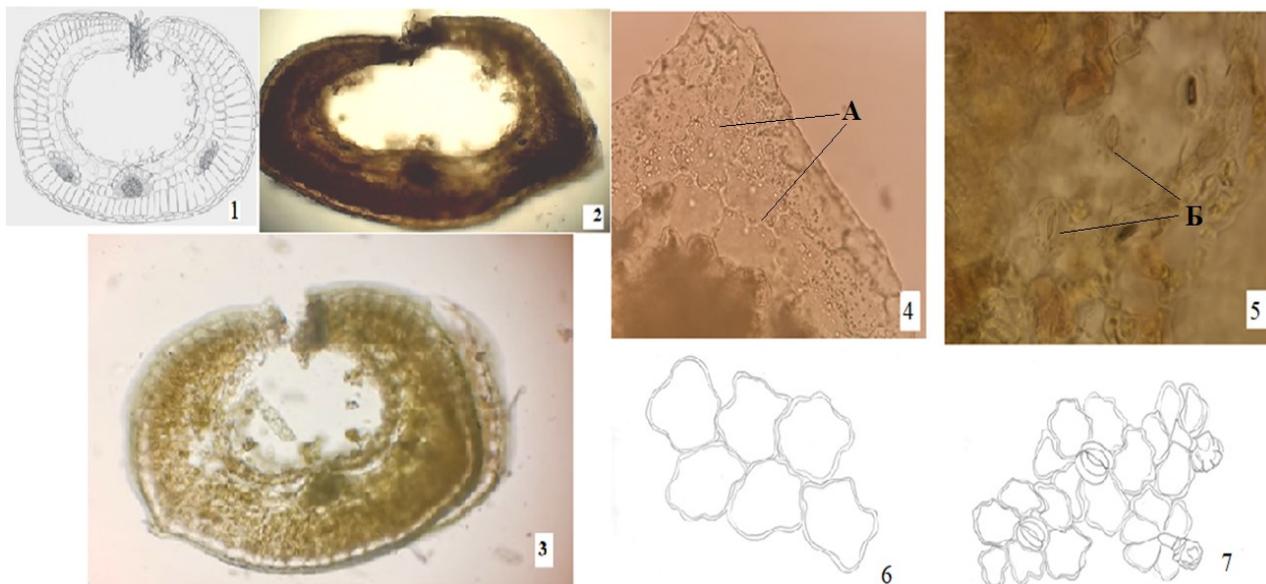


Рисунок 3 – Строение верхней и нижней эпидермы листовая пластинки *Empetrum nigrum*, собранных на территории Магаданской области: 1,2 – верхняя эпидерма листовая пластинки основные клетки, 3,4 – нижняя эпидерма листовая пластинки; А- основные клетки эпидермы, Б- устьичный аппарат.

Плоды шикши состоят из околоплодника и семян. Околоплодник дифференцирован на три части: экзокарп – внешняя часть; мезокарп – средняя часть, и эндокарп – внутренняя часть. Экзокарпий однослойный, представлен мелкими многогранными клетками, удлиненной формы. Клеточные стенки утолщены. Мезокарпий представлен 3-5 слоями клеток, и дифференцирован на 2 зоны. Наружная зона представлена 10-12 слоями крупных клеток слабо удлиненных. Клеточные стенки слабо утолщены, не одревесневают. Внутренняя зона представлена 4-5 слоями клеток веретеновидной формы, вытянутых вдоль оси плода, клеточные стенки также утолщены. Эндокарпий однослойный, представлен клетками в веретеновидной форме, вытянутых вдоль оси плода. Стенки клеток утолщены и одревесневают. Форма на поперечном срезе округлая, состоит из первичной и вторичной коры, камбия, пробки и наружной сердцевины [8] (Рис. 4).

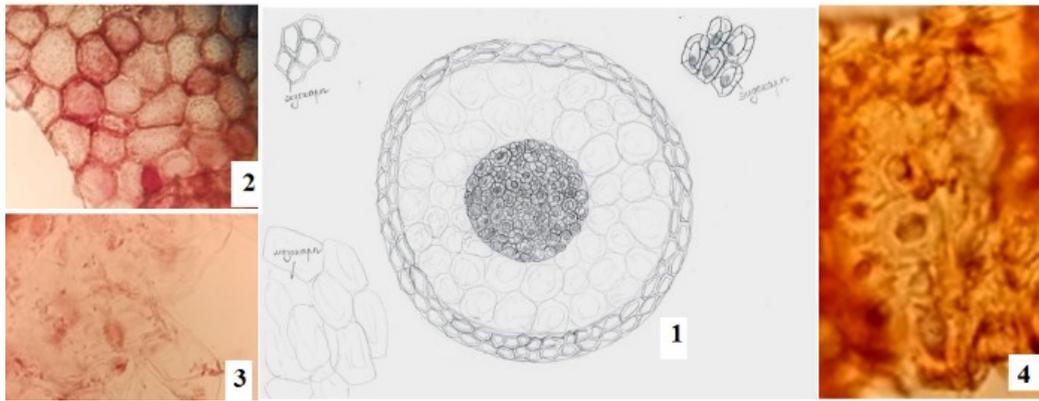


Рисунок 4 – Строение плодов *Empetrum nigrum*, собранных на территории Магаданской области: 1-схема поперечного среза плода, 2 – клетки экзокарпа, 3-клетки мезокарпа, 4- клетки эндокарпа.

Форма стебля на поперечном срезе округлая, состоит из покровной ткани перидермы, коры и центрального цилиндра. Проводящая система имеет непучковое строение, тип стели – сифоностель. Хорошо развита паренхима ксилемы, заметны 3 -5 годичных колец. Стебель в нижней части многолетний, имеет вторичное строение, хорошо развита покровная ткань перидерма, она представлена несколькими слоями прямоугольных клеток. Клеточная стенка пропитана суберином. Клетки расположены в 3-4 слоя проводящая система представлена флоэмой и ксилемой, образующей сифоностель [6]. (Рис. 5)

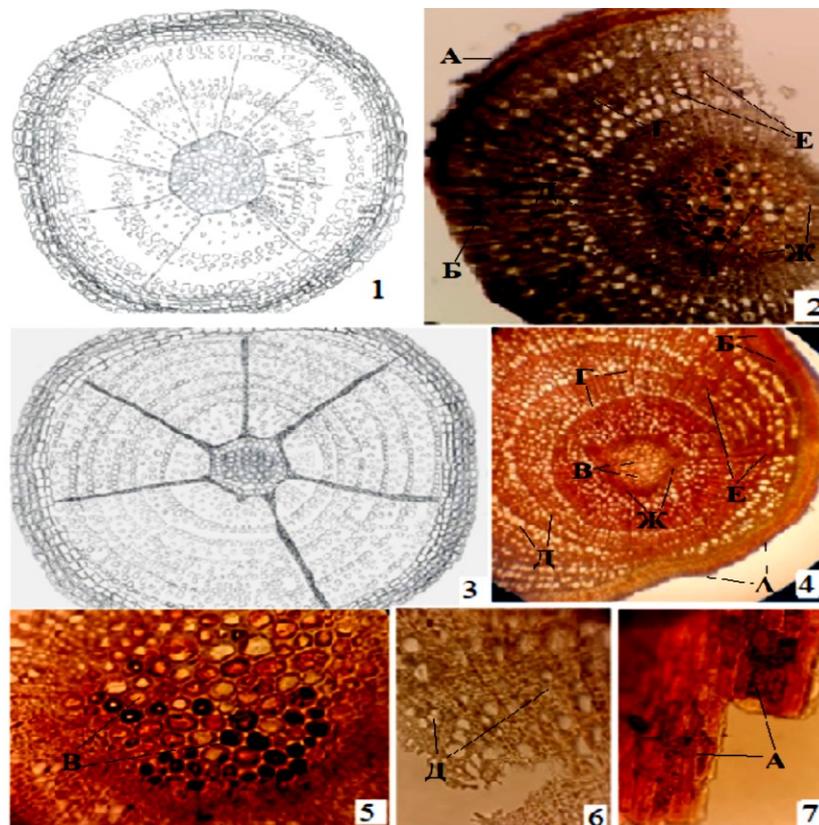


Рисунок 5 – Поперечный срез стебля *Empetrum nigrum* в нижней части: 1 – схема поперечного среза стебля, 2-5- фотографии поперечного среза стебля А- перидерма, Б- колленхима, В- флоэма, Г- камбий, Д- ксилема, Е- сердцевинные лучи, Ж- паренхима сердцевины.

В заключении следует отметить, что проведенные эколого-морфологические исследования могут быть использованы при составлении нормативной документации на лекарственное растительное сырье.

Библиографический список

1. Анатомия коры представителей семейства Ericaceae, произрастающих на сахалине и курильских островах //Бот.журнал, 2012.-т.97.,№8.-с.1061-1079.
2. Флора СССР. В 30т. / под редакцией акад. В. Л. Комарова; Ред. Тома Б. К. Шишкин: Изд-во АН СССР, 1952. – Т. 18.
3. Altay, Ozdemir C (2004) Morphological and anatomical studies on economically important *Empetrum nigrum* L. subsp. *Hermaphroditum* (hagerup) bocher (empetraceae). *Econ Bot* 58(4):679-683. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)058\[0679:MAASOE\]](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)058[0679:MAASOE])
4. Anderberg A (1994) Phylogeny of the Empetraceae, with special emphasis on character evolution in the genus *Empetrum*. *Syst Bot* 19:35–46. <https://doi.org/10.2307/2419710>
5. Li, J. H. et al. 2002. Phylogenetic relationships of Empetraceae inferred from sequences of chloroplast gene *matK* and nuclear ribosomal DNA ITS region. *Molec. Phylogen. Evol.* 25: 306-315.
6. Morphological and anatomical studies on economically important *Empetrum nigrum* l. subsp. *hermaphroditum* (hagerup) bocher (empetraceae). yasin altan and canan zdemir// *Economic Botany* 58(4) pp. 679-683. 2004.
7. Phytochemistry, ethnopharmacology and pharmacology of the genus *Empetrum*: a review E. A. Bezverkhniaia, E.V. Ermilova, T. V. Kadyrova// *Advances in Traditional Medicine* <https://doi.org/10.1007/s13596-021-00612-4>
8. Sales ooo Epicuticular wax alkanes of Ericaceae and *Empetrum* from alpine and subalpine heaths in Austria // *Plant Syst. Evol.*- 1989.- vol. 163:71-79. <https://doi.org/10.1007/BF00936154>.

МОДИФИКАЦИЯ СТАВ-МЕТОДА НА МОДЕЛИ СЕМЯН СОИ СОРТА «ЛИДИЯ»

Тимкин П.Д., Пензин А.А.

Всероссийский научно-исследовательский институт сои, Благовещенск, Россия

Аннотация. В работе описывается опыт выделения ДНК из семян сои, модифицированным СТАВ-методом на примере амплификации маркера Satt1. Для проведения ПЦР анализов имеется необходимость в быстрой и качественной экстракции ДНК. Наиболее распространенным образцом для выделения ДНК является зеленый лист, который можно получить методом проращивания семян в течение 8-10 суток. Преимуществами такого метода является получение большого количества очищенной ДНК. Однако недостатками можно отметить длительный срок.

Ключевые слова: соя, выделение ДНК, Satt1, СТАВ-метод.

MODIFICATION BY THE CTAB-METHOD ON THE MODEL OF SEEDS OF THE VARIETY «LYDIA»

Timkin P.D., Penzin A.A.

Federal Scientific Center All-Russian Research Institute of Soybean, Blagoveshchensk, Russia

Abstract. The paper describes the experience of isolating DNA from soybean seeds using the modified CTAB method using the example of amplification of the Satt1 marker. For PCR analysis, there is a need for fast and high-quality DNA extraction. The most common sample for DNA extraction is a green leaf, which can be obtained by germinating seeds within 8-10 days. The advantage of this method is to obtain a large amount of purified DNA. However, the disadvantages can be noted a long time.

Keywords: soybean, extraction DNA, Satt1, CTAB – method.

Протоколы, использующиеся в лаборатория для экстракции ДНК, имеют много модификаций и видов [1]. В данной работе описывалась модификация СТАВ-метода как наиболее подходящего для выделения нуклеиновых кислот из растительных культур [2]. Решение о проведение оптимизации протокола, вызвано тем что ввиду сложного технического исполнения классического получение биоматериала, путем проращивания семян, с целью получить первый настоящий лист сои, занимает много времени даже с учетом отсутствия погрешностей в исполнение. В случае же погрешностей процесс до начала выделения может затянуться вплоть до месяца, до тех пор, пока самые удачные образцы не дадут зеленые листья. Такой способ дает на выходе большое количество очищенной ДНК. Эту проблему можно решить если начать выделять нуклеиновые кислоты из самих семян сои. Сложность выделения ДНК из семян заключается в высоком содержании протеинов, липидов, углеводов и т.д. Для

осаждения большого количества не целевых фракций было принято решение адаптировать и оптимизировать соотношение растворителей в классическом протоколе, предназначенного для СТАВ-метода. В качестве контрольного маркера для амплификации использовался SSR (Simple sequence repeats) – Satt1 [3].

Для проведения опытов были подготовлены 4 пробы сорта Лидия, по 0,025г в каждой. Первый образец – семена измельченные до состояния муки, второй образец – предварительно замоченные на 12 часов, гомогенизированные до состояния каши семена сои. Третий и четвертый образцы идентичны первому и второму соответственно, за исключением того, что в них помимо прочего, перед этапом измельчения, применялась заморозка при -86 °С (Таблица).

Таблица – Схема подготовки проб

Проба №	Условия
1	Семена измельченные до состояния муки
2	Семена замоченные на 12 часов и гомогенизированные до состояния каши
3	Предварительно замороженные до -86°С семена, измельченные до состояния муки
4	Семена замоченные на 12 часов, замороженные при 86°С и гомогенизированные до состояния каши
к	Пустая проба

Этап выделения нуклеиновых кислот проходил по модифицированному протоколу СТАВ-метода:

1. 0.025 мг образца поместить в пробирки «Эпшендорф» объемом 2,0 мл.
2. Добавить 200 мкл ТЕ и 800 мкл лизирующего буфера. Инкубировать 1 час при 65 °С.
3. Охладить до комнатной температуры, добавить 800 мкл хлороформа, смешивать 2 минуты при помощи вортекса, центрифугировать 5 мин при 12 тыс. об/мин.
4. Отобрать пипеткой верхнюю водную фазу (350 мкл), содержащую ДНК, в чистую пробирку.
5. Добавить двойной объем (700 мкл) буфера для осаждения, перемешать и оставить на столе 1,5-2 часа.
6. Отделить ДНК в настольной центрифуге 10 мин при 12 тыс. об/мин, осторожно аспирировать супернатант.
7. Осадок ДНК растворить в 100 мкл высокосолевого буфера ТЕ.
8. Осадить ДНК 0,8-1 объемом изопропанола (100 мкл) (или 2,5-3 объемами этилового спирта), центрифугировать в течение 10 мин при 12 тыс. об/мин.
9. Осадок ДНК промыть 2-3 раза 75 % спиртом, высушить и растворить в 50 мкл стерильной воды.

Определение наличия ДНК проводили путём электрофореза в 2% агарозном геле, окрашенного бромистым этидием с применением камеры для горизонтального электрофореза SE-1 при напряжении 100V и силе тока 50А в течение 40 минут [4]. Визуализацию результатов осуществляли с помощью гель-документирующей системы Geldoc (Рис. 1).

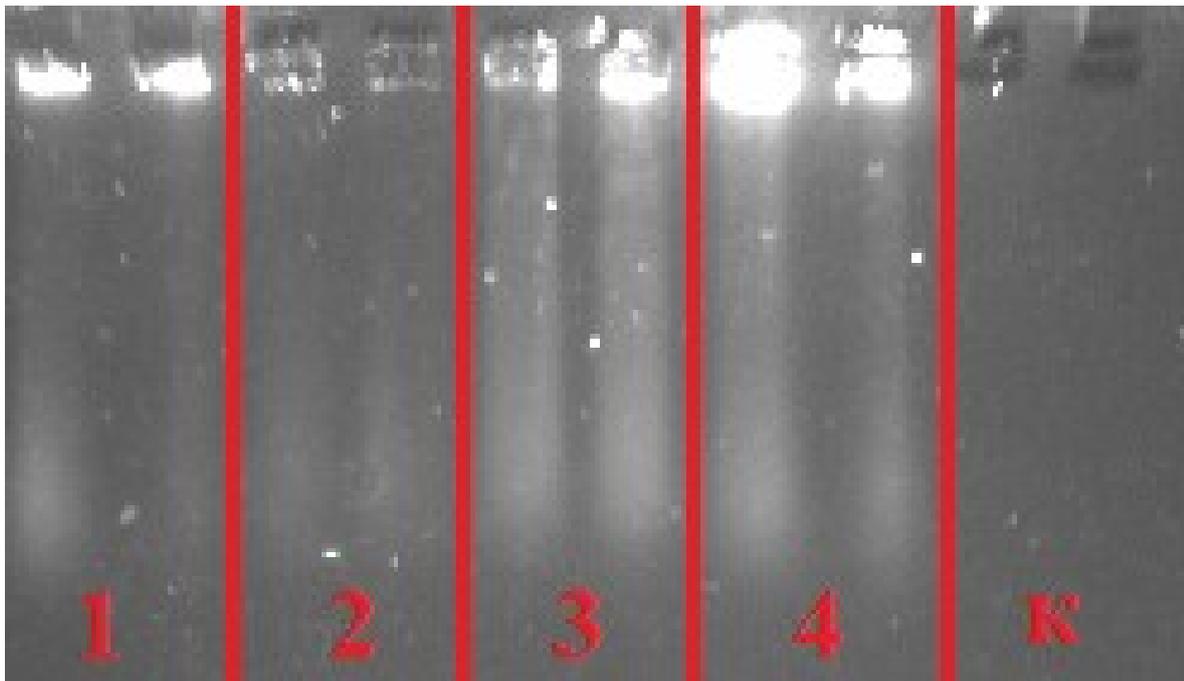


Рисунок 1 – Электрофореграмма наличия ДНК.

Полученная электрофореграмма показывает наличие ДНК во всех четырех образцах. Однако следует отметить, что третий и четвертый образцы обладали большей яркостью свечения, что свидетельствует о большей, по отношению к первым и вторым образцам, концентрации ДНК.

Аmplification выделенных проб ДНК сои проводили при следующих режимах: начальная денатурация – при 95 °С в течение 2 мин, затем 40 циклов при температурно-временном режиме: денатурация при 95 °С – 20 сек, отжиг праймера при 60 °С – 30 сек, элонгация – при 72 °С в течение 1 мин; финальная элонгация – при 72 °С в течение 5 мин. При объеме реакционной смеси 25 мкл, которая включала в себя: 12,5 мкл готовой реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (ООО «Биолабмикс», Россия); 1 мкл образца выделенной ДНК; по 1 мкл прямого и обратного праймеров; 9,5 мкл стерильной воды.

Успешное проведение амплификации зависит от множества факторов, в том числе и от чистоты, используемой ДНК, проверка степени очистки которой была выполнена путем амплификации проб с использованием праймера Satt1 [5]. Анализ электрофореграммы осуществляется с помощью Image lab, программы для анализа и визуализации электрофореза (Рис. 2).

После электрофоретического разделения амплифицированных проб было выявлено, что во всех образцах наблюдались достаточно различимые фрагменты, находящиеся в характерной для выбранного праймера диапазоне длин (150 bp). Однако на электрофореграмме у первого и второго образцов отчетливо видны инородные примеси, которые не столь выражены у третьего и четвертого образцов. Более того амплифицированный фрагмент обладал более интенсивным свечением и, соответственно, был лучше выражен у третьей и четвертой пробы. На основании полученных экспериментальных данных, можно сделать вывод о том, что применение модифицированного СТАВ метода позволяет эффективно выделять ДНК из бобов сои.

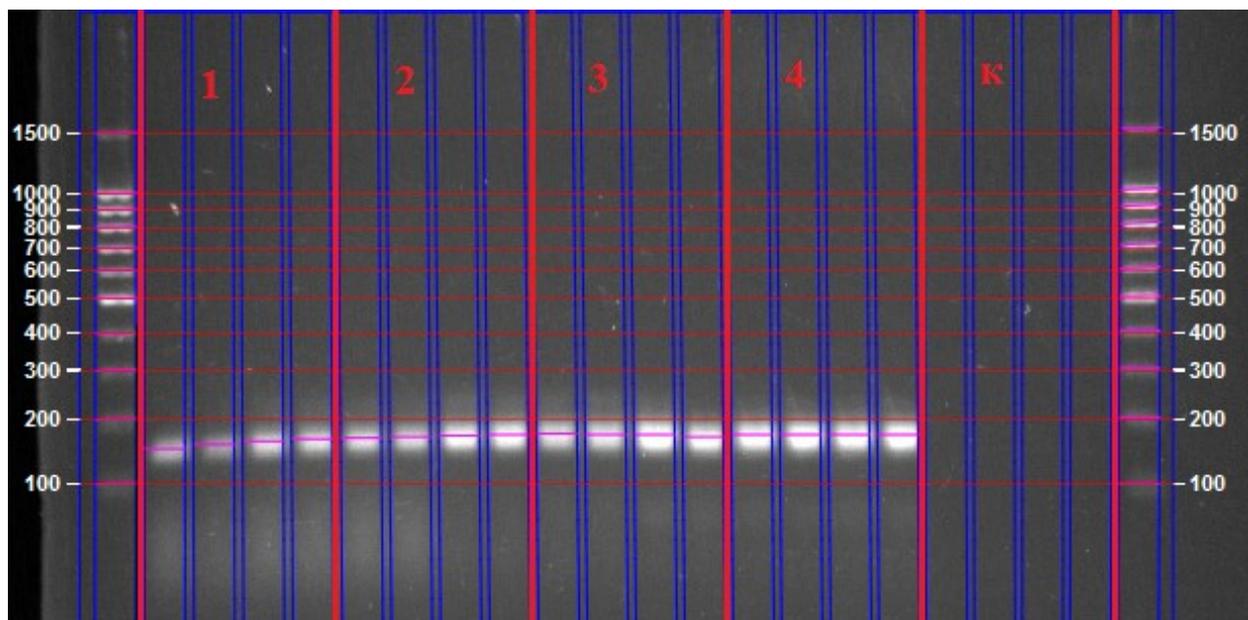


Рисунок 2 – Электрофореграмма ампликонов Satt1.

Следует отметить что наиболее продуктивно было использование как сухих семян, так и предварительно замоченных на 12 часов семян, прошедших заморозку при -86°C . Заморозка семян позволила увеличить конечную концентрацию ДНК, а также уменьшило количество побочных фракций. Данный эффект может быть объяснён тем, что при воздействии экстремально низких температур разрушается клеточная ткань, что в последующем упрощает гомогенизацию до образования однородной массы.

Библиографический список

1. Xia, Y., Chen, F., Du, Y., Liu, C., Bu, G., Xin, Y. and Liu, B., 2019. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean. *Bioscience Reports*, 39(2).
2. Aboul-Maaty, N.AF., Oraby, H.A.S. Extraction of high-quality genomic DNA from different plant orders applying a modified CTAB-based method. *Bull Natl Res Cent* 43, 25 (2019).
3. Савиченко, В. Г. Идентификация сортов сои селекции ВНИИМК методом микросателлитного анализа / В. Г. Савиченко, С. А. Рамазанова // Актуальные вопросы биологии, селекции, технологии возделывания и переработки сельскохозяйственных культур : Сборник материалов 11-й Всероссийской конференции молодых учёных и специалистов, Краснодар, 25–26 февраля 2021 года. – Краснодар: Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт масличных культур имени В.С. Пустовойта», 2021. – С. 97-101. – DOI 10.25230/conf11-2021-97-101. – EDN PAFHQL. Alicia Grealy 2% Agarose Gel Electrophoresis <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bdmki44w>
4. Подбор микросателлитных локусов ДНК для создания молекулярно-генетических паспортов диких форм и сортов сои амурской селекции / О. Н. Бондаренко, А. А. Блинова, Л. Е. Иваченко, С. И. Лаврентьева // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2022. – № 2(222). – С. 37-48. – DOI 10.37102/0869-7698_2022_222_02_3. – EDN TJLSZW.

ТЁМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН

Хайруллин Б.И.

Казанский (Приволжский) Федеральный Университет, Казань, Россия

Аннотация. Одной из ключевых проблем в экологии, имеющей также и большое практическое природоохранное значение, является объяснение формирования видового разнообразия сообществ. В данной статье оценивается тёмное разнообразие целевых фитоценозов Республики Татарстан, выявлены и описаны основные закономерности его формирования в зависимости от факторов среды.

Ключевые слова: тёмное разнообразие, биоразнообразие, пул видов.

DARK DIVERSITY OF PLANT COMMUNITIES OF THE REPUBLIC OF TATARSTAN

Khairullin B. I.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Kazan (Volga Region) Federal University», Kazan, Russia

Abstract. One of the key problems in ecology, which is also have a great practical environmental importance, is the explanation of the formation of the species diversity of plant communities. This article evaluates the dark diversity of the target phytocenoses of the Republic of Tatarstan, identifies and describes the main patterns of its formation depending on environmental factors.

Keywords: dark diversity, biodiversity, species pool.

Классические подходы в оценке биоразнообразия основаны на подсчёте числа видов на определённой территории, которое может проводиться с помощью самых различных полевых методов. Однако полнота выявления всего возможного состава биоты часто бывает недостаточной в виду самых различных причин – нехватки времени и ресурсов для детального обследования, нерепрезентативного количества выборок (как в пространстве, так и во времени), ошибок в идентификации видов, особенностей сезонной или многолетней динамики популяций, так как не все виды проявляют себя в сообществе в момент наблюдений и т.д.

Важнейшим фактором здесь является полнота выявления флоры, однако флора – явление динамичное, отдельные виды выпадают из её состава в то время, как другие появляются. Таким образом, объект исследования постоянно изменяется в то время, пока исследователь пытается как можно более полно выявить его состав. Те виды, которые остались незарегистрированными, но потенциально способные существовать в исследуемых сообществах, образуют так называемое «тёмное разнообразие» [1,2].

Тёмное разнообразие по определению не наблюдаемо, по крайней мере, с абсолютной уверенностью, и может только оцениваться. Из-за этого тёмное разнообразие может быть определено как нечеткое множество, где степень уверенности в принадлежности к виду

выражается как вероятность. Информация о тёмном разнообразии может обеспечить лучшее понимание того, как экологические сообщества фактически формируются.

Понятие «тёмное разнообразие» впервые использовал М. Пяртель [1], понимая под этим набор видов, отсутствующих в фокусном сообществе, но принадлежащих к его видовому пулу (присутствуют в окружающем ландшафте или регионе). Это та часть пула видов, которая проходит через абиотические и биотические «фильтры» [2], но по каким-то причинам отсутствует в составе рассматриваемых сообществ. Таким образом, тёмное разнообразие может быть оценено как разница между составом пула видов и наблюдаемым разнообразием.

Существует широко известный подход фитосоциологического сходства и представляется наиболее перспективным, так как используется модель совместного возникновения видов [3]. Здесь отсутствующий вид считается частью пула видов, если он обычно встречается с наблюдаемыми видами, присутствующими в целевом сообществе [4,5]. Вероятность присутствия вида оценивается по индексу Билса [6]. Индекс рассчитывается по формуле (1) [7]:

$$b_{ij} = \frac{1}{S_i} \sum_k \frac{M_{ij}}{N_k}, (1)$$

где – b_{ij} вероятность вида j встретится на площадке i ; S_i – количество видов на площадке i ; M_{ij} – количество совместных встреч видов j и k ; N_k – количество встреч вида k на всех площадках.

В качестве исходных данных для построения вероятностного пула используются геоботанические описания, представленные в виде матрицы. На пересечениях строк и столбцов для присутствующих видов указывается «1», для отсутствующих – «0». В результате обработки с помощью алгоритма сглаживания элементы матрицы заменяются вероятностями от 0 до 1. Вероятности, прогнозируемые индексом Билса, коррелируют с частотой вида в рассматриваемом наборе данных, поэтому было рекомендовано некоторыми авторами [8,9] установить пороговое значение вероятности для конкретного вида. Функция `beals` [7] для расчёта индекса доступна в составе пакета `vegan` [10] в среде статистического программирования R [11]. Сглаживание Билса заменяет наблюдаемое наличие либо отсутствие видов на вероятности их возникновения, которая рассчитывается исходя из совместного появления вида с другими видами в наборе данных [6,12].

Тёмное разнообразие является сутью концепции пула видов, когда на каждый конкретный участок или место обитания оказывает сильное влияние его «собственный» набор ожидаемых в наблюдениях видов [13,14].

Сведения о распространении видов обычно представлено записями об их встречах в заданном пространственном и временном масштабе. Такие данные неполны и зависят от пространственно-временных обстоятельств, в которых проводились наблюдения. В настоящее время некоторые учёные утверждают, что эта неопределенность существует, и оправдывает рассмотрение распространения видов как аналога когерентных квантовых объектов, распределение которых лучше описывается волновой функцией, а не набором местоположений [15]. В соответствии с такой предпосылкой, что организмы не перемещаются и не распространяются полностью детерминированным образом, географическое распределение организмов можно смоделировать аналогично вероятности появления частицы в квантовой механике. Но следует учесть, что различия между видами и частицами явно важны, поэтому такое сравнение вышеупомянутых скорее концептуальное, чем реальное. Фактически, в литературе есть прецедент: функция благоприятствования [16], который

представляет собой потенциал для наблюдения и, следовательно, может рассматриваться как аналог волновой функции. Функция благоприятствования устраняет влияние распространенности (т.е. доли наблюдаемых присутствий) из вероятностей, полученных с помощью любого математического метода, что позволяет проводить прямые количественные сравнения между прогнозами для разных видов.

Следует отметить, что тёмное разнообразие можно использовать для получения релятивизированного индекса биоразнообразия, называемого «полнотой», т.е. насколько полно местообитание или регион относительно его соответствующего видового пула. Для оценки того, какая часть пула фактически реализована на участке, был предложен «индекс полноты разнообразия местообитания» [17] формула которой представлена ниже.

$$CCI = \ln\left(\frac{OR}{DD}\right), (2)$$

где OR – наблюдаемое видовое разнообразие; DD – тёмное разнообразие.

Идея полноты сообщества (и даже сам термин) произошли из ранней отечественной экологии растительных сообществ. Раменский [18] определил полноту, по-другому «полночленность», как ситуация, при которой все потенциальные обитатели, способные рассредоточиться в сообществе и населить его, то есть, преодолеть как абиотический, так и биотический фильтры, фактически присутствуют в сообществе.

Выбор района исследования и целевых и примыкающих участков проводился согласно протоколу международного проекта «DarkDivNet» от 11 декабря 2018 года. DarkDivNet – глобальное сотрудничество исследователей, интересующихся тёмным разнообразием. Он включает глобально воспроизведённые обследования растительности, охватывающие как локальные, так и региональные масштабы [19]. Целевой участок исследования ограничен кругом, радиус которого 10 км и включает в себя как минимум 30 геоботанических описаний.

В качестве материалов для исследования использовались геоботанические описания из БД «Флора» [20,21]. Из всей базы данных были выбраны площадки размером 10 x 10 м в радиусе 10 км от которых имеется не менее 30 площадок такой же площади. Таким образом были определены целевые площадки, которые подходили для оценки тёмного разнообразия. Для каждой из таких площадок были выбраны в радиусе 10 км площадки с уникальными типами растительных формаций и число площадок было доведено до 30 случайным образом из всех оставшихся. В результате было отобрано 259 геоботанических описаний.

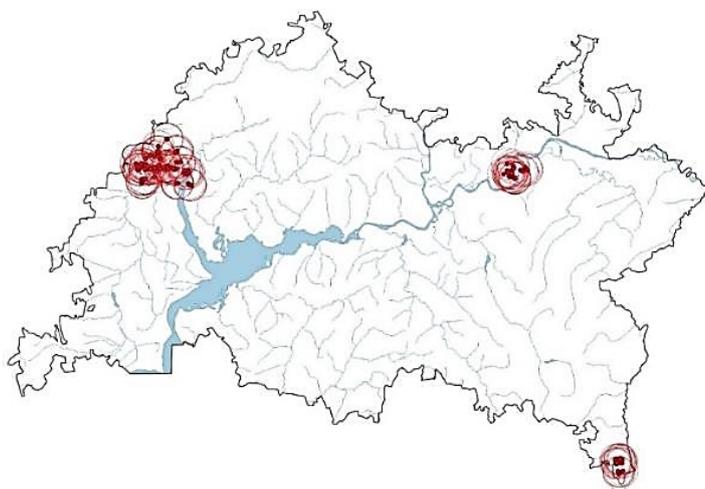


Рисунок 2 – Карта расположения целевых площадок на территории Республики Татарстан и буферами вокруг них с радиусом 10 км.

Для каждого из 259 целевых сообществ были составлены матрицы (строки – геоботанические площадки, столбцы – виды), содержащие в себе по 30 геоботанических описаний. Оценка пула видов и темное разнообразие на каждой площадке было рассчитано с использованием трёх методов, представленных в пакете DarkDiv [22] в среде статистического программирования R Statistics [11]. Методы, включенные в пакет, следующие:

Гипергеометрический – метод основан на сравнении для каждой пары видов их реализованного числа совпадений с тем, которое ожидалось бы случайным образом, то есть, если бы не было связи между видами. Ожидаемое число совпадений определяется средним значением гипергеометрического распределения. Затем разница между наблюдаемыми и ожидаемыми совпадениями выражается в виде вероятности, и создается матрица индикации, показывающая силу связи между парами видов. Впоследствии, вероятности принадлежности к местному тёмному разнообразию присваиваются отсутствующим видам на основе средних значений показателей видов, которые наблюдались на каждом участке [22].

Второй метод основан на вычислении частоты совместной встречаемости видов методом сглаживания Билса [6].

Метод благоприятствования – коррекция благоприятности [15] может быть применена к индексам, на которые влияет распространенность видов, чтобы превратить их в чистые показатели пригодности местных условий для каждого конкретного вида. По сути, это информирует о том, более или менее вероятно, что вид будет найден на исследуемом участке, чем случайные ожидания. В пакете DarkDiv метод благоприятствования сначала оценивает значения вероятности, которые были рассчитаны методом сглаживания Билса, а затем применяет коррекцию благоприятности.

Для получения значений факторов среды в пространстве использовалась модель WorldClim [23]. Для нахождения зависимостей между оценочными значениями тёмного разнообразия и климатических факторов были учтены такие климатические показатели как средняя ежемесячная температура (TAVG), минимальная ежемесячная температура (TMIN), максимальная ежемесячная температура (TMAX), среднемесячные осадки (PREC), давление водяного пара (VAPR) и биоклиматические характеристики (BIO), производные от вышеуказанных параметров. Относительное тёмное разнообразие было посчитано путем деления тёмного разнообразия видов на наблюдаемое разнообразие. Для получения значений климатических переменных WorldClim в местоположениях целевых сообществ использовалась свободная географическая информационная система с открытым кодом QGIS версии 3.18.3 [24]. Для расчета условий среды по шкалам Цыганова и оценки гемеробиальности сообществ использован модуль анализа видового разнообразия (MABP) информационной системы «Флора». Степень гемеробии является «комплексной мерой воздействия всех вмешательств человека на экосистемы, независимо от того, предназначены они для этого или нет. Степень гемеробии является результатом воздействия на конкретную область и организмы, которые её населяют [25] и увеличивается с ростом антропогенного влияния. Степень гемеробии измеряется такими показателями, как доля неофитных и терафитных видов, морфологическими и химическими особенностями почвы и учитываются типы землепользования. Шкала гемеробии имеет 7 степеней по Яласу [26].

Статистический анализ и его визуализация были проведены в пакете Statistica [27].

На 259 площадках было зафиксировано 633 вида растений, что составляет 39.3% от всей флоры Республики Татарстан. В результате расчетов для каждого из 259 площадок были рассчитаны наблюдаемое разнообразие (sa), тёмное разнообразие видов (sd) и относительное тёмное разнообразие сообществ (dd). Результаты расчетов актуального и темного

разнообразий, также относительного темного разнообразия сообществ всеми тремя методами показали нормальное распределение данных, рассчитанные средние значения относительного тёмного разнообразия сообществ колеблются от 0,51134 до 0,8228. Сравнительный график выборок рассчитанных значений относительного тёмного разнообразия сообществ методами благоприятствования (dd (f)), сглаживания Билса (dd (rb)) и гипергеометрическим (dd (h)) представлены на рисунке 2. Средние значения, полученные расчетом тремя разными методиками, не сильно отличаются от медиан, это говорит о том, что велика вероятность нормального распределения данных, также были рассчитаны другие статистические параметры выборок.

Во-первых, все три метода оценки темного разнообразия показали нормальное распределение данных. Во-вторых, с моделью WorldClim нет значимых корреляций. В то же время относительное тёмное разнообразие сообществ, посчитанная гипергеометрическим методом, увеличивается с повышением класса континентальности по шкале Цыганова. Также результаты оценки относительного темного разнообразия сообществ тремя методами показали статистически значимые зависимости, что с увеличением классов азотообеспеченности и освещенности по шкалам Цыганова относительное тёмное разнообразие сообществ также увеличивается. Результаты показали, что с увеличением доли стенобионтных видов в сообществе экспоненциально увеличивается относительное темное разнообразие (dd) сообщества. Также распределение растительных формаций по значениям медиан относительного тёмного разнообразия сообществ у каждого метода уникальное, но несмотря на это, наблюдается общая закономерность, что в водных формациях более высокие значения относительного тёмного разнообразия. В дополнении ко всему, с увеличением нарушенности (гемеробиальности) относительное тёмное разнообразие (dd) сообществ увеличивается.

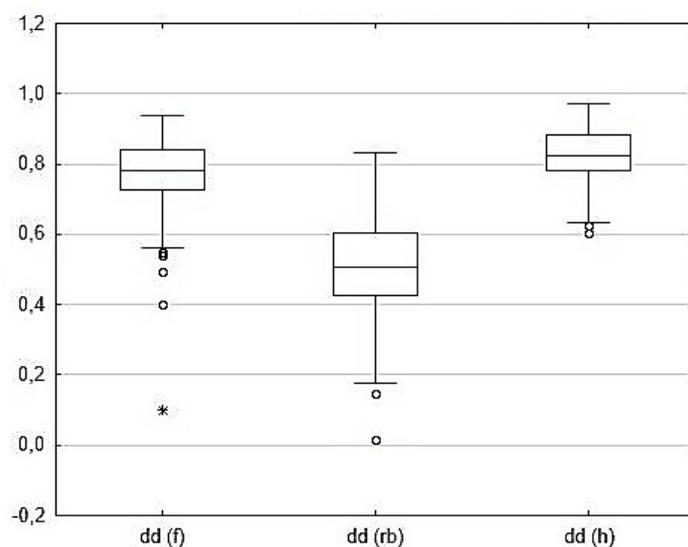


Рисунок 3 – Сравнительный график результатов, полученных разными методами.

Библиографический список

1. Pärtel M., Szava-Kovats R., Zobel M. Dark diversity: shedding light on absent species // Trends in Ecology and Evolution. – 2011. – V. 26. – P. 124-128.
2. Zobel M. The species pool concept as a framework for studying patterns of plant diversity // Journal of Vegetation Science. – 2016. – V. 27. – P. 8-18.

3. Diamond J.M., Cody M.L. *Assembly of Species Communities // Ecology and Evolution of Communities*, Harvard University Press. – Boston. – 1975. – P. 342-344.
4. Ewald J. A probabilistic approach to estimating species pools from large compositional matrices // *Journal of Vegetation Science*. – 2002. – V. 13. – P. 191-198.
5. Riibak K., Reitalu T., Tamme R., Helm A., Gerhold P., Znamenskiy S. Dark diversity in dry calcareous grasslands is determined by dispersal ability and stress-tolerance // *Ecography*. – 2015. – V. 38. – P. 713–721.
6. Beals E.W. Bray-Curtis-ordination: an effective strategy for analysis of multivariate ecological data // *Advances in Ecological Research*. – 1984. – V. 14. – P. 1-55.
7. De Cáceres M., Legendre P. Beals smoothing revisited // *Oecologia*. – 2008. – V. 156. – P. 657-669.
8. Lewis R.J., Szava-Kovats R., Partel M. Estimating dark diversity and species pools: an empirical assessment of two methods // *Methods in Ecology and Evolution*. – 2016. – V. 7, № 1. – P. 104-113.
9. Münzbergová Z., Herben T. Identification of suitable unoccupied habitats in metapopulation studies using co-occurrence of species // *Oikos*. – 2004. – V. 105, № 2. – P. 408-414.
10. Oksanen J., Guillaume Blanchet F., Friendly M., Kindt R., Legendre R., McGlinn D., Minchin P.R., O'Hara R.B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H.H., Szoecs E., Wagner H. *vegan: Community Ecology Package. Ordination methods, diversity analysis and other functions for community and vegetation ecologists*. – 2017. R package version 2.5-7. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=vegan> (дата обращения 25.09.2022).
11. R Core Team. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. – Vienna. – 2020. URL <https://www.R-project.org/> (дата обращения 25.09.2022).
12. McCune B. Improving community analysis with the Beals smoothing function // *Ecoscience*. – 1994. – V. 1. – P. 82–86.
13. Eriksson O. The species-pool hypothesis and plant community diversity // *Oikos*. – 1993. – V. 68. – P. 371-374.
14. Zobel M. The relative role of species pools in determining plant species richness: an alternative explanation of species coexistence // *Trends Ecological Evolution*. – 1997. – V. 12. – P. 266-269.
15. Real R., Barbosa A.M., Joseph W. Species Distributions, Quantum Theory, and the Enhancement of Biodiversity Measures // *Systematic Biology*. – 2017. – V. 66, Issue 3. – P. 453–462. URL: <https://doi.org/10.1093/sysbio/syw072> (дата обращения 25.09.2022).
16. Real R., Barbosa A.M., Vargas J.M. Obtaining Environmental Favourability Functions from Logistic Regression // *Environmental and Ecological Statistics*. – 2006. – V. 13. – P. 237–245. URL: <https://doi.org/10.1007/s10651-005-0003-3> (дата обращения 25.09.2022).
17. Pärtel M., Szava-Kovats R., Zobel M. Community completeness: linking local and dark diversity within the species pool concept // *Folia Geobotanica*. – 2013. – V. 48. – P. 307–317.
18. Раменский Л.Г. Основные закономерности растительного покрова и методы их изучения (на основании геоботанических исследований в Воронежской губернии) // *Вестник опытного дела Среднечерноземной области*. – 1924. – С. 37–73.
19. Pärtel M., Carmona C.P., Zobel M., Moora M., Riibak K., Tamme R. DarkDivNet – A global research collaboration to explore the dark diversity of plant communities // *Journal of Vegetation Science*. – 2019. – V. 30, № 5. – P. 1039-1043.
20. Рогова Т. В., Прохоров В. Е., Шайхутдинова Г. А., Шагиев Б. Р. Электронные базы фитоиндикационных данных в системах оценки состояния природных экосистем и

- ведения кадастров биоразнообразия // Учёные записки Казанского государственного университета. – 2010. – т. 152, кн. 1, сер. естественные науки. – С. 174-181.
21. Prokhorov V. E., Rogova T. V., Kozhevnikova M. V. Vegetation Database of Tatarstan // Phytocoenologia. – 2017. – V. 47, № 3. – P. 309-313.
 22. Carmona P. C., Partel M. Estimating Dark Diversity and Site-Specific Species Pool. – 2020. R package version 0.3.0. URL: <https://CRAN.R-project.org/package=DarkDiv> (дата обращения: 25.09.2022).
 23. WorldClim. URL: <https://worldclim.org/> (дата обращения: 25.09.2022).
 24. QGIS Development Team, 2004-2014. URL: <https://www.qgis.org/ru/site/> (дата обращения: 25.09.2022).
 25. Sukopp H. Dynamik und Konstanz in der Flora der Bundesrepublik Deutschland, Schr.-R. // Vegetationskunde. – 1976. – V. 10. – P. 9-27.
 26. Frank D., Klotz S. Biologisch-okologische Daten zur Flora der DDR (2.Aufl.) // Wiss. Beitr. Univ. Halle. – 1990. – 167 p.
 27. StatSoft Russia, 1999-2022. URL: <http://statsoft.ru/> (дата обращения: 25.09.2022)

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *PINUS SYLVESTRIS* L. В ПЕРМСКОМ КРАЕ

Чертов Н.В., Боронникова С.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. В ходе исследования было изучено шесть популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Пермском крае. Выявлен высокий уровень генетического разнообразия ($I = 0,286$; $H_e = 0,178$; $n_e = 1,265$). Изученные популяции слабо дифференцированы ($G_{ST} = 0,156$), что может быть связано со схожестью мест произрастания.

Ключевые слова: Генетическое разнообразие, ISSR, *Pinus sylvestris* L.

GENETIC DIVERSITY AND POPULATION DIFFERENTIATION *PINUS SYLVESTRIS* L. IN THE PERM TERRITORY

Chertov N.V., Boronnikova S.V.

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National
Research University, Perm, Russia.*

Annotation. During the study, six populations of Scotch pine (*Pinus sylvestris* L.) were studied in the Perm Krai. A high level of genetic diversity was revealed ($I = 0.286$; $H_e = 0.178$; $n_e = 1.265$). The studied populations are poorly differentiated ($G_{ST} = 0.156$), which may be due to the similarity of habitats.

Keywords: Genetic diversity, ISSR, *Pinus sylvestris* L.

Изучение генетического разнообразия, внутри- и межвидовой дифференциации видов хвойных растений, имеющих большое биосферное и ресурсное значение, является одной из важных задач популяционной биологии. Сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) – один из наиболее широко распространенных экономически важных лесобразующих видов растений России, играющий исключительно важную роль в формировании структуры и функций лесных экосистем [1].

Россия, являющаяся крупнейшей лесной державой, располагает почти 1/4 всех лесных ресурсов планеты. На территории России сосредоточено 2/3 общей площади бореальных лесов и до 80% общих запасов древесины хвойных пород, имеющих важное хозяйственное значение [2]. Несмотря на то, что лес – возобновляемый ресурс, количество вырубок превышает количество новых посадок (возобновлений).

Только на основании точных сведений о популяционно-генетической структуре древесных растений может быть оценен их генетический потенциал и разработан комплекс

мероприятий, направленных на сохранение генетического разнообразия в процессе их использования и воспроизводства [3].

В связи с этим изучение генетического разнообразия и генетической структуры популяций *P. sylvestris* Среднего Урала на основе анализа ДНК-маркеров перспективно для разработки и оптимизации методики оценки состояния генофондов бореальных хвойных видов растений, что является актуальной задачей для сохранения популяций лесных древесных видов, продуктивных и устойчивых к действию различных факторов среды.

Целью данной работы являлось изучение генетического разнообразия, генетической структуры и дифференциации шести природных популяций *P. sylvestris* в Пермском крае.

В качестве объектов исследований избраны шесть природных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.; *Pinacea*), находящихся на территории Пермского края. Изученные популяции *P. sylvestris* в Пермском крае расположены на территориях Кочевского (*PS_KOCh*), Гаинского (*PS_SOSN*), Кишертского (*PS_KISH*), Кудымкарского (*PS_LENI*), Чердынского (*PS_ChER*) и Березниковского (*PS_ROMA*) лесничеств. Сбор растительного материала осуществлялся с деревьев, расположенных на расстоянии не менее чем 50–150 м друг от друга. Географические расстояния между популяциями варьируют от минимального 87 км (популяции *PS_SOSN* и *PS_KOCh*) до максимального – 382 км между популяциями *PS_SOSN* и *PS_KISH*.

Для проведения исследования были собраны образцы тканей растений индивидуально с 31 дерева в каждой из шести популяций *P. sylvestris*. Выделение ДНК проводили по методике для сложных биологических образцов [4]. Для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) концентрацию ДНК каждой пробы выравнивали до 10 нг/мкл.

Для оценки генетического разнообразия и генетической структуры популяций был использован ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)-метод анализа полиморфизма ДНК [5]. Для ПЦР использовалась реакционная смесь объёмом 25 мкл, которая содержала: 2 единицы Taq-полимеразы («Силекс М», Россия); 2,5 мкл стандартного 10× буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 25 пМ праймера («Синтол», Россия); 2,5 мМ MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 мМ dNTP («Fermentas», Литва); 5 мкл тотальной ДНК. Для проведения ПЦР с пробами ДНК *P. sylvestris* были использованы ранее подобранные эффективные праймеры [6]: ISSR-1 [(AC)8T]; CR-212 [(CT)8TG]; CR-215 [(CA)6GT]; M27 [(GA)8C]; X10 [(AGC)6C].

Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 1,7%-м агарозном геле в 1× TBE буфере (Tris-Borate-EDTA), окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете в системе гель-документации GelDoc XR («BioRad», США). Для определения длины фрагментов ДНК использовали маркер молекулярного веса (100 bp + 1,5 + 3 Kb DNA Ladder, «ООО СибЭнзим-М», Москва) и программу Quantity One («Bio-Rad», США). Всего проанализирован полиморфизм ISSR-маркеров с пятью праймерами у 186 деревьев, то есть 930 проб. Для проверки достоверности полученных результатов постановку ПЦР проводили не менее трех раз.

Компьютерная обработка данных проведена с помощью компьютерных программ POPGENE 1.31 [7] и специализированного макроса GenAlEx6.5 [8] для MS-Excel с определением абсолютного числа аллелей (n_a), эффективного (n_e) числа аллелей, ожидаемой (H_e) гетерозиготности и информационного индекса Шеннона (I). Для описания генетической структуры популяций были использованы следующие параметры: ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) во всей популяции, как мера общего генного разнообразия; ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляции (H_S), как мера ее внутрипопуляционного разнообразия; доля межпопуляционного генетического разнообразия

в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций (G_{ST}). Генетические расстояния между популяциями (D_N) определяли по формуле М. Нея и Ли.

При молекулярно-генетическом анализе шести популяций *P. sylvestris* выявлено 133 фрагмента ДНК. Используемые праймеры выявляли от 15 до 39 фрагментов DNA, а максимальное число фрагментов амплифицировалось с праймером CR-212 [(CA)₆GT]. В среднем один праймер выявлял 26,6 фрагментов DNA. Длины фрагментов DNA варьировали от 200 до 1500 пар нуклеотидов. Наибольшее генетическое разнообразие наблюдается в популяциях из Кишертского (*PS_KISH*) лесничества ($I = 0.308$; $H_e = 0.196$; $n_e = 1.312$) и Чердынского (*PS_ChER*) лесничества ($I = 0.310$; $H_e = 0.195$; $n_e = 1.304$). Наименьший уровень разнообразия отмечается (Таблица) в популяциях из Гаинского (*PS_SOSN*) лесничества ($I = 0.265$; $H_e = 0.163$; $n_e = 1.250$) и Кудымкарского (*PS_LENI*) лесничества ($I = 0.266$; $H_e = 0.163$; $n_e = 1.247$)

Таблица. Генетическое разнообразие шести популяций *P. sylvestris*

Популяции	H_e	n_e	I
<i>PS_KoCh</i>	0,179 (0,014)	1,272 (0,025)	0,291 (0,019)
<i>PS_SOSN</i>	0,163 (0,014)	1,250 (0,025)	0,265 (0,020)
<i>PS_KISH</i>	0,196 (0,015)	1,312 (0,028)	0,308 (0,021)
<i>PS_LENI</i>	0,163 (0,014)	1,247 (0,025)	0,266 (0,020)
<i>PS_ChER</i>	0,195 (0,015)	1,304 (0,027)	0,310 (0,020)
<i>PS_ROMA</i>	0,171 (0,014)	1,265 (0,026)	0,276 (0,020)
Общая выборка	0,178 (0,006)	1,275 (0,011)	0,286 (0,008)

H_e —ожидаемая гетерозиготность; n_e —эффективное число аллелей; I —информационный индекс Шеннона; в скобках даны стандартные отклонения.

Анализ генетической структуры исследованных популяций *P. sylvestris* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_T) в общей выборке составила 0,211, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в субпопуляции (H_S) – 0,178. Коэффициент подразделенности популяции (G_{ST}) показывает, что на межпопуляционную составляющую приходится 0,156 всего генетического разнообразия.

Значения попарных генетических расстояний $PhiPT$, обнаруженных пакетом AMOVA, варьировались от 0,081 (*PS_KOCh/PS_KISH*) до 0,306 (*PS_SOSN/PS_LENI*). Для общей выборки *P. sylvestris* индекс $PhiPT$ составил 0,207, что приблизительно соответствует $G_{ST} = 0,156$. При этом анализ молекулярной изменчивости (AMOVA) показал, что значительная часть генетического разнообразия приходится на межпопуляционную составляющую (21%).

Наименьшая генетическая дистанция наблюдалась между популяциями *PS_KOCh/PS_KISH* ($D_N = 0,017$), наибольшая ($D_N = 0,075$) между популяциями *PS_SOSN* и *PS_LENI*. На основе матрицы парных генетических расстояний (D_N) проведен кластерный

анализ методом Neighbor-joining и построена дендрограмма, отражающая степень сходства ISSR-спектров исследуемых популяций (Рисунок). На дендрограмме исследуемые популяции образовали 2 кластера. Разделение популяций на кластеры не соответствует их географическому расположению.

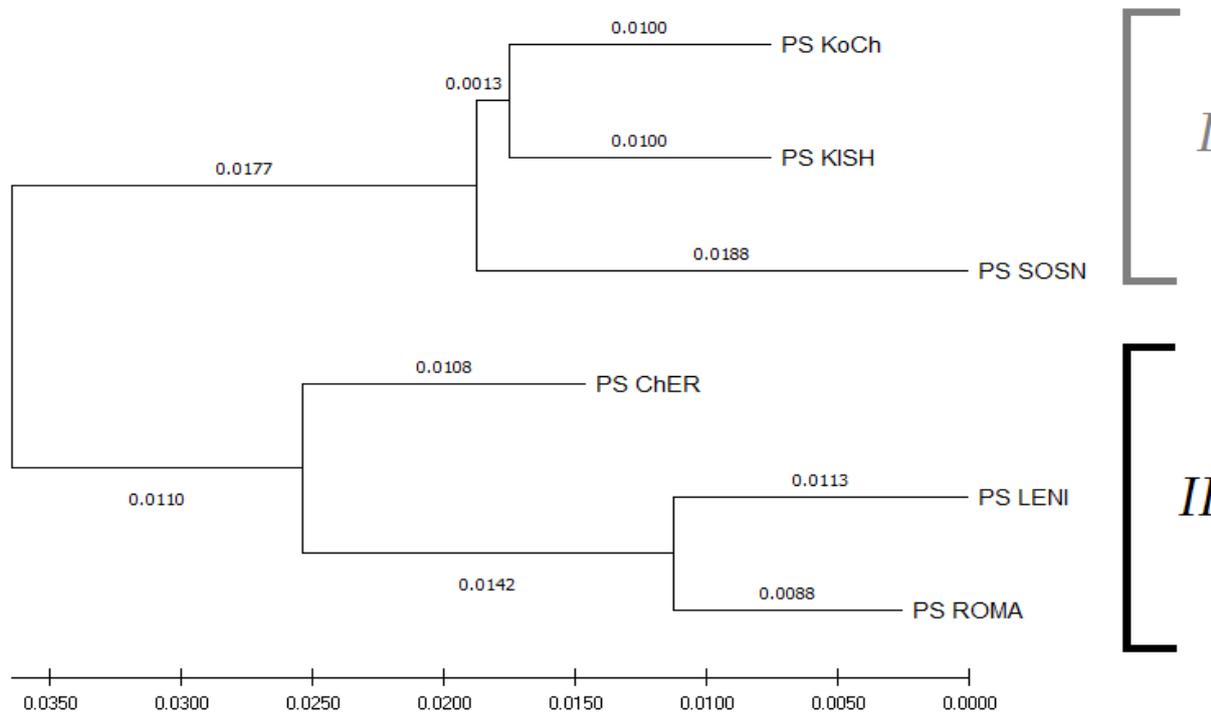


Рисунок – Дендрограмма генетического сходства шести исследованных популяций *P. sylvestris*, построенная на основе полиморфизма ISSR-спектров методом Neighbor-joining; цифрами указаны генетические расстояния.

В результате исследования выявлен высокий уровень генетического разнообразия популяций *P. sylvestris* в Пермском крае ($I = 0,286$; $H_e = 0,178$; $n_e = 1,265$). Генетическое разнообразие изученных популяций *P. sylvestris* в Пермском крае оказалось выше, чем в популяциях северо-востока Русской равнины [9], но ниже чем у популяций Южного Урала [10]. Меньший уровень разнообразия наблюдается в популяциях Гаинского (*PS_SOSN*) и Кудымкарского (*PS_LENI*) лесничеств. Это может быть связано с более интенсивной лесозаготовкой в районах произрастания этих популяций, что и привело к обеднению их генетического разнообразия.

Исследуемые популяции были разделены на два кластера. По данным анализа молекулярной изменчивости (AMOVA) изученные популяции *P. sylvestris* менее дифференцированы, чем популяции из наших предыдущих исследований в близлежащих регионах [9, 11], лишь четверть (21%) наблюдаемого генетического разнообразия приходится на межпопуляционную компоненту.

Слабая дифференциация популяций может быть следствием схожестью мест произрастания популяций, так как все изучаемые популяции расположены на 180-200 метрах над уровнем моря. Подобная генетическая однородность популяций сосны обыкновенная наблюдалась и при исследовании популяций на территории от востока Восточно-Европейской равнины как минимум до реки Енисей с использованием митохондриальных маркеров [12].

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта МИГ №26/776 от 31.03.2022.

Библиографический список

1. Позднякова Е. А., Волкова Г. Л., Кухта А. Е. Изменчивость линейного прироста сосны обыкновенной в различных типах биотопов Европейской территории России //Лесной вестник/Forestry bulletin. 2019. Т. 23. №. 2. С. 61-69.
2. Состояние лесов мира – 2020. Леса, биоразнообразие и люди. Рим, ФАО, 2020. 228 с.
3. Pazouki L. et al. Large within-population genetic diversity of the widespread conifer *Pinus sylvestris* at its soil fertility limit characterized by nuclear and chloroplast microsatellite markers //European journal of forest research. 2016. Vol. 135. №. 1. P. 161-177.
4. Kalendar R., Boronnikova S., Seppänen M. Isolation and purification of DNA from complicated biological samples //Molecular Plant Taxonomy. 2021. Vol. 2222. P. 57-67.
5. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification //Genomics. 1994. Vol. 20. №. 2. P. 176-183.
6. Сбоева Я. В. и др. Молекулярно-генетическая идентификация популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров //Сибирский лесной журнал. 2020. №. 4. С. 35-44.
7. Yeh F. C. et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis //Molecular biology and biotechnology centre, University of Alberta, Canada. 1997. Vol. 10. P. 295-301.
8. Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research //Molecular ecology notes. 2006. Vol. 6. №. 1. P. 288-295.
9. Видякин А. И. и др. Генетическая изменчивость, структура и дифференциация популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на северо-востоке Русской равнины по данным молекулярно-генетического анализа //Генетика. 2015. Т. 51. №. 12. С. 1401-1409.
10. Khanova E. et al. Genetic and selection assessment of the scots pine (*Pinus sylvestris* L.) In forest seed orchards //Wood research. 2020. Vol. 65. №. 2. P. 283.
11. Vasilyeva Y. et al. Genetic Structure, Differentiation and Originality of *Pinus sylvestris* L. Populations in the East of the East European Plain //Forests. 2021. Vol. 12. №. 8. P. 999.
12. Видякин А. И. и др. Распространение гаплотипов митохондриальной ДНК в популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на севере Европейской России //Генетика. 2012. Т. 48. №. 12. С. 1440-1440.

СЕКРЕТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ *MYRTUS COMMUNIS* L.

Черятова Ю.С.

Российский государственный аграрный университет – Московская сельскохозяйственная академия имени К. А. Тимирязева, Москва, Россия

Аннотация. В статье представлены результаты морфолого-анатомического изучения лекарственного растения *Myrtus communis* L., содержащего ценное эфирное масло, обладающего антимикробными, антиоксидантными и антимуtagenными свойствами. При проведении микроскопического анализа стеблей и листьев *M. communis* были установлены расположенные среди основных тканей органов растения схизолизигенные эфирномасличные вместилища и эфирномасляные клетки, заполненные маслом желтого цвета.

Ключевые слова: *Myrtus communis*, анатомия стебля, анатомия листа, эфирномасличные вместилища, эфирномасляные клетки.

SECRETORY STRUCTURES IN *MYRTUS COMMUNIS* L.

Cheryatova Yu. S.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia.

Abstract. The article presents the results of a morphological and anatomical study of the medicinal plant *Myrtus communis* L., which contains a valuable essential oil with antimicrobial, antioxidant and antimutagenic properties. When conducting a microscopic analysis of the stems and leaves of *M. communis*, schizolysigenic essential oil reservoirs, and essential oil cells filled with yellow oil were found located among the main tissues of the plant organs.

Keywords: *Myrtus communis* L., stem anatomy, leaf anatomy, essential oil reservoir, essential oil cells.

Мирт обыкновенный (*Myrtus communis* L.) является важнейшим ароматическим и лекарственным растением [1]. Мирт используется в различных областях, таких как кулинария, косметика, фармацевтика, терапия, а также широко находит и промышленное применение. Лекарственным растительным сырьем являются побеги *M. communis*, содержащие ценное эфирное масло [2]. Среди основных биологически активных веществ в состав эфирного масла входят монотерпены: альфа-пинен, α -терпинеол, линалоол, эвкалиптол, 1,8-цинеол, метилэвгенол, миртенилацетат, геранилацетат, α -терпинилацетат, метилэвгенол, линалоол, β -кариофиллен, α -гумулен, транс-кариофилленоксид и гумуленэпоксид [3]. Масло особенно богато эвкалиптолом (55,09 %), 1,8-цинеолом (36,3 %) и α -пиненом (33,14%) [4].

Современными фармакологическими исследованиями установлено, что эфирное масло *M. communis* обладает антимикробными, антиоксидантными, антимуtagenными свойствами [5]. Результаты показывают, что эфирное масло листьев *M. communis* и его основные компоненты могут быть использованы в качестве возможных продуктов, которые могут

действовать против резистентных патогенных видов *E. coli*, *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes* и *S. aureus*, а также при лечении различных неврологических заболеваний [6].

Гексановый, хлороформный, этилацетатный и метанольный экстракты и эфирное масло, полученные из листьев *M. communis*, продемонстрировали в опытах высокую важную активность по удалению свободных радикалов [7]. Эфирное масло растения индуцирует заметную цитотоксическую активность по механизму, связанному с апоптозом, что предполагает возможное применение биоактивных соединений в качестве природных противораковых соединений [8]. Эти результаты предполагают будущее использование экстрактов мирта в качестве добавок в комплексных исследованиях химиопрофилактики [9].

Анализ литературы показал, что на данный момент отсутствуют исчерпывающие сведения о месте локализации и анатомо-морфологическом строении секреторных структур *M. communis*, что затрудняет проведение микроскопического анализа данного вида лекарственного сырья. Следует также отметить, что знание морфологии секреторных структур, их биологической роли, имеет важнейшее таксономическое значение [10]. Поэтому целью работы послужило установление строения секреторных структур побегов *M. communis*.

Научно-исследовательская работа проводилась на кафедре ботаники, селекции и семеноводства садовых растений ФГБОУ ВО РГАУ – МСХА имени К. А. Тимирязева. Изучение однолетних побегов растения проводили по методике Черятовой Ю.С. [11].

Стебель *M. communis* характеризовался непучковым типом анатомического строения (рис. 1 А). В хорошо выраженной коровой паренхиме стебля были отчетливо заметны сферической формы схизолизигенные эфирномасличные вместилища и эфирномасляные клетки, заполненные маслом желтого цвета (рис. 1 С, D).

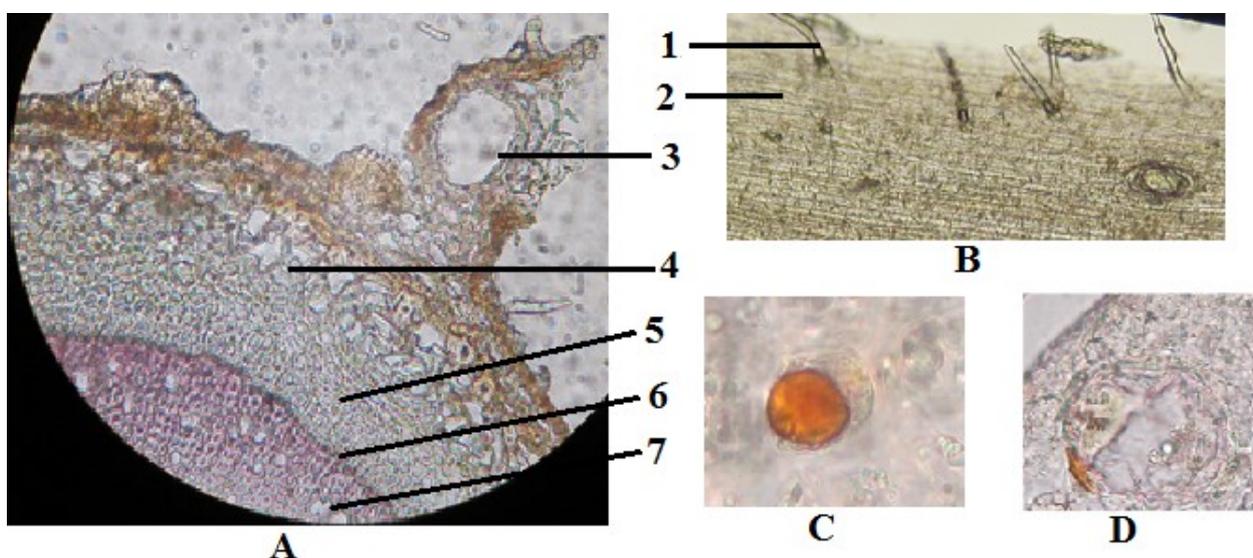


Рисунок 1 – Анатомическое строение стебля *Myrtus communis* L.: А – поперечный срез стебля ($\times 200$); В – эпидерма ($\times 200$); С – эфирномасляная клетка паренхимы коры ($\times 400$); D – схизолизигенное эфирномасличное вместилище паренхимы коры ($\times 400$): 1 – одноклеточные трихомы; 2 – клетки эпидермы; 3 – схизолизигенное эфирномасличное вместилище; 4 – паренхима первичной коры; 5 – флоэма; 6 – камбий; 7 – ксилема.

Строение листа *M. communis* дорсовентральное (рис. 2). Под верхней эпидермой листа располагается двухслойный столбчатый мезофилл, клетки которого содержат много хлоропластов. Пространство от столбчатого мезофилла до нижней эпидермы занимает

губчатый мезофилл. Губчатый мезофилл сложен из паренхимных клеток, между которыми находятся крупные межклетники, связанные между собой в единую систему, примыкающую к устьицам на нижней эпидерме.

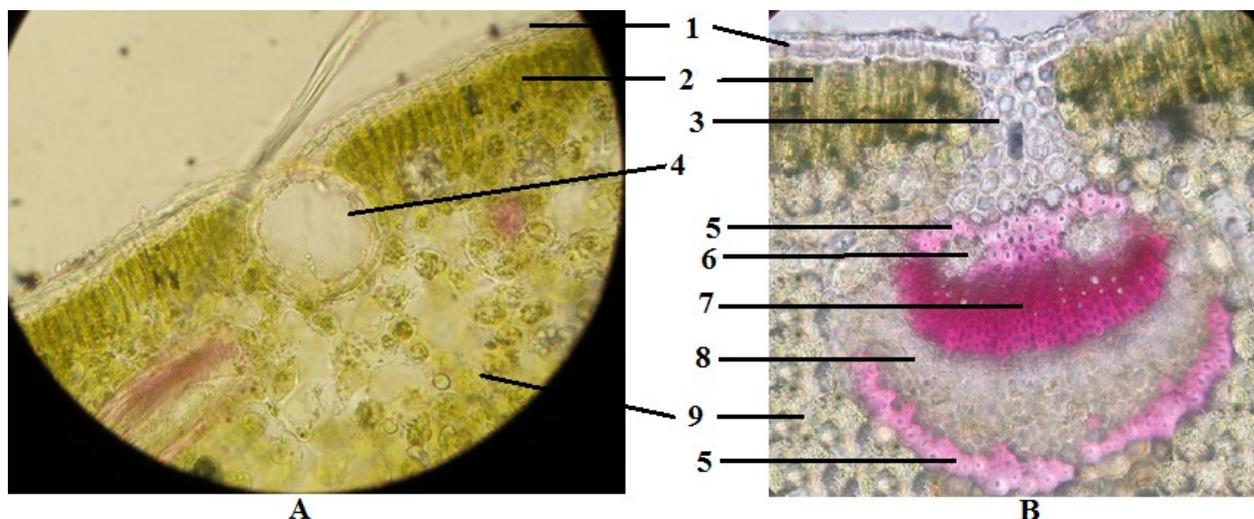


Рисунок 2 – Строение поперечного среза листа *Myrtus communis* L.: А – мезофилл ($\times 200$); В – листовая пластинка в области главной жилки ($\times 250$): 1 – верхняя эпидерма; 2 – столбчатый мезофилл; 3 – уголкового колленхима; 4 – схизолизигенное эфирномасличное вместилище; 5 – волокна склеренхимы; 6 – наружная флоэма; 7 – ксилема; 8 – внутренняя флоэма; 9 – губчатый мезофилл.

В листе проходила двухпучковая главная жилка, в состав которой входило два биколлатеральных пучка. Мелкие боковые жилки состояли из закрытых коллатеральных проводящих пучков. Элементы колленхимы и склеренхимы, расположенных около проводящих пучков, придавали им дополнительную прочность. В листьях *M. communis* были обнаружены диффузно расположенные среди клеток как столбчатого, так и губчатого мезофилла эфирномасляные клетки и схизолизигенные эфирномасличные вместилища. Анатомо-морфологический анализ секреторных структур листа показал их идентичность с выделительными структурами стебля растения.

Таким образом, в результате проведенного исследования были установлены и визуализированы секреторные структуры *M. communis*, которые могут быть использованы при проведении микроскопического анализа лекарственного сырья побегов растения.

Библиографический список

1. Leigh-de Rapper S., Viljoen A., Van Vuuren S. Essential Oil Blends: The Potential of Combined Use for Respiratory Tract Infections // *Antibiotics* (Basel). – 2021. – Vol. 12. – No 10.: 1517. doi: 10.3390/antibiotics10121517.
2. Kaya D.A., Ghica M.V., Dănilă E., Öztürk Ş., Türkmen M., Albu Kaya M.G., Dinu-Pîrvu C.E. Selection of Optimal Operating Conditions for Extraction of *Myrtus communis* L. Essential Oil by the Steam Distillation Method // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – No 10.: 2399. doi: 10.3390/molecules25102399.

3. Usai M., Marchetti M., Culeddu N., Mulas M. Chemical Composition of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries Essential Oils as Observed in a Collection of Genotypes // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23. – No 10.: 2502. doi: 10.3390/molecules23102502.
4. Moradi M., Kaykhaii M., Ghiasvand A.R., Shadabi S., Salehinia A. Comparison of headspace solid-phase microextraction, headspace single-drop microextraction and hydrodistillation for chemical screening of volatiles in *Myrtus communis* L. // *Phytochem. Anal.* – 2012. – Vol. 23. – No 4. – P. 379-386. doi: 10.1002/pca.1368.
5. Bouzabata A., Casanova J., Bighelli A., Cavaleiro C., Salgueiro L., Tomi F. The Genus *Myrtus* L. in Algeria: Composition and Biological Aspects of Essential Oils from *M. communis* and *M. nivellei*: A Review // *Chem. Biodivers.* – 2016. – Vol. 13. – No 6. – P. 672-680. doi: 10.1002/cbdv.201500342.
6. Caputo L., Capozzolo F., Amato G., De Feo V., Fratianni F., Vivencio G., Nazzaro F. Chemical composition, antibiofilm, cytotoxic, and anti-acetylcholinesterase activities of *Myrtus communis* L. leaves essential oil // *BMC Complement Med. Ther.* – 2022. – Vol. 22. – No 1.: 142. doi: 10.1186/s12906-022-03583-4.
7. Mimica-Dukić N., Bugarin D., Grbović S., Mitić-Culafić D., Vuković-Gaćić B., Orcić D., Jovin E., Couladis M. Essential oil of *Myrtus communis* L. as a potential antioxidant and antimutagenic agents // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15. – No 4. – P. 2759-2770. doi: 10.3390/molecules15042759.
8. Harassi Y., Tilaoui M., Idir A., Frédéric J., Baudino S., Ajouaoui S., Mouse H.A., Ziyad A. Phytochemical analysis, cytotoxic and antioxidant activities of *Myrtus communis* essential oil from Morocco // *J Complement Integr. Med.* – 2019. – Vol. 16. – No 3.: 100. doi: 10.1515/jcim-2018-0100.
9. Hayder N., Abdelwahed A., Kilani S., Ammar R.B., Mahmoud A., Ghedira K., Chekir-Ghedira L. Anti-genotoxic and free-radical scavenging activities of extracts from (Tunisian) *Myrtus communis* // *Mutat. Res.* – 2004. – Vol. 564. – No 1. – P. 89-95. doi: 10.1016/j.mrgentox.2004.08.001.
10. Черятова Ю.С. Морфология эфирномастичных вместилищ лекарственных растений // *Естественные и технические науки*. – 2022. – № 4 (167). – С. 41-42.
11. Черятова Ю.С. Анатомия лекарственных растений и лекарственного растительного сырья: учебное пособие. – М.: Изд-во РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, 2010. – 95 с.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ГОРОДА ПО ФЛУКТУИРУЮЩЕЙ АСИММЕТРИИ ЛИСТЬЕВ КЛЕНА ОСТРОЛИСТНОГО

Чумакова Е.М., Макарова Е.А.

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, Россия.

Аннотация. В статье проводится анализ состояния окружающей природной среды на примере двух районов Москвы – Лефортово и Измайлово. Оценка экологического состояния осуществляется с помощью метода флуктуирующей асимметрии клена остролистного.

Ключевые слова: флуктуирующая асимметрия, экологическое состояние, клен остролистный.

ASSESSMENT OF THE ECOLOGICAL STATE OF THE CITY BASED ON THE FLUCTUATING ASYMMETRY OF THE LEAVES OF THE HOLY MAPLE

Chumakova E.M., Makarova E.A.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA named after K.I. Scriabin, Moscow, Russia.

Abstract. The article analyzes the state of the environment on the example of two districts of Moscow – Lefortovo and Izmailovo. The assessment of the ecological state is carried out using the method of fluctuating asymmetry of the Norway maple.

Keywords: fluctuating asymmetry, ecological state, Norway maple.

Возрастание антропогенной (техногенной) нагрузки в крупных городах приводит к негативным изменениям в структуре, продуктивности и функциональным нарушениям экосистем: уменьшается численность видов растений и животных, приводящая к снижению биоразнообразия в целом, нарушаются природные ландшафты и гидрологический режим местности, развивается эрозия почв [1]. Оценка экологического состояния территорий является важным показателем, позволяющим определить уровень антропогенных воздействий и приблизительно определить степень нарушенности экосистем на исследуемой территории [2].

Москва – это мегаполис с развитой инфраструктурой и, как следствие с огромной техногенной нагрузкой. Поэтому, задача контроля и мониторинга состояния окружающей среды является первостепенной в наше время. Мониторинг поможет контролировать степень негативного влияния на окружающую среду, предотвратить ухудшение ситуации и появление необратимых последствий.

Одним из методов оценки состояния окружающей среды является метод флуктуирующей асимметрии. Этот метод основан на учении о билатеральной симметрии у некоторых организмов. Флуктуирующая асимметрия – незначительные ненаправленные

отклонения от строгой билатеральной симметрии, по которым можно судить о состоянии популяций и окружающей среды.

В крупных городах на растительный покров влияет целый комплекс негативных факторов, связанных с антропогенным загрязнением среды, такие как автомобильный и железнодорожный транспорт, промышленные предприятия, теплоэлектростанции, бытовой мусор и т.д. Растения реагируют на изменения в окружающей среде, в том числе и изменением симметричности листовых пластин.

Цель работы – оценить экологическое состояние по флуктуирующей асимметрии листьев клена остролистного (*Acer platanoides*) в районе Лефортово, который считается одним из экологически неблагоприятных в Москве, и Измайлово, где экологическая обстановка более благополучна.

Для проведения исследования были выбраны два района – Лефортово и Измайлово. Район Лефортово находится в Юго-восточном округе Москвы, а район Измайлово в Восточном округе Москвы.

Основными источниками загрязнения в районе Лефортово, являются: третье транспортное кольцо, шоссе Энтузиастов, Нижегородская транзитная эстакада. А также многие промзоны завода «Серп и молот», «Компрессор» и трамвайно-ремонтный завод.

Основными источниками загрязнения в районе Измайлово являются автодороги улиц Первомайская, Вернисажская, Измайловский проспект, Северо-восточная хорда.

В каждом районе были выбраны по три пробных площадки с условно низкой, средней и высокой антропогенной нагрузкой. В районе Лефортово за площадку №1 с условно низкой антропогенной нагрузкой была взята площадка в парке Лефортово, за площадку №2 со средней антропогенной нагрузкой место на улице Госпитальная, за площадку №3 с высокой антропогенной нагрузкой участок рядом с крупной трассой- шоссе Энтузиастов.

В районе Измайлово площадка №1 с условно низкой антропогенной нагрузкой находилась в парке Измайлово, площадка №2 со средней антропогенной нагрузкой на улице 3-я парковая, №3 с высокой антропогенной нагрузкой была взята площадка рядом с Измайловским проспектом и метро Измайлово.

На каждой площадке были выбраны по три дерева (всего 18 деревьев) клена остролистного и с каждого дерева были собраны листья. Оценка экологического состояния проводилась по методике Боголюбова.

Листья клена остролистного использовались как биоиндикатор качества окружающей среды, так как вид встречается практически повсеместно, легко идентифицируется, обладает четкими и легко измеряемыми признаками и в качестве объекта исследования ранее использовался другими авторами, однако единой методики, как в случае с березой, не существует [3,4].

Сбор материала проводился осенью 2021 года, после завершения роста листьев. Собранные листья хранились в полиэтиленовых пакетах в холоде с подписями о дате и месте сбора. Всего было проанализировано 180 листьев. Измерения проводились вручную, с помощью транспортира и линейки. Все дальнейшие расчёты производились на основании методики, предложенной Боголюбовым.

На каждом листе делалось по 8 измерений: по 4 с каждой половины листа.

Изменения делались по следующим параметрам:

- 1) ширина половинки листа, мм
- 2) длина второй жилки второго порядка от основания листа, мм

- 3) расстояние между концами первой и второй жилок второго порядка, мм
- 4) угол между центральной и второй жилкой, градусы

Далее рассчитывалась величина асимметричности с помощью интегрального показателя – величины среднего относительного различия на признак (средняя арифметическая отношения разности к сумме промеров листа слева и справа, отнесенная к числу признаков) [5].

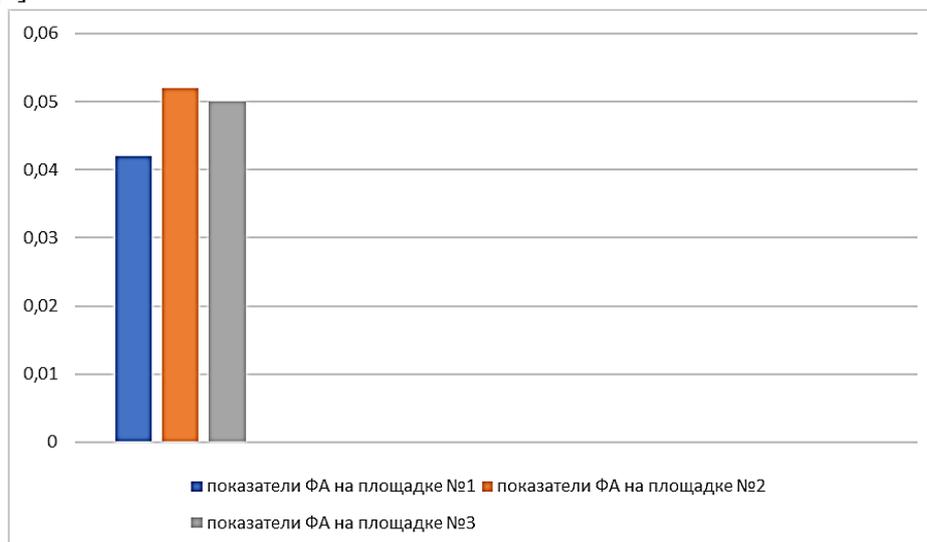


Рисунок 1 – Показатели асимметричности в районе Лефортово.

Анализируя данные, представленные на рисунке 1 видно, что степень флуктуирующей асимметрии листьев на площадке №1 равна 0,04 что соответствует 4 баллам и говорит о значительных отклонениях от нормы и высокой степени влияния неблагоприятных факторов. На площадках №2 и №3 – 0,05, что соответствует 5 баллам по шкале отклонения приведенной в таблице 1 и свидетельствует о крайне неблагоприятных экологических условиях данной местности.

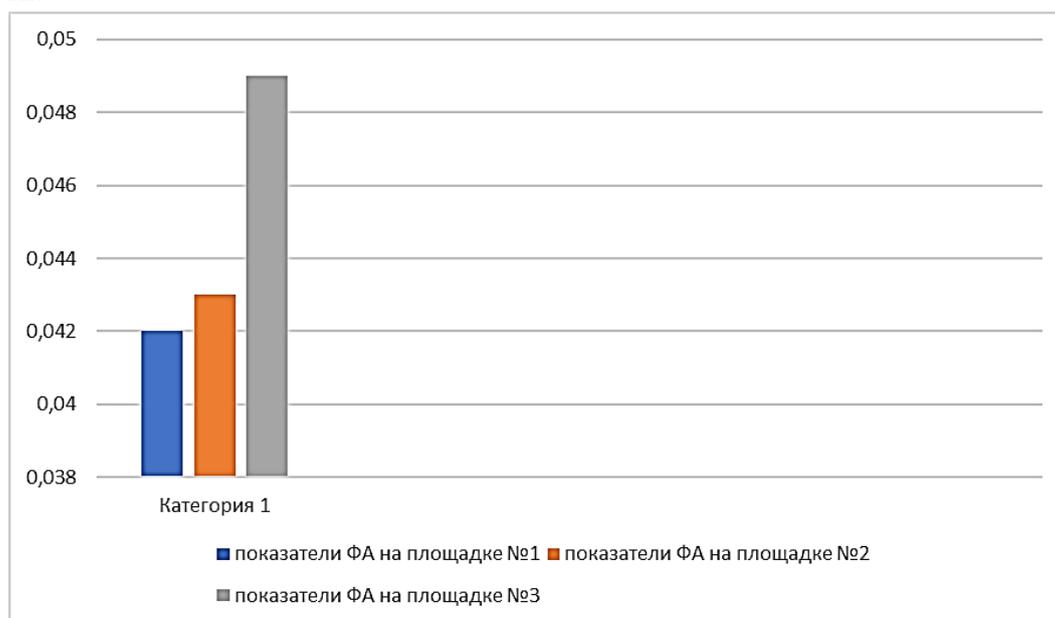


Рисунок 2 – Показатели асимметричности в районе Измайлово.

Показатели района Измайлово также свидетельствуют о высокой степени влияния неблагоприятных факторов на всех трех площадках. Так на площадке №1 и №2 отклонение от

нормы составило 4 балла (0,042 и 0,43 соответственно), на площадке №3 отклонение от нормы 5 баллов (0,049).

Сравнивая показатели флуктуирующей асимметрии листьев клена остролистного в двух районах г. Москвы можно сказать, что степень антропогенной нагрузки как в районе Лефортово, так и в районе Измайлово достаточно высокая, что сказывается на состоянии древесной растительности.

Таблица – Шкала отклонения от нормы

Балл	Значение показателя асимметричности
1 балл	Менее 0,015
2 балла	0,016-0,025
3 балла	0,026-0,035
4 балла	0,036-0,045
5 балла	0,046-0,055
Критическое состояние	Более 0,055

Таким образом, метод флуктуирующей асимметрии можно использовать для приблизительной оценки экологического состояния местности. Для более точной оценки состояния окружающей среды необходимо использовать другие методы или комплекс различных методов.

Библиографический список

1. Макарова Е.А., Гаврилина Е.С. Оценка экологического состояния окружающей среды на примере района Братеево г. Москвы по флуктуирующей асимметрии листьев березы повислой (*Betula pendula*). В сборнике: Проблемы зоокультуры и экологии. Москва, 2019. С. 183-190.
2. Макарова Е.А., Гринько Е.К. Оценка экологического состояния лесопарка «Кусково» г. Москвы по флуктуирующей асимметрии листьев клена остролистного. Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. 2021. № 2. С. 16-19.
3. Щербаков А.В. Флуктуирующая асимметрия листа клена остролистного (*Acer platanoides* L.) как индикационный показатель качества среды / А.В. Щербаков, Е.О. Королькова. – Социально-экологические технологии, 2015. – С 114, 119-121.
4. Протасова М.В. Оценка состояния окружающей среды по показателям флуктуирующей асимметрии листьев древесных растений / Протасова М. В, Белова Т.А. – журнал Auditorium, 2018. – С 1-2, 6-8.
5. Боголюбов А. С. Оценка экологического состояния леса по асимметрии листьев / А. С. Боголюбов. – Москва : Экосистема, 2002. – С 10.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИСТОВОГО ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ У ГЕРБЕРЫ

Шестакова А.А., Шибанова Н.Л.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследований по получению первичного каллуса у герберы. Для стерилизации листового экспланта в качестве основных стерилизующих агентов можно использовать 70% этиловый спирт (1 мин) и 15% раствор хлорамина Б (20 мин). Выход стерильной культуры составляет 85%. Для получения первичной каллусной ткани можно рекомендовать вариант твердой питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением фитогормонов 6-БАП в концентрации 10 мг/л и ИУК в концентрации 1 мг/л.

Ключевые слова: листовой эксплант, каллус, *Gerbera* Cass. corr. Spreng

USING LEAF EXPLANTS TO PRODUCE PRIMARY CALLUS TISSUE OF GERBERA

Shestakova A.A., Shibanova N.L.

FSAEI HE Perm State University, Perm, Russia

Abstract. The results of studies on the production of primary callus in gerbera are presented. To sterilize the leaf explant, 70% ethyl alcohol (1 min) and 15% chloramine B solution (20 min) can be used as the main sterilizing agents. The yield of sterile culture is 85%. To obtain primary callus tissue, we can recommend a variant of the Murashige and Skoog solid nutrient medium with the addition of phytohormones BAP at a concentration of 10 mg/l and IAA at a concentration of 1 mg/l.

Keywords: leaf explant, callus, *Gerbera* Cass. corr. Spreng

Гербера (*Gerbera* Cass. corr. Spreng) относительно недавно стала одной из самых популярных декоративных культур в области садоводства. Она выращивается как комнатное растение или используется для срезки. На 2017 год в структуре мирового рынка гербера занимает 4 место по объему продаж среди растений, во многом благодаря хорошей стойкости в воде и сохранению свежести в срезке на протяжении 20 дней [1].

Герберу размножают семенами и вегетативным способом. Однако такие способы размножения являются трудоемкими и не могут удовлетворить рыночный спрос. Технология микрклонального размножения открывает большие возможности сохранения и пополнения коллекции сортов герберы. Растения, полученные таким способом, отличаются более мощным ростом и высокой урожайностью. Эти преимущества играют важную роль для различных сегментов садоводческой отрасли мирового рынка [2].

Цель данной работы – получение первичной каллусной ткани из листового экспланта герберы.

Исследования проводились в 2022 году в лаборатории микрклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. В качестве первичного экспланта использовались сегменты листовых пластинок 0,7×0,7 мм.

Стерилизацию листовых эксплантов проводили по общепринятой методике [3]. Всего было использовано 9 режимов стерилизации, которые отличались временем нахождения в стерилизующем агенте (таблица 1). Престерилизация осуществлялась погружением экспланта в раствор нейтрального детергента (порошок «Persil») на 10-15 мин и промывкой проточной водой в течение 10-15 мин. Постстерилизация включала промывку стерилизованной дистиллированной водой, трехкратно по 5 мин.

Таблица 1 – Режимы стерилизации листового экспланта герберы

№	Стерилизующие агенты	Время экспозиции
I	70% этиловый спирт	1 мин
	5% раствор гипохлорита натрия «Белизна»	15 мин
II	70% этиловый спирт	1 мин
	10% раствор хлорамина Б	15 мин
III	70% этиловый спирт	1,5 мин
	10% раствор хлорамина Б	15 мин
IV	15% раствор хлорамина Б	15 мин
	70% этиловый спирт	1,5 мин
V	70% этиловый спирт	1 мин
	15% раствор хлорамина Б	20 мин
VI	70% этиловый спирт	1 мин
	15% раствор хлорамина Б	15 мин
VII	70% этиловый спирт	1,5 мин
	15% раствор хлорамина Б	20 мин
VIII	15% раствор хлорамина Б	20 мин
	70% этиловый спирт	1,5 мин
IX	70% этиловый спирт	1 мин
	20% раствор хлорамина Б	15 мин

При культивировании использовалась твердая питательная среда с минеральной основой по T. Murashige и F. Skoog (MS) [4] с добавлением 8 г/л агар и 30-40 г/л сахарозы и полужидкая среда MS с добавлением 4 г/л агар и 30 г/л сахарозы. В среду вносили витамины: тиамин – 0,1 мг/л, пиридоксин – 0,1-0,5 мг/л, никотиновую кислоту – 0,04-0,5 мг/л и фитогормоны: ауксины – β-индолилуксусную кислоту (ИУК) 0,6-1 мг/л, α-нафтилуксусную кислоту (НУК) 1 мг/л, 2,4-дихлорфеноксисукусную кислоту (2,4-Д) 2 мг/л и цитокинины – 6-бензиламинопури (6-БАП) 1-2 мг/л, кинетин 3 мг/л. Всего использовано 9 вариантов среды с разным соотношением витаминов и фитогормонов (таблица 2).

Таблица 2 – Варианты питательной среды Мурасиге и Скуга для получения первичной каллусной ткани герберы

Вариант среды	Витамины, мг/л	Фитогормоны	
		Ауксины, мг/л	Цитокинины, мг/л
1	+	ИУК – 1	Кинетин – 5
2	тиамин – 1 пиридоксин – 1 никотиновая кислота – 1	ИУК – 0,5	6-БАП – 5
3	тиамин – 0,1 пиридоксин – 0,1 никотиновая кислота – 0,04	ИУК – 0,8	Кинетин – 2 6-БАП – 6
4	тиамин – 0,1 пиридоксин – 0,1 никотиновая кислота – 0,04	ИУК – 0,5	6-БАП – 5
5	тиамин – 0,1 пиридоксин – 0,5 никотиновая кислота – 0,5	ИУК – 1	6-БАП – 10
6	тиамин – 0,1 пиридоксин – 0,1 никотиновая кислота – 0,04	ИУК – 1	6-БАП – 2
7	+	ИУК – 0,6	Кинетин – 3 6-БАП – 2
8	+	2,4-Д – 2	6-БАП – 1
9	+	НУК – 1	6-БАП – 2

Примечание: + витамины по Р.Г. Бутенко 0,1 мг/л тиамин, 0,5 мг/л пиридоксин, 0,5 мг/л никотиновая кислота.

Стерилизацию пробирок с питательной средой проводили в автоклаве Sanyo MLS3780 при давлении 1 атм. и температуре +120°C в течение 15 мин. Процесс посадки эксплантов на питательную среду осуществляли в ламинар-боксе. После посадки пробирки с эксплантами помещались в климатическую камеру Binder KBF LQC 240 с влажностью 30-33% и температурой +18±3°C. Листовые экспланты, высаженные на 7-9 варианты среды, содержали в условиях полной темноты в течение 4 недель с момента посадки. В дальнейшем, они были перенесены в климатическую камеру.

Выход стерильной культуры определялся как количество эксплантов без признаков контаминации к общему их числу. Жизнеспособность рассчитывалась как количество эксплантов с признаками регенерации от общего числа стерильного материала. Статистическая обработка данных проводилась с использованием стандартного пакета

анализа Microsoft Office Excel. Различия по критерию Фишера считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Фотографии эксплантов выполнены с помощью Apple iPhone 12 mini.

Важным этапом микроклонального размножения растений является получение хорошо растущей стерильной культуры. Данные по выходу стерильного материала в зависимости от режима стерилизации представлены на рисунке 1.

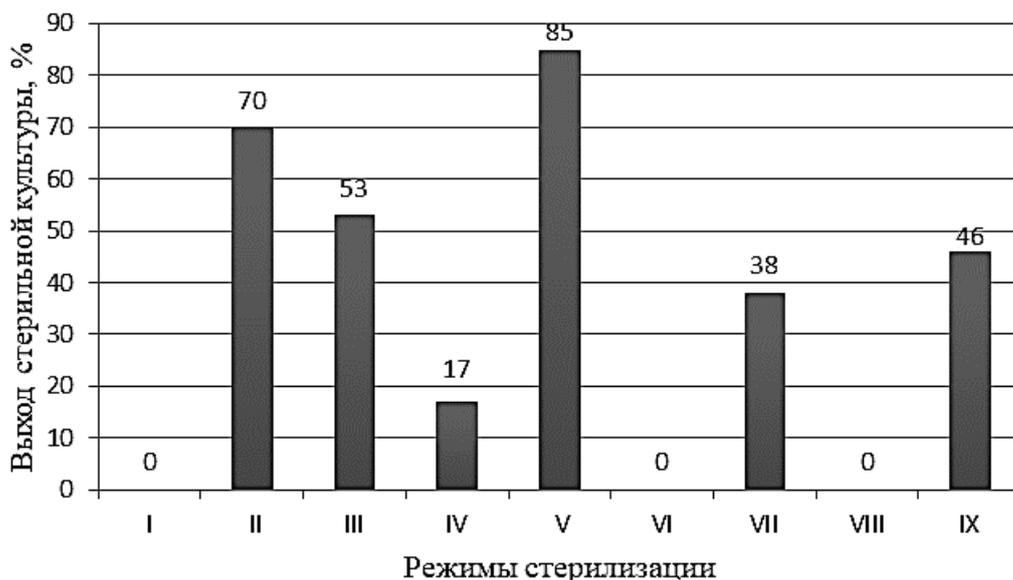


Рисунок 1 – Выход стерильной культуры герберы в зависимости от режима стерилизации: I – 70% этиловый спирт (1 мин) и 5% раствор гипохлорита натрия «Белизна» (15 мин); II – 70% этиловый спирт (1 мин) и 10% раствор хлорамина Б (15 мин); III – 70% этиловый спирт (1,5 мин) и 10% раствор хлорамина Б (15 мин); IV – 15% раствор хлорамина Б (15 мин) и 70% этиловый спирт (1,5 мин); V – 70% этиловый спирт (1 мин) и 15% раствор хлорамина Б (20 мин); VI – 70% этиловый спирт (1 мин) и 15% раствор хлорамина Б (15 мин); VII – 70% этиловый спирт (1,5 мин) и 15% раствор хлорамина Б (20 мин); VIII – 15% раствор хлорамина Б (20 мин) и 70% этиловый спирт (1,5 мин); IX – 70% этиловый спирт (1 мин) и 20% раствор хлорамина Б (15 мин).

Исходя из данных гистограммы, можно сделать заключение, что наилучшие результаты получены при использовании режимов стерилизации с использованием 70% этилового спирта (1 мин), 10% раствора хлорамина Б (15 мин) и 70% этилового спирта (1 мин), 15% раствора хлорамина Б (20 мин). Выход стерильной культуры герберы соответственно составил 70% и 85%. При использовании в качестве стерилизующих агентов: 70% этилового спирта (1 мин), 5% раствора гипохлорита натрия «Белизна» (15 мин); 70% этилового спирта (1 мин), 15% раствора хлорамина Б (15 мин) и 15% раствора хлорамина Б (20 мин), 70% этилового спирта (1,5 мин) вся культура была нестерильна.

Оптимальным режимом стерилизации для листового экспланта герберы является режим с использованием в качестве стерилизующих агентов: 70% этилового спирта (1 мин) и 15% раствора хлорамина Б (20 мин). Разница между II и V режимами стерилизации по критерию Фишера оказалась достоверной ($p = 0,00$; $p < 0,05$).

Образование каллуса происходит быстрее при предварительном помещении пробирок с материалом в условия полной темноты. На варианте полужидкой среды с добавлением ИУК в концентрации 0,6 мг/л, кинетина в концентрации 3 мг/л и 6-БАП в концентрации 2 мг/л он был

обнаружен через 2 недели после посадки. Каллус имел желтовато-белый оттенок, после перенесения в климатическую камеру каллус стал темно-зеленым (рисунок 2).

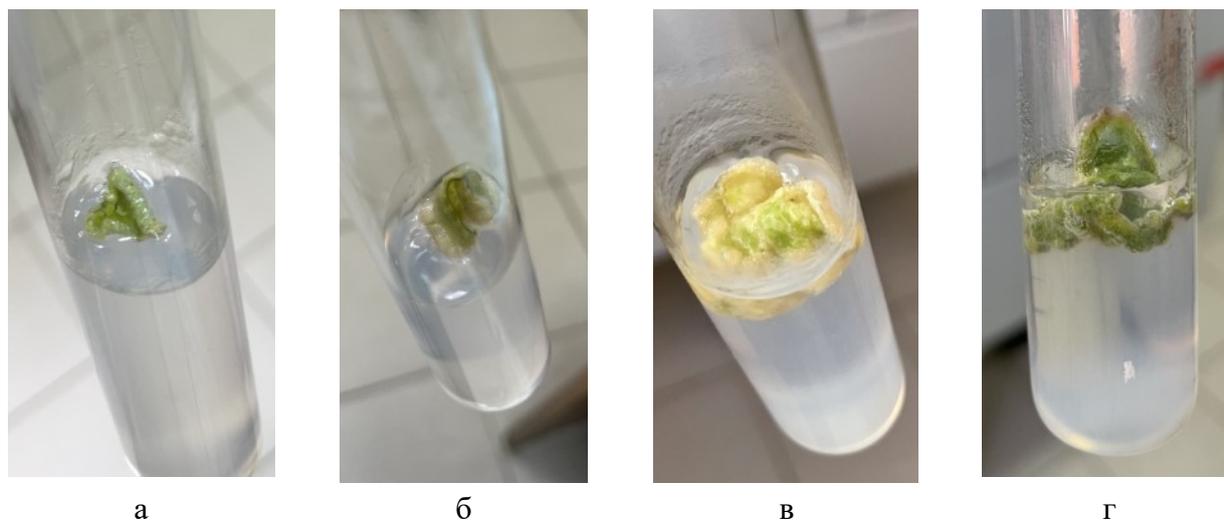


Рисунок 2 – Развитие каллуса на полужидкой питательной среде Мурасиге и Скуга: а – через 2 недели после посадки, б – через 3 недели после посадки, в – через 4 недели после посадки, г – через 5 недель после посадки.

На варианте твердой питательной среды MS с добавлением с добавлением ИУК в концентрации 0,5 мг/л и 6-БАП в концентрации 5 мг/л развитие каллуса отмечалось через 4 недели после посадки. Выход жизнеспособных эксплантов герберы представлен на рисунке 3.

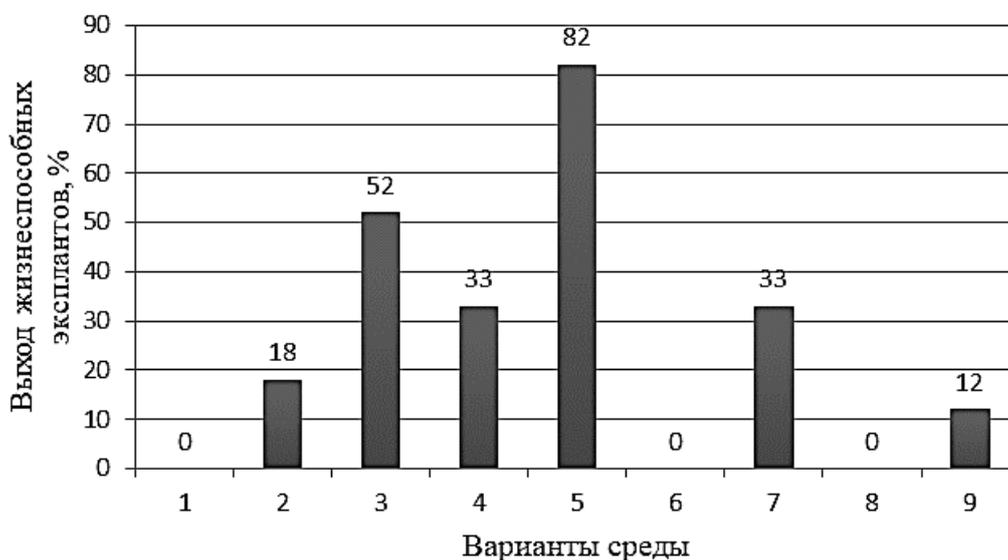


Рисунок 3 – Выход жизнеспособных эксплантов в зависимости от варианта питательной среды Мурасиге и Скуга: 1 – ИУК (1 мг/л) и кинетин (5 мг/л); 2 – ИУК (0,5 мг/л) и 6-БАП (5 мг/л); 3 – ИУК (0,8 мг/л), кинетин (2 мг/л) и 6-БАП (6 мг/л); 4 – ИУК (0,5 мг/л) и 6-БАП (5 мг/л); 5 – ИУК (1 мг/л) и 6-БАП (10 мг/л); 6 – ИУК (1 мг/л) 6-БАП (2 мг/л); 7 – ИУК (0,6 мг/л), кинетин (3 мг/л) и 6-БАП (2 мг/л); 8 – 2,4 Д (2 мг/л) и 6-БАП (1 мг/л); 9 – ИУК (1 мг/л) и 6-БАП (2 мг/л).

Высокий процент выхода жизнеспособных эксплантов отмечается на варианте питательной среды с добавлением фитогормонов 6-БАП в концентрации 10 мг/л и ИУК в

концентрации 1 мг/л. Он составил 82%. В работе Hossain S.A. [5] выход жизнеспособных эксплантов при добавлении в среду таких же концентраций фитогормонов составляет 60%. Отличие состоит в том, что в питательную среду были добавлены 2 мг/л глицина и 0,1 мг/л мио-инозитола.

Таким образом, оптимальным режимом стерилизации листовых эксплантов герберы является следующая комбинация стерилизующих агентов: 70% этиловый спирт (1 мин) и 15% раствор хлорамина Б (20 мин). Для получения первичной каллусной ткани можно рекомендовать вариант твердой питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 6-БАП в концентрации 6 мг/л, ИУК в концентрации 0,8 мг/л и кинетина в концентрации 2 мг/л. Также рекомендуется твердая питательная среда Мурасиге и Скуга с добавлением ИУК в концентрации 1 мг/л и 6-БАП в концентрации 10 мг/л.

Библиографический список

1. Вдовина Ю.А. Проблемы и возможности российского рынка цветов // Региональная экономика: теория и практика. – 2011. – № 47 (230). – С. 60-64.
2. Висящева Л.В., Соколова Т.А. Промышленное цветоводство: учебники и учебные пособия для учащихся техникумов. М.: Агропромиздат, – 1991. – 368 с.
3. Бутенко Р.Г. Культура изолированных тканей и физиология морфогенеза растений. М.: Наука, – 1964. – 272 с.
4. Murashige T.A., Skoog F. Revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Plant Physiol. – 1962. – V. 15. – № 95. – P. 473-497.
5. Hossain S.A. Study of in vitro regeneration protocol of gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) grown in Bangladesh: дис. канд. биол. наук. Dhaka, – 2018. – 48 p.

ЛИШАЙНИКИ ПРОЕКТИРУЕМОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ПАРКА «ДОЛИНА Р. ДАНИЛИХА» ГОРОДА ПЕРМИ

Щипанова Е.А.^{1,2}, Печенкина К.О.^{1,2}, Селиванов А.Е.¹, Новоселова Л.В.²

¹ Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация: Приведен аннотированный список видов лишайников, обнаруженных на территории проектируемого экологического парка «Долина р. Данилиха». Для каждого вида указана фитоценотическая и субстратная приуроченность. Список содержит 36 видов лишайников, принадлежащих к 22 родам.

Ключевые слова: лишайники, урбанолихенофлора, эпифиты.

LICHENS OF THE PROJECTED ECOLOGICAL PARK «DANILIKHA RIVER VALLEY» OF THE CITY OF PERM

Shchipanova E.A.^{1,2}, Pechenkina K.O.^{1,2}, Selivanov A.E.¹, Novoselova L.V.²

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Professional Education

«Perm State Humanitarian Pedagogical University», Perm, Russia

² Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Perm State University»,
Perm, Russia

Abstract: An annotated list of lichen species found in the territory of the projected ecological park «Danilikha River Valley» is presented. For each species, the phytocenotic and substrate habitat is indicated. The list contains 36 lichen species belonging to 22 genera.

Keywords: lichen, urban floras of lichens, epiphytes.

Проектируемая особо охраняемая природная территория местного значения «Долина р. Данилиха» находится в пределах Свердловского района г. Перми. По территории парка протекает р. Данилиха, на берегах которой весьма разнообразен состав древесных и травянистых растений, т.к. эта территория ранее включала земли садовых товариществ. Данная работа, направленная на выявление видового состава лишайников и составление аннотированного списка видов, является одним из этапов по продолжению инвентаризации урбанолихенофлоры г. Перми.

Первый список видов, содержащий сведения о лишайниках города Перми составлен П.Н. Крыловым в начале 80-х гг. XIX столетия (37 видов) и в 1926 г. дополнен А.Н. Окснером (отметил 38 видов, из которых 27 не были указаны Крыловым) [1, 2].

На современном этапе для территории Перми и городов Пермского края исследования выполнены Л.В. Гагариной [3, 4]. Автор характеризует особенности, присущие лишайникам

городов – нарушения развития соредиев и изменения длины лопастей [5]. Основой видового состава городов являются устойчивые к загрязнению группы лишайников [6].

Исследованиями были охвачены разнообразные природные комплексы в пределах указанной территории. В полевой сезон 2020 г. на территории парка авторами подробно обследованы все заселяемые лишайниками субстраты и собраны образцы представленных на территории видов. При построении маршрута учитывалось разнообразие фитоценозов. Географические координаты фиксировались с помощью спутникового навигатора GPS (система координат WGS-84). Камеральная обработка образцов проводилась в лаборатории биоразнообразия растений и лишайнизированных грибов кафедры биологии и географии ПГПУ. Видовая идентификация проводилась согласно общепринятым методикам [7], информация внесена и в базу данных (Лишайники Урала), образцы инсерированы в гербарий (РПУ).

Всего в результате полевых наблюдений и камеральной идентификации собранных материалов обнаружено 36 видов лишайников, относящихся к 22 родам, 12 семействам и 3 классам (*Candelariomycetes*, *Dothideomycetes*, *Lecanoromycetes*). Большинство видов принадлежит классу *Lecanoromycetes* – 32 вида, что составляет 89%.

Подавляющее большинство обитающих на территории парка лишайников относится к эколого-субстратной группе эпифитов. Наибольшее число видов отмечено на коре клена американского, тополя, березы, поскольку эти форофиты составляют основу паркового насаждения. Широко распространенными на исследуемой территории являются преимущественно эпифитные лишайники *Parmelia sulcata* Taylor., *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.), *Physcia stellaris* (L.) Nyl. *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr., *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.

Интересно, что антропогенно измененные субстраты могут обогащать лишенофлору территории. Например, наличие на территории разрушенных бетонных построек и железнодорожного полотна дает возможность произрастать эпилитным лишайникам.

Лишенофлора района исследования не отличается значительным видовым богатством, поскольку территория парка имеет небольшую площадь с высокой антропогенной нагрузкой из-за расположения в центре города и имеет относительно низкое разнообразие субстратов, на которых могут обитать лишайники.

В ходе исследования составлен аннотированный список видов лишайников, приводятся цитаты этикеток гербарных образцов. Латинские названия таксонов указаны в соответствии с последней сводкой по базе данных Index Fungorum, CABI Bioscience Databases [8].

Аннотированный список лишайников ООПТ «Серебрянский парк»

1. *Amandinea punctata* (Hoffm.) Coppins & Scheid.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

2. *Vacidia circumspecta* (Nyl. ex Vain.) Malme

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник с примесью тополя. На коре тополя. С.Ш. 57.97899°, В.Д. 56.22862°

3. *Vacidina phacodes* (Körb.) Vězda

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Ивняк в долине реки. На плите у реки. С.Ш. 57.98266°, В.Д. 56.22805°

4. *Caloplaca cerina* (Ehrh. ex Hedw.) Th. Fr.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник с примесью тополя и вяза. Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На акации, сирени, вишне, бузине.

5. *Caloplaca flavovirescens* (Wulfen) Dalla Torre & Sarnth.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник. На бетонном столбе. С.Ш. 57.97753°, В.Д. 56.22363°

6. *Caloplaca luteoalba* (Turner) Th. Fr.

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На вишне. С.Ш. 57.97667°, В.Д. 56.22444°

7. *Athallia pyracea* (Ach.) Arup, Frödén & Söchting

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Высокотравный заливной луг в долине реки. На древесине лестницы. С.Ш. 57.97835°, В.Д. 56.22871°

8. *Candelariella aurella* (Hoffm.) Zahlbr.

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На бетоне. С.Ш. 57.97852°, В.Д. 56.22545°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник. На бетонном столбе. С.Ш. 57.97753°, В.Д. 56.22363°

9. *Candelariella vitellina* (Hoffm.) Müll. Arg.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

10. *Cladonia deformis* (L.) Hoffm.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На прогнившем заборе. С.Ш. 57.97498°, В.Д. 56.21977°

11. *Cladonia macilenta* Hoffm.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Высокотравный заливной луг в долине реки. На древесине лестницы. С.Ш. 57.97835°, В.Д. 56.22871°

12. *Evernia prunastri* (L.) Ach.

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На боярышнике. С.Ш. 57.97679°, В.Д. 56.22429°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На яблоне. С.Ш. 57.98089°, В.Д. 56.22970°

13. *Hypogymnia physodes* (L.) Nyl.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На заборе. С.Ш. 57.97498°, В.Д. 56.21977°

14. *Polyzozia hagenii* (Ach.) S.Y. Kondr., Lőkös & Farkas

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Высокотравный заливной луг в долине реки. На древесине лестницы. С.Ш. 57.97835°, В.Д. 56.22871°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник. На бетонном столбе. С.Ш. 57.97753°, В.Д. 56.22363°

15. *Lecanora saligna* (Schrad.) Zahlbr.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк с осинкой в подросте. На березе. С.Ш. 57.97991°, В.Д. 56.22702°

16. *Lecanora symmicta* (Ach.) Ach. s. lat.

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*) мертвопокровный. На коре клена американского. С.Ш. 57.97776°, В.Д. 56.22936°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

17. *Leptogium saturninum* (Dicks.) Nyl.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*). На коре ивы. С.Ш. 57.97887°, В.Д. 56.22864°

18. *Leptorhaphis atomaria* (Ach.) Szatala

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*) мертвопокровный. На коре клена американского. С.Ш. 57.97776°, В.Д. 56.22936°

19. *Melanohalea exasperatula* (Nyl.) O. Blanco, A. Crespo, Divakar, Essl., D. Hawksw. & Lumbsch

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На боярышнике. С.Ш. 57.97679°, В.Д. 56.22429°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник. На коре ивы белой. С.Ш. 57.97835°, В.Д. 56.22562°

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На вишне. С.Ш. 57.97888°, В.Д. 56.22543°

20. *Naetrocymbe rhypona* (Ach.) R. C. Harris

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*). На коре тополя. С.Ш. 57.97887°, В.Д. 56.22864°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*) На коре тополя. С.Ш. 57.97992°, В.Д. 56.22892°

21. *Ochrolechia arborea* (Kreyer) Almb.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На заборе. С.Ш. 57.97498°, В.Д. 56.21977°

22. *Parmelia sulcata* Taylor

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*). На коре сухого боярышника. С.Ш. 57.98059°, В.Д. 56.22865°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник. На коре ивы белой. С.Ш. 57.97835°, В.Д. 56.22562°

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549°

23. *Phaeophyscia ciliata* (Hoffm.) Moberg

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). Кленовник (*Acer negundo*) мертвопокровный. Березняк. На боярышнике, яблоне, коре клена американского, березе.

24. *Phaeophyscia kairamoi* (Vain.) Moberg

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На вишне. С.Ш. 57.97667°, В.Д. 56.22444°

25. *Phaeophyscia nigricans* (Flörke) Moberg

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На боярышнике. С.Ш. 57.97679°, В.Д. 56.22429°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Липняк хвощовый. На липе. С.Ш. 57.98082°, В.Д. 56.23823°

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). На яблоне. С.Ш. 57.97797°, В.Д. 56.22411°

26. *Phaeophyscia orbicularis* (Neck.) Moberg

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). Кленовник (*Acer negundo*). Березняк. На коре клена американского. На коре сухого боярышника, древесине лестницы, коре черемухи, сирени, вишне, березе.

27. *Physcia adscendens* (Fr.) H. Olivier

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На боярышнике. С.Ш. 57.97679°, В.Д. 56.22429°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Березняк. На березе. С.Ш. 57.97823°, В.Д. 56.22549° RPU 2834025

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Смешанный лес из тополя и липы. На липе. С.Ш. 57.98082°, В.Д. 56.23823°

28. *Physcia aipolia* (Ehrh. ex Humb.) Fűrnr.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На коре клена американского, коре сухого боярышника, коре клена платанолистного, сирени.

29. *Physcia stellaris* (L.) Nyl.

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Смешанный лес из тополя и липы. Кленовник. Липняк хвощовый. Кленовник с примесью тополя и вяза. Ивняк в пойме реки. На липе, коре ивы белой акации.

30. *Physconia detersa* (Nyl.) Poelt

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Липняк хвощовый. На липе. С.Ш. 57.98082°, В.Д. 56.23823°

31. *Psilolechia lucida* (Ach.) M. Choisy

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*) с примесью тополя. Березняк. Липняк хвощовый. Кленовник. Высокотравный заливной луг в долине реки. На древесине лестницы, коре ивы белой, липе, березе, коре тополя, коре черемухи, коре клена платанолистного.

32. *Rinodina pyrina* (Ach.) Arnold

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник с подростом черемухи. На черемухе. С.Ш. 57.97955°, В.Д. 56.22579°

33. *Rinodina septentrionalis* Malme

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*). На коре березы. С.Ш. 57.98079°, В.Д. 56.22980°

34. *Oxneria fallax* (Arnold) S.Y. Kondr. & Kärnefelt

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Насаждения плодовых деревьев (старые сады). На вишне. С.Ш. 57.97888°, В.Д. 56.22543°

35. *Xanthoria parietina* (L.) Th. Fr.

1. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Липняк хвощовый. На липе. С.Ш. 57.98082°, В.Д. 56.23823°

2. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник с примесью тополя и вяза. На акации. С.Ш. 57.97888°, В.Д. 56.22543°

3. Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник (*Acer negundo*) мертвопокровный. На коре клена американского. С.Ш. 57.97776°, В.Д. 56.22936°

36. *Xanthoria ulophyllodes* Räsänen

Город Пермь, Свердловский район. Лесопарк в долине реки Данилиха (Серебрянский лес). Кленовник с примесью тополей и рябиной в подлеске. На клене американском. С.Ш. 57.98147°, В.Д. 56.22731°

Библиографический список

1. Крылов П.Н. Материал к флоре Пермской губернии. Вып. 3 // Труды общества естествоиспытателей при Казанском университете. – 1882. – Т. 11, вып. 5. – С. 6–40.
2. Окснер А.М. Материалы для лишенофлоры Урала та прилегающих областей // Ботанический журнал АН УССР. – 1945. – Т. 2. – С. 13–39.
3. Гагарина Л.В. Лишайники городов Пермь, Чердынь и Кунгур // Вестник СПбГУ. Сер. 3. – 2007, Вып. 3. – С. 31–39.
4. Гагарина Л.В. Использование эпифитных лишайников в системе биоиндикации атмосферного воздуха в г. Перми // Экология: проблемы и пути решения. – Пермь, 2002. – С. 29–30
5. Гагарина Л.В. Распространение и экология эпифитных лишайников г. Перми // Экология: проблемы и пути решения. Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. – Пермь, 2004. – С. 32–35
6. Гагарина Л.В., Шкраба Е.М. Биоразнообразие и экология лишайников урбанизированных территорий // Фундамент и приклад. исследования в биологии и экологии: Материалы Регион. науч. конф. студентов, аспирантов и молодых ученых. – Пермь, 2007. – С. 192–194.
7. Флора лишайников России: Биология, экология, разнообразие, распространение и методы изучения лишайников / под. ред. М.П. Андреев, Д.Е. Гимельбрант. М; СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. 392 с.
8. Index Fungorum [Электронная база данных]. URL: <http://www.indexfungorum.org>. (дата обращения: 03.10.22).

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ЭКОЛОГИЯ ПОЧВ

doi:10.17072/simbioz-2022-529-534

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СУХОЙ ГНИЛИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ

Андреева Т.Е.¹, Махин Назифуллах², Марданова А.М.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной
медицины и биологии, Казань, Россия

² Кабульский университет, Кабул, Афганистан

Аннотация. Сухая гниль клубней картофеля является одной из важных причин потери урожая в процессе хранения. Разные виды микромицетов рода *Fusarium* вызывают сухую гниль клубней. Из клубня с сухой гнилью выделен изолят DR40, идентифицированный как штамм *Fusarium oxysporum*. Штамм DR40 способен вызывать сухую гниль клубней картофеля сорта Жуковский ранний при искусственном инфицировании, проявляет умеренную устойчивость к фунгициду флудиоксонилу.

Ключевые слова: картофель, сухая гниль, *Fusarium*, фунгициды.

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THE CAUSATIVE AGENT OF DRY ROT OF POTATO TUBERS

Andreeva T.E.¹, Makhin N.², Mardanova A.M.¹

¹Kazan (Volga Region) Federal University, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan,
Russia

²Farah University, Afghanistan

Abstract. Dry rot of potato tubers is one of the important causes of yield loss during storage. Different types of fungi of the genus *Fusarium* cause dry rot of tubers. The DR40 isolate was isolated from a tuber with dry rot and identified as a strain of *Fusarium oxysporum*. The DR40 strain is capable of causing dry rot of potato tubers of the Zhukovsky early variety during artificial infection, and exhibits moderate resistance to the fungicide fludioxonil.

Keywords: potatoes, dry rot, *Fusarium*, fungicides.

Введение

Инфекционные заболевания растений ответственны за основные экономические потери в сельскохозяйственной промышленности во всем мире. Чтобы свести к минимуму ущерб, наносимый сельскохозяйственным культурам болезнями во время выращивания, сбора урожая и послеуборочной обработки, а также для максимального повышения продуктивности и обеспечения устойчивости сельского хозяйства, большое значение имеет своевременное обнаружение и профилактика болезней сельскохозяйственных культур [1]. Хотя в настоящее время достигнуты большие успехи в диагностике заболеваний и доступны современные

технологии их контроля, фитопатогены все еще приводят к огромным потерям урожая во всем мире [2].

Сухая гниль картофеля (*Solanum tuberosum* L.) является одним из самых важных заболеваний картофеля, влияющих на клубни в процессе хранения и семена после посадки. Различные *Fusarium* spp. могут вызывать сухую гниль клубней картофеля, что является одной из самых существенных причин потери урожая [3, 4]. Заражение семенных клубней может снизить урожайность растений, убив развитие ростков картофеля, что ведет к потере урожая до 25%, а более 60% клубней могут быть инфицированы при хранении. Так как основным источником возбудителя является семенной клубень, то посадка инфицированных клубней приводит к заражению почвы, в которой микромицеты могут длительно сохраняться [4]. Большинство сортов картофеля, обычно культивируемых в России, восприимчивы к фузариозной инфекции. Контроль *Fusarium* spp. включает самые разнообразные методы борьбы, к которым относятся механические, биологические и химические методы. На сегодняшний день самым распространенным методом является применение химических фунгицидов. Хотя существует много различных фунгицидов с самым разнообразным механизмом действия в настоящее время все больше данных о том, что многие микромицеты проявляют к ним устойчивость [5, 6]. Данный факт заставляет задуматься об эффективности применения фунгицидов в борьбе с микромицетами и необходимости создания и внедрения других методов контроля.

Материалы и методы

Микромицеты культивировали на среде Чапека (г/л): NaNO_3 – 2 г; K_2HPO_4 – 1 г; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5 г; KCl – 0.5 г; FeSO_4 – 0.01 г; сахароза – 30 г; агар – 15 г; молочная кислота – 1% (добавляется после автоклавирования); pH 6.0 и среде Сабуро (г/л): пептон бактериологический – 10 г; глюкоза – 40 г; дрожжевой экстракт – 5 г; агар – 20 г, pH 6.0. Культивирование проводили в термостате при температуре 28 °С.

Микромицеты выделяли из клубня картофеля с сухой гнилью с использованием среды Чапека, на поверхности которой выкладывали кусочки пораженной ткани (0.5x0.5 см), отобранные из глубины пораженного участка. Посевы культивировали в течение 7 сут. Отбирали колонии микромицетов с характерной морфологией конидий и пересеивали на свежие среды.

Для выделения ДНК воздушный мицелий собирали, гомогенизировали и использовали для выделения ДНК [7]. Идентификацию изолята проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующим секвенированием ампликонов фрагментов ДНК и использованием универсальных праймеров к ITS локусам гена 5.8S рРНК [8]. Биоинформатический анализ сиквенсов проводили с помощью программы NtBLAST данных NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>].

Для оценки патогенных свойств условно-здоровые клубни картофеля сорта Жуковский ранний инфицировали 20 мкл суспензии спор (10^5 КОЕ/мл) методом укола на глубину 1.5-2.0 см. Зараженные клубни инкубировали в течение 7-14 суток при 28 °С, затем еще 14 сут при комнатной температуре.

Растворы фунгицидов флудиоксонила (Максим) и пенконазола (Топаз) (с начальными концентрациями 25 мкг/мл и 100 мкг/мл соответственно) стерилизовали фильтрованием через шприц-фильтр (диаметр пор 0.22 мкм). Фунгициды добавляли к питательной среде до конечных концентраций: флудиоксонил – 0.63 мкг/мл, 1.25 мкг/мл, 2.50 мкг/мл и 5.00 мкг/мл; пенконазол – 0.1 мкг/мл, 0.5 мкг/мл, 1.0 мкг/мл, 1.5 мкг/мл и 2.0 мкг/мл. 20 мл среды разливали

в стерильные чашки Петри. Из 7-сут культур грибов вырезали блоки из агара с мицелием диаметром около 5 мм и помещали в центр чашки Петри со средой и фунгицидами. Культуры инкубировали в течение 6 сут в темноте при комнатной температуре, диаметр колоний измеряли через 72, 96, 120 и 144 час инкубирования.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью GraphPad prism версии 8.4.3.

Результаты и обсуждение

Из клубня картофеля с сухой гнилью был выделен в чистую культуру изолят DR40 с морфологией мицелия и конидий, характерных для микромицетов рода *Fusarium*. Была проведена молекулярно-генетическая идентификация штамма по гомологии ITS участков 5.8S рРНК. На основе 97.2% гомологии изолят DR40 идентифицирован как штамм *Fusarium oxysporum*. Известно, что разные виды *Fusarium* вызывают фузариоз и сухую гниль клубней картофеля, и среди них чаще всего выделяются представители комплекса *F. oxysporum* [9].

На рисунке 1 представлена динамика роста штамма при разных температурах. Из диаграммы видно, что штамм хорошо растет при 28 °С на средах Чапека и Сабуро и практически не растет при 37 °С.

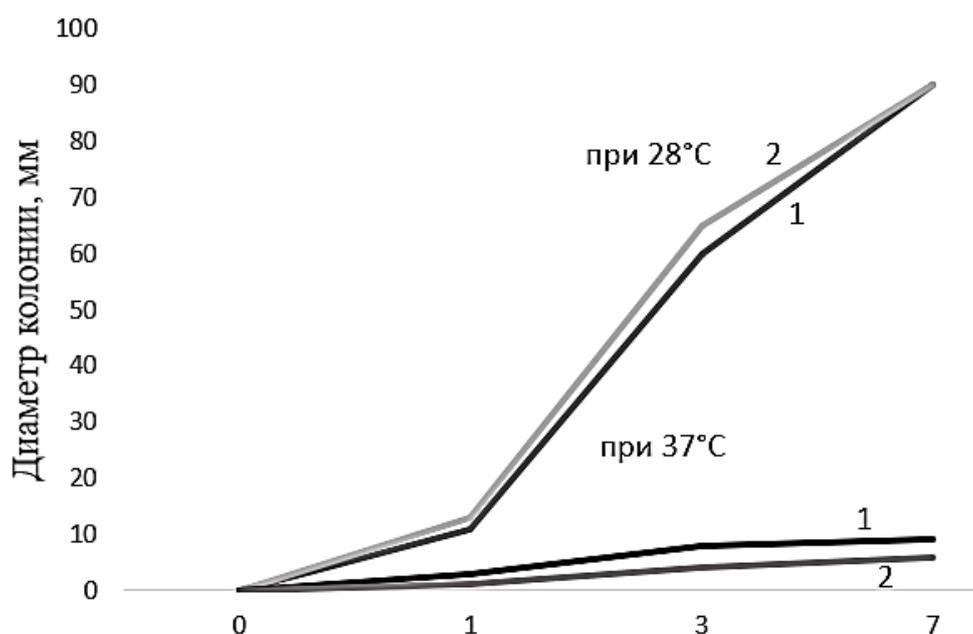


Рисунок 1 – Влияние температуры на рост штамма *F. oxysporum* DR40 на средах Чапека (1) и Сабуро (2). 28 °С и 37 °С.

Оценивали способность изолята DR40 вызывать сухую гниль клубней картофеля сорта Жуковский ранний при искусственном инфицировании уколом. Заражали по 5 клубней и инкубировали их в течении 21 суток, а затем клубни делили на 4 части и оценивали размер пораженных участков (рисунок 2). Штамм *F. oxysporum* DR40 проявляет высокие вирулентные свойства, а клубни сорта Жуковский ранний проявляют высокую чувствительность к фузариозу.



Рисунок 2 – Способность штамма *F. oxysporum* DR40 вызывать сухую гниль в клубнях картофеля сорта Жуковский ранний при искусственном инфицировании.

В настоящее время основным методом контроля фузариозной инфекции важных сельскохозяйственных растений является использование различных химических фунгицидов [10]. Однако в результате многолетнего использования фунгицидов уже с конца 1980-х появились устойчивые штаммы микромицетов [11].

Исследовали влияние фунгицидов двух различных классов, флудиоксонила и пенканазола, на рост штамма микромицета *F. oxysporum* DR40 (рисунки 3 и 4). Оба фунгицида ингибировали рост грибов с дозозависимым эффектом. Так, флудиоксонил в максимальной концентрации (5.0 мкг/мл) ингибировал рост микромицетов на 5 и 6 сутки роста на 69% и 75% от контроля соответственно (рисунок 3). Этот штамм фузарий оказался более чувствительным к пенканазолу, который в концентрациях 1 и 2 мкг/мл ингибировал рост практически на 90% от контроля.

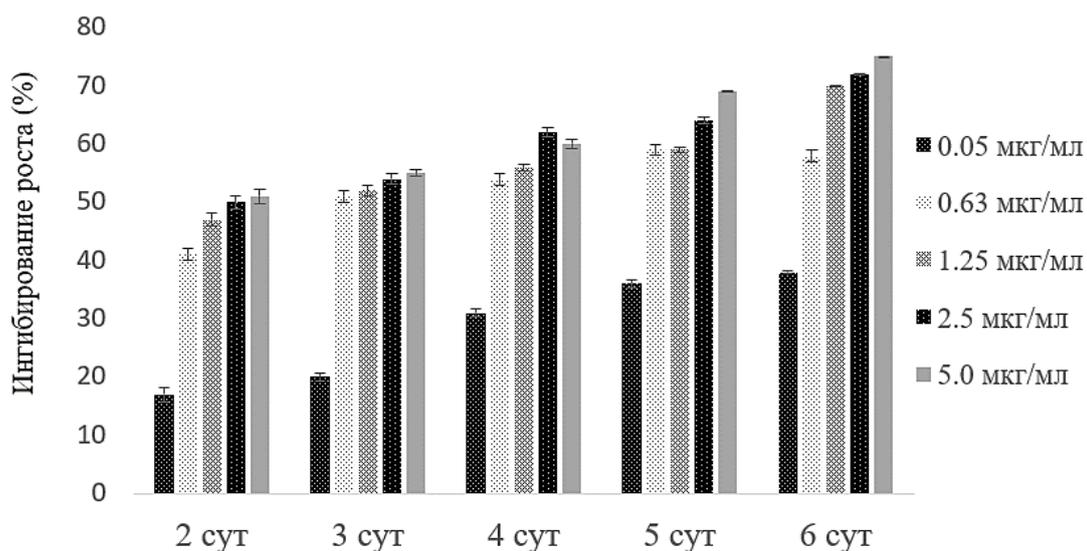


Рисунок 3 – Ингибирование роста микромицета *F. oxysporum* DR40 на среде, содержащей различные концентрации флудиоксонила (0.3-5.0 мкг/мл) в течение 6 суток.

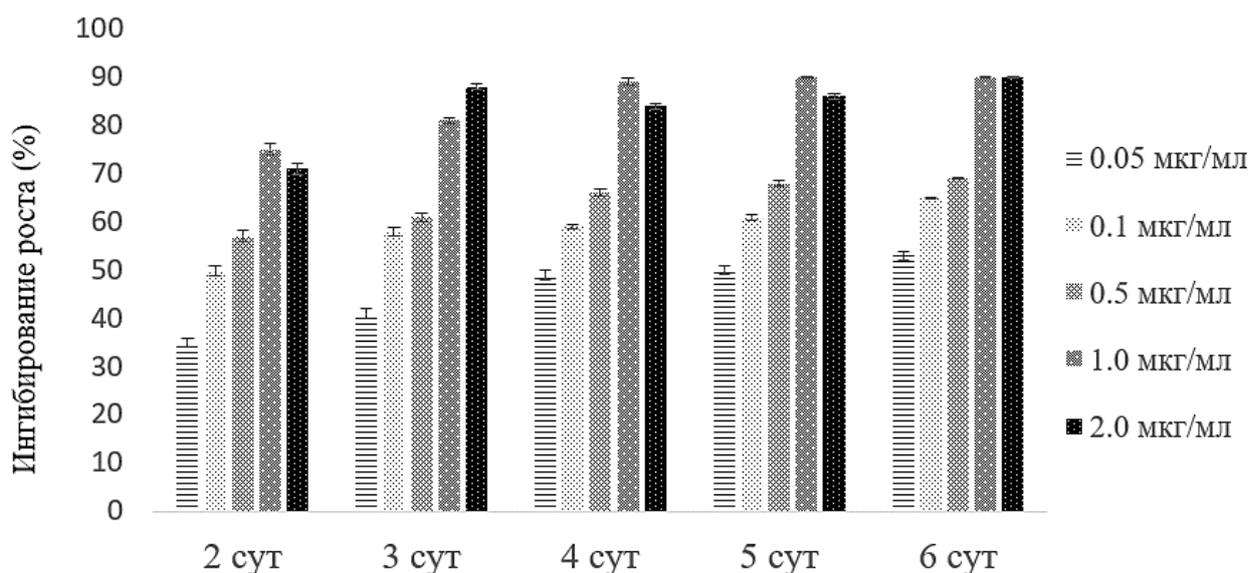


Рисунок 4 – Ингибирование роста колонии микромицета *F. oxysporum* DR40 на среде, содержащей различные концентрации пенконазола (0.05-2.0 мкг/мл) в течение 6 суток.

Таким образом, из клубня картофеля с сухой гнилью выделен изолят, идентифицированный как штамм *F. oxysporum* DR40, обладающий высокой вирулентностью. Штамм чувствителен к фунгициду пенконазолу, но проявлял умеренную устойчивость к флудиоксонилу, который даже в высоких концентрациях ингибировал рост только на 65-75%.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ 22-16-00138 в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Библиографический список

1. Fang Y., Ramasamy R.P. Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection // Biosensors (Basel). – 2015. – V. 5. – №3. – P. 537-561.
2. Vurro M., Bonciani B., Vannacci G. Emerging infectious diseases of crop plants in developing countries: Impact on agriculture and socio-economic consequences // Food Security. – 2010. – V. 2 – P. 113-132.
3. Daami-Remadi, M. Potato *Fusarium* dry rot in tunisia: current status and future prospects // Pest Technol. – 2012. – V.6. – P.15-22.
4. Tiwari R. K., Kumar R., Sharma S., Sagar V., Aggarwal R., Naga K. C., Lal M. K., Chourasia K. N. Potato dry rot disease: current status, pathogenomics and management // 3 Biotech. – 2020. – V. 10. – № 11. – P. 503.
5. Chen Y., Zhou M. G. Characterization of *Fusarium graminearum* Isolates Resistant to Both Carbendazim and a New Fungicide JS399-19 // Phytopathology. – 2009. – V.99. – P. 441-446.
6. Sandipan P. B., Solanki B. P., Patel N. N., Patel R. L., Verma P. D., Desai H. R. Efficacy of Different Fungicides Against Dry Rot Pathogen of Potato Caused by *Fusarium* sp. under In vitro Condition // Cercetari Agronomice in Moldova. – 2016. – V. 49. – № 4. – P. 69-74.

7. Aamir S., Sutar S., Singh S. K., Baghela A. A rapid and efficient method of fungal genomic DNA extraction, suitable for PCR based molecular methods // *Plant Pathology & Quarantine*. – 2015. – V.5 – No 2. – P. 74-81.
8. Kawasaki A., Donn S., Ryan P. R., Mathesius U., Devilla R., Jones A., Watt M. Microbiome and exudates of the root and rhizosphere of brachypodium distachyon, a model for wheat // *PLOS ONE*. – 2016. – V.11. – No 10. – E0264533.
9. Cullen D.W., Toth I. K., Pitkin Y. Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil // *Phytopath.* – 2005. – V.95. – P.1462-1471.
10. Brandhorst T.T., Kean I.R.L., Lawry S.M., Wiesner D.L., Klein B.S. Phenylpyrrole fungicides act on triosephosphate isomerase to induce methylglyoxal stress and alter hybrid histidine kinase activity // *Sci. Rep.* – 2019. – V.9. – P. 5047.
11. Tivoli B., Deltour A., Molet D., Bedin P., Jouan B. Mise en évidence de souches de *Fusarium roseum* var. *sambucinum* résistantes au thiabendazole, isolées à partir de tubercules de pomme de terre // *Agronomie*. – 1986. – V. 6. – P. 219-224.

СОДЕРЖАНИЕ ОДНОГО ИЗ ИЗОТОПОВ РАДОНА (Rn-222) В ПОЧВАХ ТОБОЛЬСКОГО И ВАГАЙСКОГО РАЙОНА ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Бояршинова Ю.К.¹, Ушаков В.Ю.¹, Алимова Г.С.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Тобольская комплексная станция Уральского отделения Российской академии наук,
Тобольск, Россия

Аннотация. Проведено исследование почв Тобольского и Вагайского района Тюменской области на содержание изотопа радона (Rn-222). Полученные данные свидетельствуют о некотором превышении потока радона вблизи города Тобольск.

Ключевые слова: радиоактивность, Rn-222, почвы Тюменской области.

THE CONTENT OF ONE OF THE RADON ISOTOPES (RN-222) IN THE SOILS OF THE VAGAYSKY AND TOBOLSK DISTRICTS OF THE TYUMEN REGION

Boyarshinova Yu. K.¹; Ushakov V. Yu.¹; Alimova G. S.².

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia;

² Tobolsk Complex Station of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Tobolsk, Russia.

Abstract. A study of the soils of the Tobolsk and Vagaysky districts of the Tyumen region for the content of the radon isotope (Rn-222) was carried out. The data obtained indicate a slight excess of radon flux near the city of Tobolsk.

Keywords: radioactivity, Rn-222, soils of the Tyumen region.

В настоящее время загрязнение почв и окружающей среды в целом приобретает всё более глобальное значение. Более того, за счёт постоянного развития антропогенной деятельности, подобная картина стремительно ухудшается. Так, среди веществ антропогенного происхождения, именно радионуклиды представляют собой наибольшую опасность [3,5].

Исследуемый нами радон (Rn-222) является самым тяжёлым газом из инертных, не имеет запаха и вкуса, прозрачный и бесцветный, измеряется, как правило, в виде плотности потока радона-222, которая измеряется в мБк/(м²·с), где Бк – это беккерель (один Бк определяется как активность источника, в котором за одну секунду происходит в среднем один радиоактивный распад). Образуется в процессе радиоактивного распада урана (U-238), а точнее радия (Ra-226) [4]. По СП 2.6.1.2612-10 «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности» с изменениями на 16 сентября 2013 года (ОСПОРБ 99/2010), допустимые значения плотности потока Rn-222 с поверхности почв и грунтов составляют: не более 80 мБк/(м²·с), предназначенных для строительства жилых зданий; не более 250 мБк/(м²·с) для строительства зданий производственного назначения [7].

Период полураспада радона составляет 3,8 суток, газ может проникать в жилые дома, где дальнейшая дезинтеграция элемента приводит к образованию радиоактивных дочерних атомов [4]. Последние, к которым относится 4 изотопа (^{222}Rn ; ^{218}Rn ; ^{220}Rn ; ^{219}Rn) с периодом полураспада менее 30 минут, представляют максимальную опасность для человека, поскольку испускают альфа-частицы, состоящие из 2 протонов и 2 нейтронов, а также имеют большую массу и энергию. Данное альфа-излучение способно вызвать клеточную трансформацию в респираторном тракте и привести к развитию рака лёгких, то есть рака, фактически индуцированного радоном [8].

Важно отметить, что основными источниками радона в окружающей среде является: естественный путь поступления (проникая через трещины в горных породах при разломах земной коры); искусственный путь (выбросы ТЭС, работающих на органическом топливе); а также горная промышленность и металлургия (поступление радионуклида при эксплуатации карьеров) [1]. Известно, что большая часть радона выделяется из скальных пород в земной коре и переносится к поверхности потоками грунтовых вод, после чего проникает в почву. Затем происходит закрепление данного элемента в биocenотической системе «почва-растение». В недрах Земли он распространён крайне неравномерно, поскольку накапливается в тектонических нарушениях, куда поступает по системам микротрещин из горных пород [2].

Описываемое исследование началось ещё в 2019 году, за его период было заложено и описано около 25 почвенных разрезов, 10 из которых (рис. 1) подробно проанализированы мной в ходе выпускной квалификационной работы, а 5 из них будут представлены в данной статье.

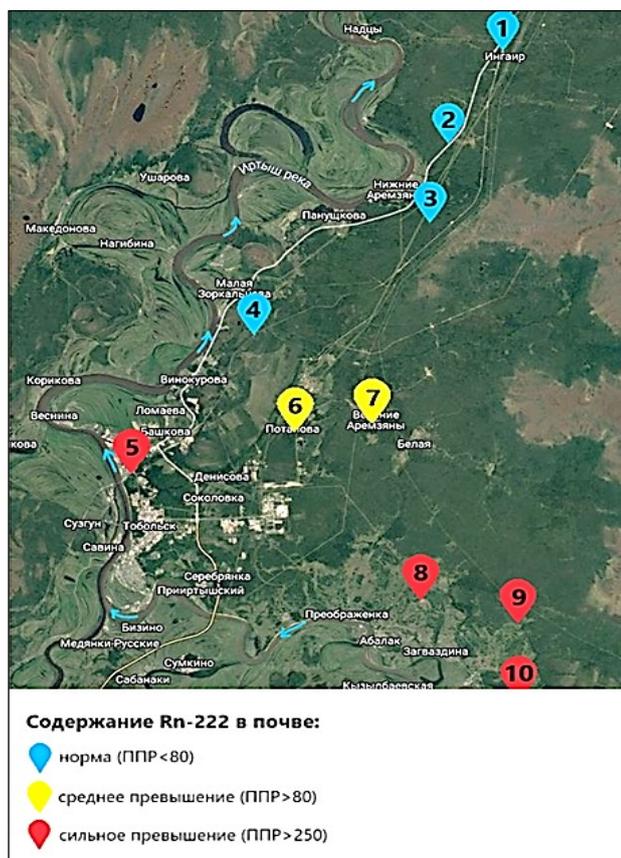


Рисунок 1 – Оценка ППР в почвах Тюменской области.

Ранее на территории Тюменской области работы, посвящённые исследованию радиоактивности почв малочисленны и проводились лишь на севере региона.

Целью исследования было изучение отобранных почвенных проб на предмет содержания в них ^{222}Rn . Измерение плотности потока радона-222 проведено с помощью измерительного комплекса «Камера-01». Так, полученные показатели плотности потока радона (ППР) по 5 исследуемым почвам представлены на рисунке 2.

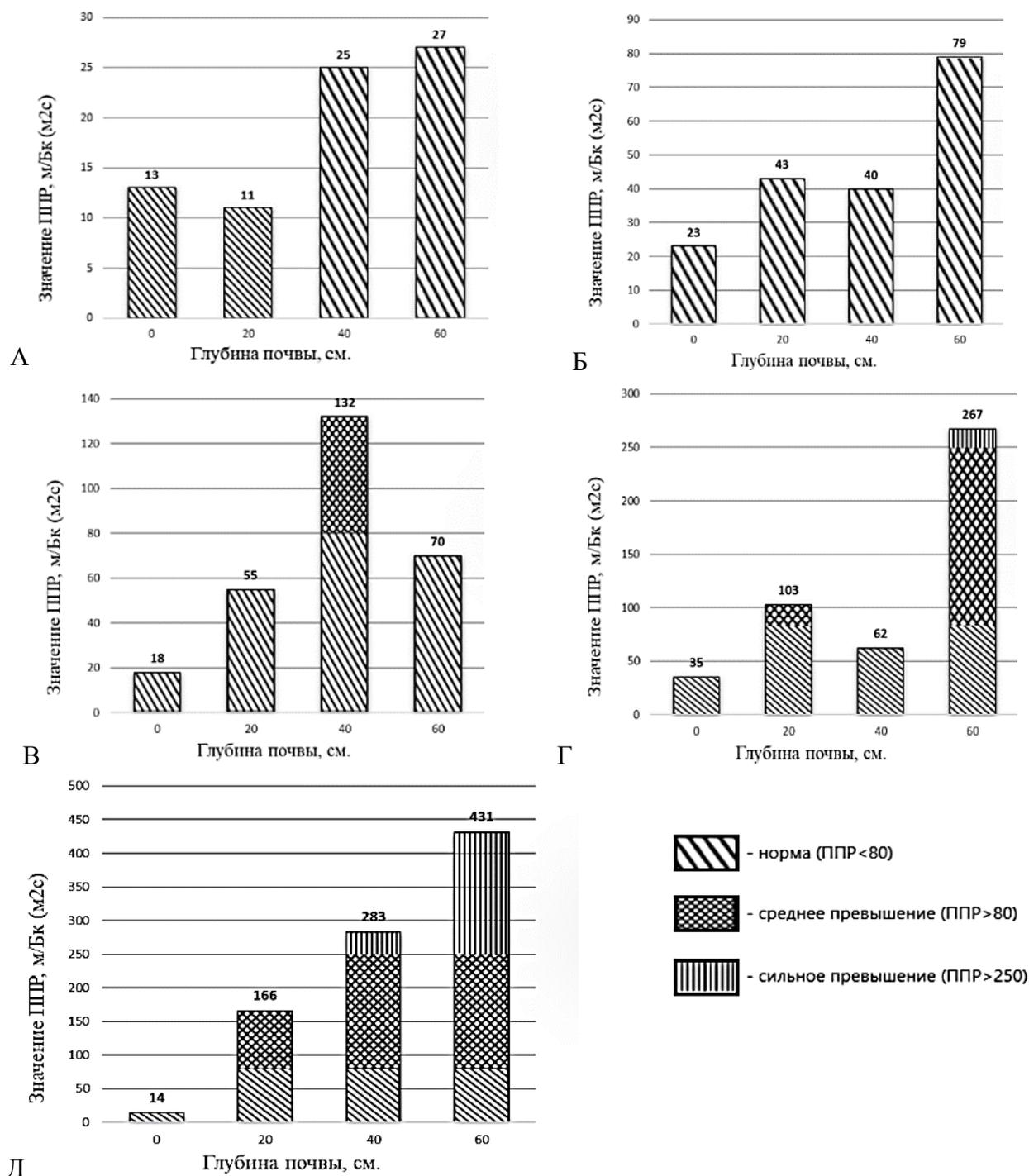


Рисунок 2 – Оценка плотности потока радона в трёх исследуемых почвах (А – тёмногумусовая аллювиальная почва; Б – дерново-подзолистая со вторым гумусовым горизонтом; В – аллювиальная со вторым гумусовым горизонтом; Г – дерново-луговая темногумусовая оглеенная; Д – дерново-луговая почва).

Исходя из данных, представленных на рисунке 1, сильное превышение Rn-222 фиксируется в нижних горизонтах двух почвенных разрезов. Это дерново-луговая

тёмногумусовая оглеенная – N 58.14095°, E 68.790083° (Г, №9 на Рис. 1) и дерново-луговая почвы – N 58.174767°, E 68.6322670° (Д, №8 на Рис. 1), расположенные на луговой местности в зоне аккумулятивного ландшафта. У первой из них превышение наблюдалось на глубине 60 см. – 267 мБк/(м²·с), а у последней на глубине 40 см. – 273 мБк/(м²·с) и 60 см. – мБк/(м²·с).

Незначительное превышение (132 мБк/(м²·с)) наблюдается на глубине почв – 40 см в разрезе аллювиальной почвы со вторым гумусовым горизонтом (В, №7 на Рис. 1), которая тоже располагалась в зоне луговой местности, но на плакорном участке рельефа, неподалёку от деревни Верхние Аремзяны – N 58.307133°, E 68.664267°.

Превышения ППР не было зафиксировано в двух почвенных разрезах. Это темногумусовая аллювиальная почва (А, №4 на Рис. 1), расположенная в зоне смешанного леса на плакорном участке рельефа, а именно – в микрорайоне Менделеево (N 58.376717°, E 68.42055°). И дерново-подзолистая почва со вторым гумусовым горизонтом (Б, №3 на Рис. 1), расположенная в зоне хвойного леса на плакорном участке рельефа – N 58.470417°, E 68.671283°.

Таким образом, анализируя все полученные результаты, можно предположить, что превышение показателей плотности потока Rn-222 в основном фиксируется в нижних горизонтах почвенного слоя, что указывает на повышенную концентрацию радона-222 в области грунтовых вод. Связано это с тем, что движение радонового излучения осуществляется из подстилающих горных пород, по трещинам и разломам, после чего проникает в область грунтовых вод.

Стоит отметить, что разрез дерново-луговой почвы производился на территории, которая использовалась в аграрных целях. В связи с чем, в ее структуре присутствует так называемая плужная подошва (уплотнённый слой на границе пахотного и подпахотного горизонтов), которая образуется при частом внесении различных удобрений, а также при неправильной обработке машинно-тракторными агрегатами. Подобные уплотнения в значительной мере способны снижать скорость выхода радона, что как раз-таки удерживает его в области нижних горизонтов почвенного слоя, отсюда фиксируется превышение показателей ППР.

При этом почва с сильным превышением показателей ППР располагается в зоне аккумулятивного (низинного) ландшафта, то есть сравнительно близко к грунтовым водам, следовательно, ближе к точкам так называемого выхода радонового излучения. Что же касается почв, расположенных на плакорном участке рельефа, они находятся гораздо выше этих точек выхода, соответственно и показатели ППР гораздо ниже.

Работа выполнена в рамках фундаментальных научных исследований по теме: «Региональные особенности пространственно-временной дифференциации почв юга Тюменской области» (Регистрационный номер НИОКТР 122011900105-8). по теме: «Региональные особенности пространственно-временной дифференциации п

Библиографический список

1. Бекман И.Н. Экологическая радиохимия и радиозэкология: учебное пособие. Радиохимия, Т. 6. М.: Изд-во ОнтоПринт, 2015. 400 с.
2. Бурлаенко В.З. Оценка радиационного состояния компонентов природной среды юга Тюменской области: дис. канд. биол. наук. Тюмень, 2018. 147 с.
3. Дедю И.И. Экологический энциклопедический словарь. Главная редакция Молдавской Советской Энциклопедии. Кишинёв, 1990. 408 с.

4. Левин М.Н., Негрбов О.П, Гитлин В.Р., Селиванова О.В., Иванова О.А. Радон. Учебное пособие. Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2008. 42 с.
5. Матвеевко Т.И., Крупская Л.Т., Дербенцева А.М. Оценка радиационного состояния почв и растительности в зоне влияния теплоэлектростанции. Хабаровск: Изд-во ИГД ДВО РАН, 2006. 114 с.
6. Паспорт №136132.134: Комплекс измерительный для мониторинга радона «Камера-01» // Научно-технический центр «НИТОН» // Москва, 2003 г.
7. Приложение. СП 2.6.1.2612-10 // «Основные санитарные правила обеспечения радиационной безопасности (ОСПОРБ-99/2010)»: сайт. URL: <https://base.garant.ru/> (дата обращения: 13.02.2022 г.)
8. Ярмоненко С.П., Вайнсон А.А. Радиобиология человека и животных: учебное пособие для студентов медицинских и биологических специальностей вузов // Москва: Высшая школа, 2004. 549 с.

ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗИМЫХ СОРТОВ *SECALE CEREALE* L., ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Вшивкова А. И.¹, Тарбеев И. А.¹, Марон К. А.^{2,3}, Бельтюкова Н.Н.¹, Данилова М. А.¹,
Печенкина В. А.¹.

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский научно-исследовательский институт сельского хозяйства «Пермский федеральный исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (Пермский НИИСХ – филиал ПФИЦ УрО РАН), с. Лобаново, Пермский р-н, Пермский край, Россия

³ Уральский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук» (Уральский НИИСХ – филиал ФГБНУ УрФАНИЦ УрО РАН), Екатеринбург, Россия

Аннотация. Правильно подобранные сорта обеспечивают высокую урожайность озимой ржи. Рожь посевная – стратегически важная сельскохозяйственная культура, которая наиболее адаптивна к условиям Нечерноземной зоны России. Были рассмотрены результаты полевых испытаний 16 сортов озимой ржи, проведенных на полях Пермского НИИСХ в 2022 году. Представлены результаты по таким показателям, как урожайность, зимостойкость, масса 1000 зерен, устойчивость к полеганию, поражение болезнями.

Ключевые слова. Озимые сорта, *Secale cereale* L., урожайность.

CHARACTERISTICS OF WINTER VARIETIES *SECALE CEREALE* L., GROWN IN THE TERRITORY OF THE PERM KRAI

Vshivkova A. I.¹, Tarbeev I. A.¹, Maron K. A.^{2,3}, Beltyukova N. N.¹, Danilova M. A.¹,
Pechenkina V. A.¹

¹ Perm State University (PSU), Perm, Russia

² Perm Research Institute of Agriculture "Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" (Perm RIA – branch PFRC UB RAS), v. Lobanovo, Perm District, Permskiy Kray, Russia;

³ Ural Research Institute of Agriculture – a branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Ural Federal Agrarian Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences" (Ural RIA – branch FSBSI UrFASRC, UrB RAS), Yekaterinburg, Russia

Abstract. Properly selected varieties provide high yields of winter rye. Rye is a strategically important agricultural crop that is most adaptive to the conditions of the Non-Chernozem zone of

Russia. The field tests result of winter rye 16 varieties conducted in the fields of the Perm Agricultural Research Institute in 2022 were reviewed. The results are presented on such indicators as yield, winter hardiness, weight of 1000 grains, resistance to lodging, disease damage.

Keywords: Winter varieties, *Secale cereale* L., yield.

Правильно подобранный генофонд возделываемых сельскохозяйственных культур – важный критерий для эффективного использования природных условий регионов страны. В условиях Нечерноземья особое внимание заслуживают озимые сорта ржи посевной. Поскольку среди зерновых культур *Secale cereale* L. менее требовательна к плодородию почвы [11]. Рожь относят к стратегическим сельскохозяйственным культурам, поскольку она имеет высокие адаптационные способности, стабильна в получении урожая зерна, имеет высокую агротехническую значимость [13].

Сорт – это генетическая система, которая по-разному реагирует на внешние факторы окружающей среды. Правильный подобранный сорт позволяет получать стабильно высокий и качественный урожай, поскольку сорт обладает способностью реализовывать свой потенциал урожайности, не смотря на меняющиеся условия среды [8]. Пермский край относится к Нечерноземной зоне Российской Федерации, поэтому необходимо тщательно подбирать сорта для успешного выращивания и получения стабильного урожая на территории края.

Рассмотрим сорта, выращиваемые на опытных полях Пермского научно-исследовательского института сельского хозяйства (Пермский НИИСХ, Пермский край). Всего 16 сортов озимой ржи посевной выращиваются на данной территории: Перемена, Ника, Алиса, Фаленская 4, Дарвет, Астранос, Премьер, КВС РАВО, Чусовая, Паром, Батист, Графиня, Вятка 2, Янтарная, Викрас, Сибирь 4. Среди этих сортов большинство является среднепоздними по срокам созревания. Из 16 сортов 9 (Вятка 2, Алиса, Янтарная, Паром, Сибирь 4, КВС РАВО, Графиня, Фаленская 4) включены в реестр селекционных достижений, 4 сорта (Перемена, Дарвет, Батист, Астранос) находятся на испытаниях для включения в реестр, 1 сорт (Чусовая) снят с государственного сортоиспытания, как не давший существенной прибавки к стандарту.

Озимая рожь является значимой зернофуражной культурой в результате высокого содержания незаменимых аминокислот в белке, витаминов и органических кислот в зерне. В то же время, ее использование на корм затрудняет содержание антипитательных веществ, главным образом водорастворимых пентазанов, которые отрицательно сказываются на перевариваемости кормов животными. Для предотвращения этого проводится предварительная обработка зерна, а также добавление в корма ферментных добавок. В дополнение к этим методам, создаются низкопентазановые сорта озимой ржи. Из представленных 16 сортов таким является Янтарная [2, 3, 7].

Основные показатели 16 сортов озимой ржи представлены в таблице ниже. Урожайность – это основной критерий для включения сорта в государственный реестр селекционных достижений. Урожайность исследованных сортов за 2022 год варьировала от 2,5 т/га (Сибирь 4) до 5,3 т/га (Перемена). В среднем урожайность озимых сортов ржи посевной за 2022 год на территории Пермского НИИСХ составила 4,2 т/га. Что соответствует данным Уральского НИИСХ: современные и новые сорта озимой ржи в условиях Среднего Урала способны при благоприятных условиях перезимовки и весенне-летней вегетации формировать урожайность зерна до 5-6 т/га, а при неблагоприятных условиях зимой в весенне-летний период формировать не менее 3 т/га зерна [10].

Таблица – Основные показатели испытываемых сортов *Secale cereale* L.

Сорт, гибрид, вариант	Урожайность, т/га	Высота стебле-стоя, см.	Масса 1000 зерен, г	Устойчи-вость к полега-нию, балл	Зимосто-йкость, балл	Болезни и вредители, %	
						Ржав-чина	Споры-нья
Вятка 2	3,8	165	26,2	2	4	20	0,1
Викрас	3,6	135	26,3	4	4	25	0,03
Ника	4,7	140	38,7	5	4	20	0,35
Чусовая	4,3	130	33,1	5	4	20	0,1
Алиса	4,7	150	32,7	2	4	20	0,2
Янтарная	3,7	146	35,9	3	4	25	0,5
Паром	4,1	142	32,2	3	4	20	0,1
Премьер	4,5	140	34,3	4	4	25	0,4
Сибирь 4	2,5	160	40,6	5	4	30	0,9
Перемена	5,3	135	32,7	5	4	15	0,2
КВС РАВО	4,4	120	31,8	5	4	15	0,02
Дарвет	4,6	145	26,2	3	4	25	0,2
Графиня	4,1	140	27,0	5	4	15	0,1
Батист	4,1	135	29,2	5	4	20	0,5
Астранос	4,6	120	35,7	5	4	15	0,2
Фаленская 4	4,7	130	29,5	5	4	20	0,1

Зимостойкость важный показатель сорта, особенно в условиях Урала, где велика вероятность вымерзания посевного материала. Показатель зимостойкости озимой ржи оценивается по шкале от 1 (крайне низкая) до 9 (крайне высокая). Все 16 исследуемых сортов озимой ржи набрали 4 балла зимостойкости, что означает, что их зимостойкость ниже средней.

Широко распространенное неблагоприятное явление при возделывании многих сельскохозяйственных культур – полегание. Оно нарушает нормальные условия роста и развития растений, приводит к снижению семенных и товарных качеств, затрудняет уборку и приводит к значительным потерям зерна. В связи с этим показатель «устойчивость к полеганию» находится под постоянным вниманием селекционеров [12]. Устойчивость к полеганию измеряется в баллах от 1 (неустойчив) до 5 (устойчив). Среди исследуемых сортов наиболее устойчивы к полеганию следующие сорта: Ника, Чусовая, Сибирь 4, Перемена, КВС РАВО, Графиня, Батист, Астранос, Фаленская 4, так как они имеют 5 баллов по устойчивости к полеганию. Наименее устойчивы к полеганию сорта, набравшие 2 балла по данному показателю, это сорта – Вятка 2 и Алиса. Высота и прочность соломины, устойчивость к стеблевым и корневым гнилям, мощность корневой системы, урожай зерна – основные признаки, из которых складывается устойчивость к полеганию [6].

От высоты растений на 80% зависит устойчивость *S. cereale* к полеганию. Оптимальная высота растений находится в диапазоне от 90 до 120 см [5]. Среди исследуемых сортов озимой ржи этот показатель изменялся от 120 см (Астранос, КВС РАВО) до 165 см (Фаленская 4). Низкорослые сорта наиболее устойчивы к полеганию, поэтому в последнее время в селекции ржи озимой отдается предпочтение короткостебельным растениям [4, 6].

Важнейшей элемент структуры урожая – масса 1000 зерен. Крупность зерна определяет семенную и продовольственную значимость сорта [1]. Наибольшей массой 1000 зерен за 2022 год обладает сорт Сибирь 4 (40,6 г), а наименьшей сорта Вятка 2 и Дарвет (26,2 г). Средняя масса 1000 зерен за 2022 год составила 32 г. Что больше средней массы 1000 зерен собранных за 2014-2019 г. в Уральском НИИСХ на 1,3 г [10]. Снижение массы 1000 зерен происходит при недостаточном обеспечении влагой и высоких температурах воздуха в период налива зерна [1]. В условиях производства предпочтение отдается сортам с крупным или средnekрупным зерном.

Грибная патогенная флора значительно снижает урожай зерна озимой ржи [9]. Поэтому одной из основных задач селекции ржи озимой, является устойчивость к болезням. Исследуемые сорта проверяли на устойчивость к спорынье и ржавчине. По разным видам возбудителей наблюдалась различная статистика: степень поражения ржавчиной варьировалась от 15 до 30 %, а спорыньей – от 0.02 до 0.9 %. Наилучшим образом себя показал сорт КВС РАВО, который по обоим показателем показал наименьшие значения (15% – ржавчина, 0.02% спорынья), в то время как сорт Сибирь 4 показал наихудшие результаты (30% – ржавчина, 0,9% – спорынья).

Для дальнейшего анализа были выбраны сорта разные по своему назначению: 1) Вятка 2, как сорт близкий к эталону зимостойкости; 2) Ника и Янтарная, как сорта пригодные для фуражного использования; 3) Паром и Алиса, как сорта, хорошо переживающие зиму.

Библиографический список

1. Аниськов Н. И., Сафонова И. В. Сравнительная оценка показателей пластичности, стабильности и гомеостатичности сортов озимой ржи селекции ВИР по признаку «масса 1000 зерен» // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2020. – Т. 181. – №. 3. – С. 56-63.
2. Галимов К. А., Зезин Н. Н., Потапова Г. Н., Ткаченко И. В. Использование сортов озимой ржи (*Secale Cereale* L.) на фуражные цели на Среднем Урале // Кормопроизводство. 2016. № 7. С. 24-28.
3. Галимов, К. А., Потапова К. А. Результаты изучения фуражной озимой ржи в ФГБНУ «Уральский НИИСХ» // Научные достижения и инновационные подходы к решению проблем растениеводства и животноводства на Урале: Сборник научных трудов ФГБНУ «Уральский НИИСХ», посвященный 60-летию института / Издается по решению Ученого совета ФГБНУ «Уральский НИИСХ», протокол № 5 от 24 мая 2016 г. – Екатеринбург: ООО "Информационно-рекламное агентство Уральской Торговой Компании" (ООО "ИРА УТК"), 2016. – С. 106-112.
4. Гончаренко А. А. и др. Экологическая устойчивость сортов озимой ржи с различным типом короткостебельности // Российская сельскохозяйственная наука. – 2019. – №. 3. – С. 3-9.
5. Кобылянский В. Д., Корзун А. Е., Катерова А. Г. Культурная флора СССР. Рожь //ВД Кобылянский. – 1989.
6. Кобылянский В. Д., Солодухина О. В. Использование доноров ценных признаков растений в селекции новых сортов озимой ржи // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – №. 7. – С. 7-12.
7. Марон К.А., Безгоднов А.В. Перспективы использования фуражных сортов озимой ржи в кормлении // Журнал сельского хозяйства и окружающей среды. – 2022. – №. 1 (21).

8. Неттевич Э.Д. Рождение и жизнь сорта. 2-е изд. М.: Московский рабочий, 1983. 242 с.
9. Пономарева М. Л. и др. Фитосанитарный мониторинг наиболее вредоносных болезней озимой ржи в республике Татарстан // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2019. – №. 9 (150). – С. 27-34.
10. Потапова Г. Н., Галимов К. А., Зобнина Н. Л. Продуктивность и адаптивность сортов озимой ржи на Среднем Урале // Достижения науки и техники АПК. – 2020. – Т. 34. – №. 10. – С. 28-33.
11. Сысуев В. А., Кедрова Л. И., Уткина Е. И. Значение озимой ржи для сохранения природного агроэкологического баланса и здоровья человека (обзор) // Теоретическая и прикладная экология. – 2020. – №. 1. – С. 14-20.
12. Тороп Е. А., Чайкин В. В., Тороп А. А. Способ оценки селекционного материала озимой ржи на устойчивость к полеганию // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2011. – №. 3. – С. 14-16.
13. Шляхтина Е. А., Рылова О. Н. Результаты изучения перспективных сортов озимой ржи в условиях Кировской области // Таврический вестник аграрной науки. – 2021. – №. 1. – С. 213-223.

СЕКРЕТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ РОДА *TREVESIA VIS.*

Ембатурова Е. Ю.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

Аннотация. Изучено строение секреторных вместилищ в плодах и цветках восточноазиатского рода *Trevesia Vis.* (Araliaceae). Представители данного рода известны содержанием сапонинов и являются источником лекарственного растительного сырья. Выявлено, что в цветках и плодах в большом количестве присутствуют мелкие вместилища выделений палочковидной формы, снабженные обкладкой и сходные по строению с параэндокарпными канальцами некоторых зонтичных.

Ключевые слова: *Trevesia*. Секреторные вместилища. Цветок. Перикарпий. Параэндокарпные канальцы.

SECRETORY STRUCTURES OF REPRODUCTIVE ORGANS IN THE GENUS *TREVESIA VIS.*

Yembaturova E. Yu.

*Department of Botany, Breeding and Seed Production of Horticultural Crops. Russian State
Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia*

Abstract. Structure of secretory reservoirs in fruits and flowers of the genus *Trevesia Vis.* (Araliaceae) from eastern Asia has been studied. Representatives of this genus are known to contain saponins and serve as medicinal raw material. Flowers and fruits of *Trevesia* are found to possess numerous small rod-shaped secretory reservoirs, lined with secretory cells. They are similar in structure to paraendocarpic ducts found in some Apiaceae.

Keywords: *Trevesia*, Secretory reservoirs. Flower. Pericarp. Paraendocarpic ducts.

Представители рода *Trevesia Vis.* – небольшие деревья из семейства аралиевых (Araliaceae), произрастающие в Юго-Восточной Азии. Все виды – деревья подлеска вечнозеленых лесов на высоте между уровнем моря и 1500 м над ним. Стволы тревезий несут острые конические колючки, и они либо многочисленные в более или менее отчетливых полукруглых кольцах вокруг оснований черешков крупных листьев, или редкие и беспорядочно разбросанные.

Примечательным строением отличаются листья *Trevesia* – так называемой «псевдопальчатосложной» формы. Листья всех видов пальчатолопастные, но у некоторых доли узкие, образующие ложный черешочек, и пластинка расширяется снова к основанию. У одного вида (*T. palmata Vis.*) рассечение листа варьирует и на отдельном растении, и у разных экземпляров [1].

Для Araliaceae типичны 5-тичленные полисимметричные цветки с нижней или полунижней завязью $K_{(5)}C_5A_5G_{-(5)}$. У *Trevesia* число тычинок и плодолистиков варьирует от 6-7 до 12-13, цветки калиптровидные (как у *Tupidanthus* Hook.f. & Thomson и *Schefflera* J.R. Forst. & G. Forst.). Плоды – олигомерные пиренарии с сочным перикарпием и одревесневающим эндокарпием.

Ближайшими родственниками тревезий являются *Osmoxylon* Miq., *Brassaiopsis* Decne. & Planch. и ключевые роды аралиевых – *Fatsia* Decne. & Planch. и *Schefflera*. Для аралиевых и других представителей Ariales характерна развитая секреторная система, в т.ч., в околоплоднике [2,3], и род *Trevesia* не является исключением.

Известно, что виды *Trevesia* являются источниками сапонинов [4, 5] и объектами большого числа фармакологических исследований, причем преимущественно это *Trevesia palmata* – растение с самыми причудливыми листьями, которые и вызывают в настоящее время интерес биохимиков и фармацевтов [6,7]. Поэтому изучение секреторных вместилищ представителей данного рода представляется актуальной темой.

Целью данной работы является исследование морфологии и анатомии цветка и плода *Trevesia*, нацеленное на поиск и выявление структурных особенностей секреторных вместилищ в этих органах, а также, при наличии, исследование содержимого секреторных структур. Для этого были собраны и изучены цветки и плоды представителей данного рода, а также проанализирована имеющаяся литература по вопросу исследований.

Материалы и методы

Материал для исследования (цветки и плоды *Trevesia burckii* Boerl.) собран А.И. Константиновой на о. Суматра и любезно предоставлен ею, а также гербарием университета Мельбурна (Австралия) – MEL – для исследований. Живой материал фиксирован 70%-ным этиловым спиртом. Гербарный материал регидрирован и размягчен нагреванием в смеси Страссбургера (смесь 70%-ного этанола, глицерина и воды в соотношении 1:1:1).

Обработка материала (заключение в среду Technovit, изготовление продольных и поперечных срезов цветков (с частью цветоножки) и плодов, окраска толуидиновым синим, микроскопирование при помощи светового микроскопа Primo Star by Carl Zeiss, фотографирование подходящих срезов) проводилась на базе университета Гейдельберга (Германия).

Результаты исследования

В ходе анатомического исследования были выявлены достаточно мелкие, но многочисленные вместилища палочковидной формы, очевидно, схизогенного происхождения, в цветках тревезии. Они отчетливо видны в виде некрупных полостей, снабженных обкладкой, как на продольных, так и на поперечных срезах цветков с частью цветоножек. Размер просвета (диаметр полости) таких вместилищ примерно равен таковому одной клетки паренхимы цветоложа или обкладки вместилища, или чуть крупнее. На момент фиксации вместилища были лишены какого-либо содержимого.

В плоде – сочными полимерном пиренарии – вместилища сохраняются в большом количестве, практически без изменения относительных размеров (остаются такими же мелкими). На данном этапе исследования и при данном методе фиксации материала (70%-ным этиловым спиртом), содержимого вместилищ обнаружить не удалось. Очевидно, для этого требуется работа со свежим материалом и подготовка для микроскопирования при помощи трансмиссионного электронного микроскопа.

Обсуждение результатов

Мелкие палочковидные вместилища выделений у *Trevesia* имеют заметное сходство с параэндокарпными каналцами, например, у ряда видов рода *Alepidea* Delaroche – африканского рода семейства Apiaceae подсемейства Saniculoideae [3]. В цитируемой работе подробно разобрана история открытия параэндокарпных каналцев и заключения об их функциях. Так, параэндокарпные каналцы:

- Находятся глубоко в толще паренхимы мезокарпия, образуя кольцо вокруг эндокарпия
- Появляются на ранних стадиях развития плода, иногда цветка
- Могут сохраняться в зрелом плоде или исчезать при созревании
- Отмечены у *Alepidea*, *Prangos* Lingl., *Conium* L., *Archangelica* Wolf, *Sanicula* L., *Eryngium* L., *Ligusticum* L. Как можно видеть, большинство здесь перечисленных растений – типичные представители сельдерейных или подлесниковых.
- Изучены Александровым и Климовичиной (1947), Тихомировым, Первухиной (1950), Hilliard & Burt (1985), Тихомировым, Константиновой (2000) [3].

Однако, в отличие от параэндокарпных каналцев, секреторные полости *Trevesia* располагаются дальше от гнезд плода, чем у зонтичных, а также не являются каналцами в прямом смысле этого слова, представляя из себя вместилища палочковидной формы.

Библиографический список

1. Jebb M.H.P. A revision of the genus *Trevesia* (Araliaceae) // Glasra. – 1998. – V. 3. – P. 85-114.
2. Konstantinova A.I., Yembaturova E. Y. Taksonomicheskie vzaimootnosheniya Araliaceae i Umbelliferae – rol karpologicheskikh issledovaniy // Doklady TSKHA. – 2002. – P. 67-73.
3. Yembaturova E.Y., Van Wyk B.-E., Tilney P., Winter P.J.D. The taxonomic significance of fruit morphology and anatomy in the genus *Alepidea* Delaroche (Apiaceae, subfamily Saniculoideae) // Plant Diversity and Evolution. – 2010. – V. 28. – № 3-4. – P. 369-385.
4. De Tommasi N., Pizza C., Bellino A., Venturella P. Triterpenoid Saponins from *Trevesia sundaica* // Journ. Nat. Prod. – 1997. – V. 60. – № 11. – P. 1070-1074.
5. Thao L.T.T., Do Q., Duong V.B., Tai B.H., Kiem P.V. New Acetylated Saponins from the Leaves of *Trevesia palmata* // Nat. Prod. Communic. – 2018. – V. 13. – № 4. – P. 407-410.
6. Devi S.V., Tanget L., Sailo N., Shantabi L. Investigation of pharmacognostic, physicochemical and phytochemical studies of *Trevesia palmata* // JETIR. – 2019. – V. 6. – Iss. 6. – P. 38-43.
7. Manoharan A.L., Jagadeesan G., Nataraj G., Muniyandi K., Guruswami G., Arunachalam K., Thangaraj P. Efficacy of *Trevesia palmata* (Roxb. ex Lindl.) Vis. Extract on MG 63 cell lines and arthritis-induced animal models // Journal of Ethnopharmacology. – 2022. – V. 300 – № 14. – P. 115742.

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКУЛЬТИВЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ СЕРОЙ ПОЧВЫ

Еремченко О.З., Сапцын Р.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. В работе проведена оценка эффективности технической рекультивации нефтезагрязненной серой лесной почвы и определение способности создавать условия для роста и развития культурных растений. Выявлено, что серая почва после проведения рекультивационных работ характеризуется повышенным уровнем почвенного плодородия и более благоприятными условиями для роста и развития растений, по сравнению с некультуренной серой почвой.

Ключевые слова: почва, нефтезагрязнение, оценка рекультивации, агрохимические свойства, фитотоксичность.

ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF OIL-CONTAMINATED GREYIC SOIL REMEDICATION

Eremchenko O.Z., Sapsyn R.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The work assessed the effectiveness of technical remediation of oil-contaminated greyic phaeozems soil and determined the ability to create conditions for growth and development of cultivated plants. It was revealed that the greyic soil after reclamation works is characterized by an increased level of soil fertility and more favorable conditions for the growth and development of plants, compared to uncultured greyic soil.

Keywords: soil, oil pollution, reclamation assessment, agrochemical properties, phytotoxicity.

Антропогенное загрязнение почвенного покрова одна из острых глобальных проблем нашего времени, практически все территории земли подвержены прямому или косвенному влиянию человека, включая добычу и транспортировку нефти и нефтепродуктов. В результате добычи природных энергоносителей почва изменяется, загрязняется или полностью уничтожается, транспортировка полезных ископаемых также не исключает вероятности аварийного разлива в результате аварий, неисправностей на нефтепроводах и несанкционированных врезок [1].

Нефтезагрязнение сопровождается изменением всех компонентов природной среды, создается угроза устойчивой, необратимой трансформации экосистемы, первоочередное воздействие принимает на себя почва [2]. В нефтезагрязненной почве изменяются физические, химические, биологические свойства; почвы на долгое время выбывают из

народно-хозяйственного использования [3, 4]. Самовосстановление почв может длиться десятки лет, поэтому было разработано множество методов рекультивации.

Современные методы рекультивации направлены не только на устранение нефтезагрязнения, но и на восстановление плодородного слоя почвы [5]. Формирование благоприятных агрохимических свойств у рекультивированных почв особенно важно на землях сельскохозяйственного назначения, т.к. культурные растения имеют повышенные требования к реакции почвенной среды, содержанию гумуса и питательных веществ.

С конца XX в. исследователи связывают качество почвы с ее способностью выполнять экологические функции, в первую очередь, создавать условия для роста и развития живых организмов [6]. В настоящее время звучат опасения, что антропогенно измененные почвы не смогут выполнять функции воспроизводства и поддержания жизни на Земле [7, 8, 9].

В южно-таежной подзоне Пермского края, вследствие разгерметизации нефтепровода, произошли разливы нефти и последующее загрязнение серой почвы – на площади около 250 м². Загрязненный участок относится к категории земель «Земли сельскохозяйственного назначения». Сразу после аварии нефть с верхними слоями загрязненной почвы была вывезена для последующей санации. На нарушенном участке был выровнен рельеф путем отсыпки на поверхность незагрязненного почвогрунта, привезенного с территорий складирования отходов животноводства и проведения дорожно-строительных работ. Цель нашей работы – оценка эффективности рекультивации нефтезагрязненных почв и способности рекультивированного слоя создавать условия для роста и развития культурных растений.

Из рекультивированного почвенного слоя отобраны 5 проб (глубина 0–20 см) равномерно по всей площади участка; каждую отдельную пробу готовили путем смешивания из 3–5 индивидуальных проб. На фоновой почве смешанные пробы взяли с трех стенок разреза с глубины 0–20 см.

Содержание остаточной нефти и нефтепродуктов определили по ПНД Ф 16.1:2.2.22-98, величину рН водной суспензии – по ГОСТ 26483-85, содержание органического углерода – по Тюрину, содержание подвижных фосфатов и подвижного калия по ГОСТ Р 54650–2011 [10].

Экологическое состояние и степень токсичности почвогрунта исследовали методом фитотестирования кресс-салатом *Lepidium sativum* L. на основе авторской методики [11]. Ответную реакцию тест-культуры на рекультивированных почвах сравнивали с состоянием растений на фоновых почвах. Высоту и массу кресс-салата, выращенного на почвенных пробах, измерили в 25–кратной повторности; значимость различий с тест-контролем оценили с помощью критерия Стьюдента с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0.05$).

Редокс-активность растительных экстрактов из листьев кресс-салата определили методом Петта – Прокашева [12]. Биологическая повторность определения редокс-активности – 4-кратная. Сравнение редокс-активности растений, выращенных на пробах почвы, с редокс-активностью растений на фоновой почве провели на основе однофакторного дисперсионного метода с применением критерия Краскела-Уоллиса; значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0.05$).

Фоновую почву исследовали на расположенном рядом облесенном участке, в пределах того же рельефа, где произошло нефтезагрязнение почв. В соответствии с современной классификацией почв России, фоновая почва диагностирована как серая почва.

Известно, что нефть оказывает на растения прямое токсическое (или стимулирующее) действие, и опосредованное действие – через изменение физико-химических свойств почвы и трансформацию почвенного микробного сообщества. В рекультивированной серой лесной почве количество остаточной нефти колебалось в пределах от 50 до 187 мг/кг и превышало

фоновый уровень в 2.3–4 раза. Остаточное количество нефтепродуктов в рекультивированной почве оценили относительно нормативов допустимого остаточного содержания нефтепродуктов (ДОСНП), принятых в Пермском крае [13]. Норматив ДОСНП для типа серых лесных почв категории «Земли сельскохозяйственного назначения» составляет 2400–2600 мг/кг почвы. Остаточное содержание нефтепродуктов в рекультивированной серой почве в 13–63 раза ниже ДОСНП.

Таким образом, на серой лесной почве проведение технических работ по устранению нефтезагрязнения способствовало существенному снижению количества остаточной нефти относительно ДОСНП, однако по сравнению с фоновым содержанием, в рекультивированной почве сохраняется некоторый уровень нефтезагрязнения.

Для оценки агрохимического состояния рекультивированного почвенного слоя в методике Министерства сельского хозяйства РФ предложена формула расчета показателя плодородия кислых почв [14]:

$$K_{\text{ПП}} = \left(\frac{\text{гумус ф.}}{\text{гумус опт.}} + \frac{P_2O_5 \text{ ф.}}{P_2O_5 \text{ опт.}} + \frac{K_2O \text{ ф.}}{K_2O \text{ опт.}} + \frac{pH_{(KCl)} \text{ ф.}}{pH_{(KCl)} \text{ опт.}} \right) / 4 ,$$

где $K_{\text{ПП}}$ – показатель почвенного плодородия для каждого типа почв; гумус, P_2O_5 , K_2O , pH – агрохимические показатели; ф. – фактические значения агрохимических показателей; опт. – оптимальные значения агрохимических показателей.

Оптимальные уровни содержания подвижных фосфатов и калия в почве были выбраны по результатам полевых опытов агрохимической службы Центрального района Нечерноземной зоны [15]. Диапазон колебаний агрохимических свойств серых почв охватывал практически все возможные вариации, встречающиеся в почвах Центрального района Нечерноземной зоны. За оптимальный уровень содержания питательных веществ исследователи приняли такое содержание фосфора и калия в почве, при котором прекращался рост урожайности культур по мере увеличения обеспеченности этими элементами питания. Оптимальное содержание питательных веществ в серой почве в Центральном районе Нечерноземной зоны составляло для озимой пшеницы: P_2O_5 , – 130 мг/кг, K_2O – 180 мг/кг.

Оптимальные значения pH и количества гумуса для расчета коэффициентов плодородия также были выбраны из базы данных по состоянию почв в Центральном районе Нечерноземной зоны. Согласно этим данным, наиболее благоприятная реакция почвенной среды в серых почвах была равна 6.8 pH, а наибольшее содержание гумуса в серых почвах составляло 4.6% [15].

Фоновая серая почва имеет кислую реакцию среды, величина pH=4.87 (табл. 1). Все смешанные пробы из рекультивированной серой почвы характеризуются более благоприятной, нейтральной реакцией среды. Содержание гумуса в рекультивированной почве выше, чем в фоновой почве. Во всех пробах из рекультивированной почвы обеспеченность фосфатами и калием выше, чем в фоновой почве. Расчеты $K_{\text{ПП}}$ показали, что коэффициент почвенного плодородия у рекультивированной почвы в 1.7–2.2 раза выше, по сравнению с коэффициентом плодородия фоновой серой почвы. Таким образом, после проведения рекультивационных работ на нефтезагрязненной серой почве был восстановлен верхний корнеобитаемый слой с повышенными показателями плодородия.

Таблица 1 – Свойства фоновой серой почвы и рекультивированной почвы, слой 0–20 см

Почва	№ пробы	pH	Гумус, %	P ₂ O ₅ , мг/кг	K ₂ O, мг/кг	Кпп
Рекультивированная серая почва	1	6.99	4.57	37	121	0,74
	2	6.86	4.89	59	76	0,84
	3	7.10	4.11	45	113	0,73
	4	6.71	7.75	48	146	0,96
	5	7.04	5.77	47	121	0,83
Фоновая серая почва		4.87	3.61	14	29	0.44

Примечание. Кпп – коэффициент почвенного плодородия.

В условиях нефтезагрязнения растения являются чуткими индикаторами уровня токсичности почвы [16, 17]. Кресс-салат используют при анализе почвенных загрязнений, как отдельными поллютантами, так и при их комплексном воздействии [18, 19]. Известно, что неблагоприятные факторы корневой среды вызывают в растениях развитие окислительного стресса [20]. Ранее в наших экспериментах установлено повышение редокс-активности кресс-салата в ответ на подкисление, засоление, подщелачивание и загрязнение тяжелыми металлами корневой среды [11]. Фитотестирование серой почвы показало, что рекультивированный слой создает лучшие условия для роста и развития кресс-салата; высота и масса растений были выше, чем у растений на фоновой серой почве (рисунок).

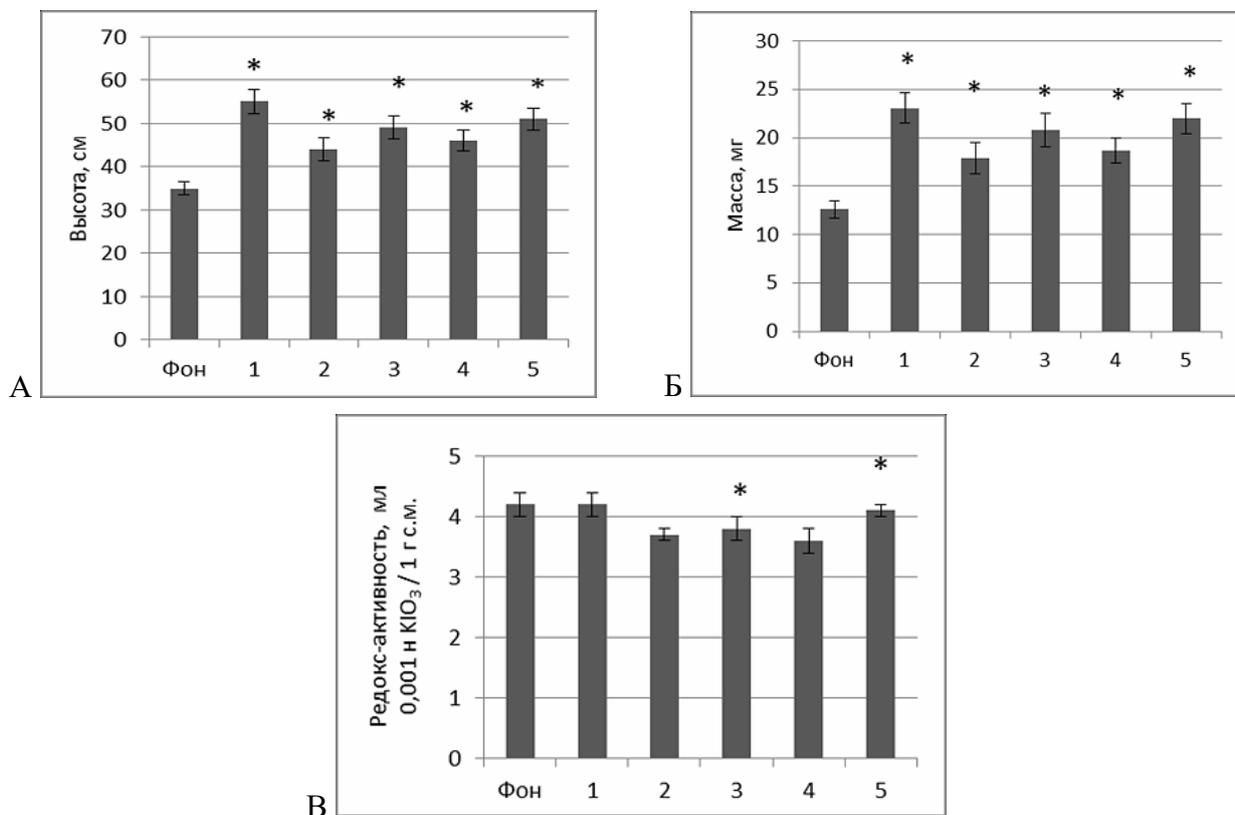


Рисунок – Высота (А), масса (Б) и редокс-активность (В) кресс-салата на фоновой и рекультивированной серой почве; * – значимые различия с фоновыми показателями.

Редокс-активность не отличалась от фонового уровня или была немного ниже. По-видимому, остаточное количество нефти в серой почве не оказывает токсического воздействия на тест-культуру.

Для общей оценки эффективности рекультивации нефтезагрязненной почвы был использован метод математической оптимизации. Из выборки показателей оптимальных свойств почв ($x_1, x_2, x_3, x_4 \dots x_n$) выбран экстремум – минимальное (x_{\min}) или максимальное (x_{\max}) значение. Для содержания остаточных нефтепродуктов в качестве лучших были выбраны минимальные значения; а для pH, содержания органического углерода, подвижных фосфатов и калия – максимальные значения. В качестве экстремума для редокс-активности растительных экстрактов был взят минимальный показатель, полученный в опыте. Экстремумом высоты и массы тест-культуры были максимальные показатели растений. Относительно экстремума рассчитали нормированные значения показателей: $x_k = x_{\min} / x_n$, или $x_k = x_n / x_{\max}$. Сложили нормированные значения показателей и получили критерий оптимизации свойств для почвы и почвенной пробы (табл. 2). При данном формализованном подходе был учтен комплекс свойств, тесно связанных с почвенным плодородием (pH, гумус, питательные элементы), а также отражающих способность загрязненных почв создавать условия для роста и развития растений (остаточные нефтепродукты, высота, масса и редокс-активность тест-культуры). У рекультивированного слоя серой почвы критерии оптимизации свойств были выше, чем у фоновой неокультуренной серой почвы.

Таблица 2 – Нормированные значения показателей состояния рекультивированной серой лесной почвы, слой 0–20 см

Почва	№	pH	Гумус	P ₂ O ₅	K ₂ O	НП	Высота	Масса	Редокс-активность	K _{опт}
Рекультивированная серая	1	1.0	0.6	0.6	0.8	1.0	1.0	1.0	0.9	6,9
	2	1.0	0.6	1.0	0.5	0.2	0.8	0.8	1.0	5,9
	3	1	0.5	0.8	0.8	0.2	0.9	0.9	0.9	6,0
	4	0.9	1.0	0.8	1.0	0.3	0.8	0.8	1.0	6,6
	5	1.0	0.7	0.8	0.8	0.4	0.9	0.9	0.9	6,4
Фоновая серая		0.7	0.5	0.2	0.2	0.8	0.6	0.5	0.9	4,4

Примечание. K_{опт} – критерий оптимизации свойств

Заключение

По результатам проведенных исследований считаем перспективным использование коэффициентов почвенного плодородия и критериев оптимизации свойств при оценке процесса восстановления экологических функций почв, рекультивированных после нефтезагрязнения. Рекультивированный слой серой почвы характеризовался повышенными коэффициентами плодородия и критериями оптимизации свойств.

Библиографический список

1. Гриценко А.И. Экология. Нефть и газ: монография. – М.: Академкнига, 2007. – 677 с.
2. Бурмистрова Т.И. и др. Биодegradация нефти и нефтепродуктов в почве с использованием мелиорантов на основе активированного торфа // Химия растительного сырья. – 2003. – №3. – С. 6972.
3. Лысак Л.В. Бактериальные сообщества городских почв: Автореф. дис. докт. биол. наук. – М. – 2010. – С. 47.
4. Назарько М.Д. Теоретическое и экспериментальное обоснование использования микробиологических показателей почв для оценки состояния экосистем Краснодарского края: автореф. дис. докт. биол. наук. – Ставрополь. – 2008. – 33 с.
5. Черняховский Э.Р. и др. Применение различных технологий при ликвидации последствий аварийных разливов нефти, нефтепродуктов и продуктов переработки нефтесодержащих отходов // Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций. – 2004. – № 6. – С. 27–29.
6. Sujetovienė G., Griauslytė L. Toxicity Assessment of Roadside Soil Using Wild Oat (*Avenasativa* L.) and Cress (*Lepidium sativum* L.) Morphometric and Biochemical Parameters // Environmental Research, Engineering & Management. 2008. – V. 46. – № 4. – P. 29-35.
7. Керженцев А.С. Механизм функционирования почвы и устойчивость экосистем // Вестник Российской академии наук. – 2010. – Т. 80. – № 8. – С. 704–709.
8. Ковалев И.В., Ковалева Н.О. Экологические функции почв и вызовы современности. // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2020. – Т. 16, № 2. – С. 4–16.
9. Haygarth P.M., Ritz K. The future of soils and land use in the UK: soil systems for the provision of landbased ecosystem services // Land use policy. – 2009. V. 26. – P. 187-197.
10. ГОСТ Р 57447-2017. Рекультивация земель и земельных участков, загрязненных нефтью и нефтепродуктами. – М.: Стандартинформ, 2019. – 25 с.
11. Еремченко О.З., Митракова Н.В. Способ оценки биологической активности и токсичности почв и техногенных почвогрунтов: патент РФ № 2620555. – 2017.
12. Практикум по физиологии растений: учеб. пособие / Сост. М.Ю. Касаткин, В.В. Коробко, С.А. Степанов. – Саратов. – 2016. – С. 45–47.
13. Об утверждении региональных нормативов допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации в почвах Пермского края и порядка их применения: Постановление Правительства Пермского края No 813-п от 20 дек. 2018 г. (с изменениями на 23 дек. 2020 г.).
14. Методика расчета показателя почвенного плодородия в субъекте Российской Федерации, утвержденная приказом Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 6 июля 2017 г. No 325.
15. Шафран С.А., Прошкин В.А. Влияние агрохимических свойств почв Центрального района на урожайность зерновых культур // Агрохимия. – 2008. – №о 7. – С. 5-12.
16. Назаров А.В., Иларионов С.А. Изучение причин фитотоксичности нефтезагрязненных почв // Письма в Международный научный журнал «Альтернативная энергетика и экология». – 2005. – № 1. – С. 60– 65.
17. Чугунова М.В. и др. Особенности биодegradации нефти в почвах Северо-Запада России // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2011. – № 5 (1). – С. 110–117.

18. Czerniawska-Kusza I. et al. Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments // *Environmental Toxicology: An International Journal*. – 2006. – V. 21. – № 4. – P. 367–372.
19. Lisovitskaya O.V., Terekhova V.A. Phytotesting: basic approaches, problems of the laboratory method and modern solutions // *Doklady po ěkologiĉeskomu poĉvovedeniju*. – 2010. – № 1. – P. 13.
20. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. – Киев: Логос. – 2019. – 277 с.

**ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРЕДЫ ОЛИСТВЕННОЙ
(*BIDENS FRONDOSA* L.) ФЛОРЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ
И РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ**

Зинченко В.Д., Серебряная Ф.К.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт–филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ,
Пятигорск, Россия*

Аннотация. Изучение растений семейства *Asteraceae* является перспективным направлением в реализации поиска источников биологически активных веществ. Впервые изучен фитохимический состав инвазивного вида *Bidens frondosa* L., произрастающего на территории Краснодарского края. Проведен фитохимический скрининг основных групп биологически активных веществ, выявлено присутствие флавоноидов, дубильных веществ и полисахаридов.

Ключевые слова: *Bidens frondosa* L., качественные реакции, флавоноиды, полисахариды, дубильные вещества.

**PHYTOCHEMICAL RESEARCH OF *BIDENS FRONDOSA* L. FLORA OF KRASNODAR
REGION AND REPUBLIC OF ADYGEA**

Zinchenko V.D., Serebryanaya F.K.

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, branch of the Volgograd State Medical
University, Pyatigorsk, Russia*

Abstract. The research of plants of the family *Asteraceae* is perspective direction of realization of search of the sources of biologically active substances. Phytochemical composition of invasive species *Bidens frondosa* L. was first studied, this species is grow on the territory of the Krasnodar region. Phytochemical screening of primary groups of biologically active substances was done. Flavonoids, polysaccharides and tannins were discovered.

Keywords: *Bidens frondosa* L., qualitative reactions, flavonoids, polysaccharides, tannins.

Черда олиственная (*Bidens frondosa* L.) относится к семейству *Asteraceae*, относится к инвазивным видам, занесенным на территории Российской Федерации [1-3]. Особую опасность представляют растения, которые внедряются в растительные сообщества аборигенных видов, вытесняя их из сформировавшихся фитоценозов и консорциев. *Bidens frondosa* L. происходит из Северной Америки, где произрастает по берегам водоёмов в сообществах гигрофитов. Естественный ареал занимает юго-восток Аляски, юг Канады. Данный вид произрастает преимущественно в нарушенных местообитаниях, внедряясь в естественные сообщества, становясь при этом доминантом, легко распространяется и быстро расселяется, особенно вдоль рек [4]. Последние способы распространения возможны в связи с тем, что семена снабжены зубцами, легко цепляющимися за шерсть животных и одежду людей, распространяется также железнодорожным транспортом. Однолетнее травянистое растение до 150 см высотой, побеги прямостоячие, ветвящиеся, почти голые. Листья простые, с рассеченной листовой пластинкой. Соцветия – корзинки, редко одиночные чаще собраны в агрегатные ботриоидные соцветия, в виде непоникающих щитковидных метёлок. Морфологические отличия от фармакопейного вида – череды трехраздельной представлены в

предыдущих исследованиях [5,6]. Как противоаллергическое и противовоспалительное средство *Bidens frondosa* L. имеет широкое применение в народной медицине на территории стран СНГ и в других странах [9-11].

Из литературных источников известно, что в народной медицине траву череды применяют при крапивнице (выраженная антианафилактическая активность), потницах, атопических дерматитах в детской практике, чесотке, себорее, экземе, диатезе, подагре и золотухе [12-19]. Данный вид череды является перспективным альтернативным источником лекарственного растительного сырья в дополнение к фармакопейному виду *Bidens tripartita* L.

Материалы и методы. Растительный материал представлен собранной на территории республики Адыгея и высушенной воздушно-теневым способом травой череды олиственной (сентябрь 2022 г.).

Качественные реакции на группу биологически активных соединений – флавоноиды:

- 1) Цианидиновая проба или проба Шинода (*Chinoda*). Флавонолы, флаваноны и флавоны при восстановлении магнием в присутствии соляной кислоты (конц.) дают красное или оранжевое окрашивание, обусловленное образованием антоцианидинов.
- 2) Реакция с алюминия хлоридом. Флавоноиды с 1-2% спиртовым раствором алюминия хлорида образуют окрашенные соединения (желтая, зеленая окраска), имеющие желто-зеленую флуоресценцию при длине волны 366 нм (батохромный сдвиг). Следует отметить, что в образовании батохромного комплекса прежде всего принимают участие свободные 3- и 5-ОН-группы флавоноидов. Данная реакция довольно специфична и часто используется в методиках количественного определения.
- 3) С раствором аммиака флавоны, флаваноны, флавонолы и флаванолы дают желтое окрашивание, переходящее при нагревании в оранжевое или красное. В случае халконов и ауронов тотчас же образуется красное или пурпурное окрашивание. Чистые катехины окраски не дают, однако присутствие даже в небольшом количестве примесей вызывает появление желтой окраски.
- 4) Реакция с треххлорным железом. Флавоноиды с 1% спиртовым раствором $FeCl_3$ дают коричневую (3-ОН-группа) или зеленую (5-ОН-группа) или синюю (3 4 5 ОН-группы) окраски.

Качественные реакции на группу биологически активных соединений – полисахариды:

- 1) Реакция со спиртом этиловым. К 10 мл извлечения прибавляют 10-30 мл 95% этанола и перемешивают. Появляются хлопьевидные сгустки, выпадающие в осадок при стоянии.
- 2) Реакция с раствором ацетата свинца. К 2 мл извлечения прибавляют 2 мл раствора ацетата свинца. Выпадает объемный осадок слизи.
- 3) Реакция с раствором Люголя. К извлечению в пробирку вносят 1-2 капли раствора Люголя, перемешивают, появляется красно-бурое окрашивание раствора.

Качественные реакции на группу биологически активных соединений – дубильные вещества:

- 1) Реакция с раствором свинца основного уксуснокислого. К 2-3 мл извлечения добавили раствор свинца основного уксуснокислого. При добавлении свинца основного уксуснокислого образовался осадок, что свидетельствует о наличии танидов.

- 2) Реакция с солями железа (III). К 1-3 мл извлечения добавили 3 капли 1% раствора железоаммонийных квасцов. При добавлении железоаммонийных квасцов раствор окрасился в черно-синий цвет, что свидетельствует о наличии гидролизующих дубильных веществ.

Результаты и обсуждение. Был проведен фитохимический анализ травы Череды олиственной. Проведены реакции на ряд групп биологически активных веществ, таких как флавоноиды, полисахариды и дубильные вещества. Полученные результаты приведены в таблице

Таблица – Результаты фитохимического скрининга основных биологически активных веществ в надземных органах *Bidens frondosa* L.

Реактивы	Аналитический эффект	Результат проведения реакции
ФЛАВОНОИДЫ		
1. этанол 96%+Mg+HCl конц.	красное или оранжевое окрашивание	-
2. AlCl ₃	желтое или зеленое окрашивание	+
3. NH ₄ OH	оранжево-красное окрашивание	+
4. FeCl ₃	темно-зеленая окраска	+
ПОЛИСАХАРИДЫ		
5. р. Люголя, 10% NaOH	синее окрашивание, затем обесцвечивание	+
6. спирт этиловый 96%	хлопьевидные сгустки	-
7. ацетат свинца	объемный осадок слизи	+
ДУБИЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА		
8. р-р Pb осн. уксуснокислого	выпадение осадка	+
9. 1% р-р NH ₄ Fe(SO ₄) ₂	черно-синее окрашивание	+

Выводы. Благодаря результатам проведенных химических реакций, можно говорить о присутствии в извлечении травы *Bidens frondosa* L. флавоноидов, полисахаридов и дубильных веществ. Полученные данные являются фрагментом комплексного фитохимического исследования данного вида.

Библиографический список

1. Абрамова Л.М., Голованов Я.М. Классификация сообществ с инвазивными видами на Южном Урале. III. Сообщества с *Bidens frondosa*, *Hordeum jubatum* и *Urtica cannabina*//Vegetation of Russia. St. Petersburg. – 2016.
2. Васильева Н.В. Некоторые особенности онтогенеза череды олиственной (*Bidens frondosa* L.), способствующие расселению// Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 13. – № 5. – С. 75–78.
3. Галкина М.А. Биоморфологические особенности инвазионных видов рода *Bidens* L. в Европейской части России: Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. Москва. – 2014.

4. Гладунова Н.В., Хапугин А.А., Варгот Е.В. *Bidens frondosa* L.(Asteraceae) в Республике Мордовия(Россия)//Russian Journal of Biological Invasions – February 2016. – P. 15-20.
5. Зинченко В.Д., Серебряная Ф.К. Морфолого-анатомическое исследование череды олиственной (*Bidens frondosa* L.) флоры Краснодарского края//В сборнике: Синтез наук как основа развития медицинских знаний. Сборник материалов I Межвузовской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией Н.П. Аввакумовой. – 2020. – С. 395-402.
6. Исайкин Н.В., Андреева В.Ю. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование видов рода *Bidens* L.//Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – №5. – С. 56-61.
7. Ковальчук И.А., Тохтарь В.К., Шевера М.В. Особенности распространения видов рода *Bidens* L. (Asteraceae) в сопредельных областях России и Украины// Фундаментальные исследования. – 2013. – № 11 (часть 5). – С. 939-942.
8. Корожан Н. В., Г. Н. Бузук Антианафилактическая активность настоев травы видов череды и противоаллергического сбора//Вестник фармации. – 2015. – №2. – С. 68.
9. Корожан Н. В., Г. Н. Бузук. Сравнительный анализ компонентного состава эфирного масла травы видов череды//Вестник фармации. – 2015. – №1. – С. 67.
10. Корожан Н.В., Г.Н. Бузук. Изменения компонентного состава надземной части *Bidens frondosa* (Asteraceae) в зависимости от условий сушки//Раст. ресурсы. – 2015. – вып.3.
11. Корожан Н.В., Г.Н. Бузук. Сравнительный анализ компонентного состава спиртовых извлечений из травы видов череды методом жидкостной хроматографии//Вестник фармации. – 2013. – №4. – С. 62.
12. Abbasa Qamar, Muhammad Saleemb, Abdul Rehman Phulla, Muhammad Rafiq, Mubashir Hassana, Ki-Hwan Leeb and Sung-Yum Seo. Green Synthesis of Silver Nanoparticles using *Bidens frondosa* Extract and their Tyrosinase Activity// Iranian journal of pharmaceutical research (IJPR). – 2017.
13. Bidyut Kumar Jana and Sobhan Kumar Mukherje. Morphological and anatomical studies of cypselae of 3 species of the family compositae//International Journal of Science Innovations and Discoveries. – May-June 2012. – V. 2. – Issue 3. – P. 387-393.
14. Bidyut Kumar Jana, Ruksona Aju and Sobhan Kr. Mukherjee. Diversity of cypselar features of five species of the tribe – Heliantheae (Asteraceae)// Indian J. Applied & Pure Bio. – 2014. – V. 29. – №2. – P. 199-205.
15. Bidyut Kumar Jana, Sobhan Kumar Mukherjee. Cypselar anatomy of some taxa of compositae//International Journal of Chemical And Pharmaceutical Research. – December 2013. – V. 2. – Issue 12. – P. 11-28.
16. Jiamei Le, Wenquan Lu, Xiaojuan Xiong, Zhijun Wu, Wansheng Chen. Anti-Inflammatory Constituents from *Bidens frondosa*//Molecules. – 2015. – V. 20(10). – P. 18496 – 18510
17. Kateřina Šumberová, Rossen Tzonev, Vladimir Vladimirov. *Bidens frondosa* (Asteraceae) – a new alien species for the Bulgarian flora//Phytologia balcanica. – 2004. – V. 10. – № 2-3. – P. 179–181.
18. Ronzhina D. A. Distribution, Competitive Ability, and Seed Production of *Bidens frondosa* L. in the Middle Urals//Russian Journal of Biological Invasions. – 2017. – V. 8. – № 4. – P. 351–359.
19. Yusong Cao, Yi'an Xiao, Sisi Zhang & Wenhai Hu. Simulated warming enhances biological invasion of *Solidago canadensis* and *Bidens frondosa* by increasing reproductive investment and altering flowering phenology pattern//Scientific reports – 2018. – V. 8. – Article number: 16073

ВЛИЯНИЕ КОРОДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ РЕКУЛЬТИВАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛАХ

Карнаухова В.М., Кайгородов Р.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Важнейшим свойством рекультивационных материалов выступает их способность снижать токсичность восстанавливаемых грунтов. Кородревесные отходы целлюлозно-бумажной промышленности являются органическими остатками разной степени разложения, способными снижать подвижность и токсичность тяжелых металлов в грунте. Целью работы было установить влияние кородревесных отходов на фитотоксичность цинка, меди и кадмия в грунтах на фоне известкования и без него.

Ключевые слова: кородревесные отходы, известкование, тяжелые металлы, фитотоксичность, фитотестирование.

INFLUENCE OF BARK-WOOD WASTE ON PHYTOTOXICITY OF HEAVY METALS IN ORGANOMINERAL RECULTIVATION MATERIALS

Karnaukhova V. M., Kaigorodov R. V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The most important property of recultivation materials is their ability to reduce the toxicity of the restored soils. Bark-wood waste from the cellulose and paper industry are organic residues of varying degrees of decomposition, capable of reducing the mobility and toxicity of heavy metals in the soil. The aim of the work was to establish the effect of bark-wood waste on the phytotoxicity of zinc, cuprum and cadmium in soils on the background of liming and without it.

Keywords: bark-wood waste, liming, heavy metals, phytotoxicity, phytotesting.

Кородревесные отходы (КДО) – это отходы деревообработки различного размера и степени разложения. Данный тип отходов образуется, в основном, при подготовке сырья для целлюлозно-бумажных предприятий – окорки [1].

Короотвалы, которые образуются в ходе складирования КДО, представляют серьезную опасность для окружающей среды. Скопление большого количества данных отходов IV класса опасности, которые в процессе перегнивания выделяют в окружающую среду, в основном в почву, такие вещества как полициклические ароматические углеводороды. ПАУ относятся к первому классу опасности химических веществ, как, например, бенз(а)пирен [2]. Существует несколько методов утилизации и использования КДО: термические, химические и биологические методы.

Биологические способы переработки основываются на процессах компостирования. Из компоста на основе КДО производят удобрения, мелиоранты и разнообразные рекультивационные материалы [3]. Одной из важнейших задач технологий рекультивации выступает снижение степени токсичности техногенно-нарушенных грунтов, в том числе за счет иммобилизации тяжелых металлов [4].

Целью работы являлось изучение влияния КДО на фитотоксичность тяжелых металлов (цинк, медь, кадмий) в вариантах органоминеральных грунтов на основе КДО с известкованием и без внесения извести. Основным методом в работе стало фитотестирование токсичности тяжёлых металлов в органоминеральных субстратах.

Объектами исследования выступили органоминеральный субстрат на основе речного песка и 25% КДО фракции диаметром менее 1 мм, песок и универсальный грунт для комнатных растений (контроль). В песок и органоминеральный субстрат были внесены, в зависимости от варианта, известь (CaCO_3) и 3 тяжёлых металла кадмий (Cd), цинк (Zn) и медь (Cu) в концентрациях равных 20-ти кратной ПДК. В вариантах с применением известкования, известь была внесена в дозировке 2 кг/м². При перерасчёте на 100 г субстрата в эксперименте, масса извести составила 1 г.

Тест-объектом был выбран кресс-салат (*Lepidium sativum* L.), так как данная тест-культура очень чувствительна к изменениям реакции среды почвы (грунта) [5]. Навеска семян составила 0,5 г на вариант.

Период проведения эксперимента составил десять дней. В течение всего эксперимента образцы поливались дистиллированной водой по мере высыхания субстрата до оптимального уровня влажности. До прорастания ростков, объекты исследования были накрыты укрывным материалом для создания парникового эффекта. Контейнеры с проростками растений устанавливали под лампу с красно-синим светом для создания равных условий освещённости. На десятый день проводили учет ростовых параметров проростков в 20-ти кратной повторности: длина надземной части и сырая биомасса.

Обработка данных результатов проводили стандартными методами статистического анализа в программе «Past3». Достоверность эксперимента подтверждена по критерию Стьюдента при условии $t_{\text{рас}} \geq t_{\text{ст}}$. С помощью критерия Фишера, при условии $F_{\text{рас}} \geq F_{\text{ст}}$, и значения наименьшей существенной разницы (НСР), при уровне вероятности 5%, была доказана значимость различий между вариантами эксперимента.

Ростовые показатели служат удобными индикаторными признаками воздействия различных субстратов на тест-растения. Рост и биомасса растений являются интегральными показателями их состояния в ответ на токсическое действие субстрата.

В таблице 1 представлены данные длины надземной части кресс-салата на разных вариантах органоминеральных грунтов. По результатам измерения длины надземной части тест-растения установлено, что варианты: «Песок + КДО + CaCO_3 + Cd», «Песок + КДО + CaCO_3 » и «Песок + КДО» не проявляли достоверных различий от контроля. Близкие к контролю показатели установлены на вариантах: «Песок + КДО + CaCO_3 + Cu», «Песок + КДО + Cu», «Песок + КДО + CaCO_3 + Cd + Zn + Cu» и «Песок + КДО + Zn». Наименьшая длина проростков кресс-салата отмечена в вариантах без внесения КДО в минеральный субстрат без известкования на фоне внесения тяжелых металлов, а также в варианте «Песок».

Таблица 1 – Длина надземной части проростков кресс-салата, мм

Вариант	Длина	$t_{расч}$	Вариант	Длина	$t_{расч}$
Контроль	$35,9 \pm 2,05$	17,53	Песок + КДО + Cd + Zn + Cu	$15,4 \pm 0,53$	29,05
Песок	$13,95 \pm 0,45$	31	Песок + КДО + CaCO ₃	$33,8 \pm 0,89$	38,09
Песок + Cd	$15,2 \pm 0,49$	31,03	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cd	$34,7 \pm 1,26$	27,43
Песок + КДО	$33,65 \pm 1,71$	19,72	Песок + КДО + CaCO ₃ + Zn	$31,4 \pm 1,19$	26,37
Песок + КДО + Cd	$31,1 \pm 0,97$	31,96	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cu	$29,85 \pm 1,07$	27,85
Песок + КДО + Zn	$25,5 \pm 0,68$	37,58	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cd + Zn + Cu	$28,55 \pm 0,85$	33,56
Песок + КДО + Cu	$29,4 \pm 0,81$	36,48	-	-	-
$t_{ст}$	2,09				
$F_{расч}$	45,91				
$F_{ст}$	1,39				
НСР	2,99				

В таблице 2 представлены данные по сырой биомасса проростков кресс-салата на разных вариантах органоминеральных грунтов.

По показателям сырой биомассы проростков наиболее близким к контролю оказался вариант органоминерального субстрата на основе песка и КДО без внесения металлов и извести. Остальные варианты имели средние показатели, помимо трёх вариантов с минимальной биомассой: «Песок + Cd», «Песок», «Песок + КДО + Cd + Zn + Cu». Стоит отметить, что и по показателям надпочвенного роста эти варианты имеют самые низкие значения.

Таким образом, внесение КДО в минеральный грунт существенно снижает фитотоксичность высоких концентраций (20 ПДК) меди, цинка и кадмия, особенно на фоне известкования субстрата в дозе 2 кг извести/м². Без известкования и применения КДО наибольшее угнетение тест-растений наблюдалось на варианте с внесением одновременно трех тяжелых металлов.

Таблица 2 – Сырая биомасса проростков кресс-салата, г

Вариант	Биомасса	$t_{расч}$	Вариант	Биомасса	$t_{расч}$
Контроль	$0,0203 \pm 0,0019$	10,608	Песок + КДО + Cd + Zn + Cu	$0,0064 \pm 0,0002$	25,497
Песок	$0,0064 \pm 0,0017$	16,54	Песок + КДО + CaCO ₃	$0,0151 \pm 0,0009$	16,867
Песок + Cd	$0,0079 \pm 0,0005$	14,721	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cd	$0,0158 \pm 0,0013$	12,075
Песок + КДО	$0,0170 \pm 0,0015$	11,501	Песок + КДО + CaCO ₃ + Zn	$0,0136 \pm 0,0012$	11,173
Песок + КДО + Cd	$0,0137 \pm 0,0008$	16,33	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cu	$0,0119 \pm 0,0006$	19,25
Песок + КДО + Zn	$0,0118 \pm 0,0006$	20,633	Песок + КДО + CaCO ₃ + Cd + Zn + Cu	$0,0121 \pm 0,0007$	16,292
Песок + КДО + Cu	$0,0120 \pm 0,0005$	23,37	-		
$t_{ст}$	2,09				
$F_{расч}$	17,02				
$F_{ст}$	1,39				
НСР	0,0029				

Органоминеральные субстраты на основе речного песка и 25% КДО с известкованием в дозе 2 кг/м² могут быть рекомендованы к рекультивации техногенно-нарушенных земель, загрязненных тяжелыми металлами.

Библиографический список

1. Ерунцова Е. Р., Анчугова Е. М. Кордревесные отходы: накопление и пути утилизации // Актуальные проблемы биологии и экологии: Материалы докладов XXVII Всероссийской молодежной научной конференции (с элементами научной школы), Сыктывкар, 16–20 марта 2020 года / Отв. редактор С. В. Дегтева. Сыктывкар: Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. – 2020. – С. 106-108.
2. Воробьева Д.Н. Оценка потенциального плодородия субстратов из твердых отходов целлюлозно-бумажной промышленности для использования в лесовыращивании: дис. ... канд. биол. наук. М. – 2015. – 202 с.
3. Ширинкина Е. С. Минимизация негативного воздействия кордревесных отходов целлюлозно-бумажной промышленности на окружающую среду // Вестник Пермского

национального исследовательского политехнического университета. Прикладная экология. Урбанистика. – 2014. – № 2(14). – С. 108-118.

4. Водяницкий Ю.Н. Тяжелые металлы и металлоиды в почвах. М.: ГНУ Почвенный институт им. В.В. Докучаева РАСХН. – 2008. – 86 с.
5. Митракова Н. В. Оценка биологической активности и токсичности почв и техногенных поверхностных образований в Пермском Прикамье.: Автореферат дис. канд. био. наук, 03.02.08: защищена 09.04.2019/ Митракова, Н. В. – Тюмень, 2019. – 18 с.

ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ТЕМНОГУМУСОВОЙ ПОЧВЫ

Лесникова М.В., Сапцын Р.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Рекультивация почв направлена на устранение нефтезагрязнения и восстановление плодородия почвы. Проведена оценка состояния темногогумусовой почвы, загрязненной в результате аварийного разлива нефти. Через 1,5 года после нефтезагрязнения и проведения технического этапа рекультивационных работ почва находится в неудовлетворительном экологическом состоянии; отдельные ее участки характеризуются фитотоксичностью. Содержание остаточной нефти в несколько раз превышает допустимый региональный норматив.

Ключевые слова: нефтезагрязнение, рекультивация, фитотестирование.

ASSESSMENT OF THE ECOLOGICAL STATE OF OIL-CONTAMINATED DARK-HUMUS SOIL

Lesnikova Maria Valerievna, Sapsyn Ruslan Vyacheslavovich

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National
Research University, Perm, Russia*

Abstract. Soil reclamation is aimed at eliminating oil pollution and restoring soil fertility. An assessment of the state of the dark-humus soil contaminated as a result of an accidental oil spill was carried out. 1,5 years after oil pollution and the technical stage of reclamation work, the soil is in an unsatisfactory ecological state; some of its parts are characterized by phytotoxicity. The content of residual oil is several times higher than the permissible regional standard.

Keywords: oil pollution, reclamation, phytotesting.

Нарушение техники безопасности, безответственность людей и аварийные ситуации при добыче и транспортировке нефти приводят к ее попаданию в почвы. При оценке последствий нефтезагрязнения отмечают низкую способность почв к самовосстановлению, поэтому проблеме рекультивация загрязненных земель необходимо уделять пристальное внимание [1, 2]. Загрязненная почва аккумулирует нефтяные вещества, водорастворимые соли, тяжелые металлы; верхний гумусовый слой, пропитанный нефтепродуктами, становится токсичным для растений и животных, многих микроорганизмов. Современные методы рекультивации почв направлены не только на устранение нефтезагрязнения, но и на восстановление плодородного слоя почвы [3].

Цель настоящего исследования – оценить экологическое состояние нефтезагрязненной темногогумусовой почвы методом фитотестирования.

Объектом исследований была темногумусовая почва, загрязненная нефтепродуктами в 2020 г. в результате аварии, вызванной несанкционированной врезкой в нефтепровод. На этапе технической рекультивации загрязненная растительность вместе с верхним слоем почвы была вывезена для последующей ремедиации.

В соответствии с классификацией и диагностикой почв СССР [4] почва была определена как дерново-карбонатная выщелоченная почва. По классификации и диагностики почв России [5] почва определена как темногумусовая почва на элювии пермских карбонатных глин.

В июне 2022 г. с 7-ми участков нефтезагрязненной почвы были отобраны пробы по глубинам 0-20 и 20-40 см для последующего фитотестирования. Оценка экологического состояния и токсичности почвы проводилась по реакции кресс-салата; в качестве тест-контроля использовали растения кресс-салата, выращенные на вермикулите с питательным раствором Кнопа [6].

Замеры высоты и массы 7-дневных проростков кресс-салата проводились в 25-кратной повторности. Значимость различий с тест-контролем оценивали по критерию Стьюдента. Редокс-активность растительных вытяжек изучали по методу Петта в модификации Прокашева в трехкратной повторности, значимость различий оценивали однофакторным дисперсионным методом по критерию Краскела-Уоллиса.

Содержание нефтепродуктов определяли по ПНД Ф 16.1:2:2.:2.3:3.64-10. Остаточное содержание нефтепродуктов оценили относительно норматива допустимого остаточного содержания нефтепродуктов для данного типа почвы [7].

Длина надземной части растений кресс-салата, выращенных на нефтезагрязненной почве, была существенно ниже, чем у растений на тест-контроле (рис. 1). Как правило, снижение длины растений находилось в пределах 30-50%; в соответствии с применяемой методикой [6] состояние почвы следует характеризовать как неудовлетворительное. На 4-х почвенных пробах с загрязненной территории растения были ниже тест-контроля на 52-64%, что позволяет считать, что на участках Т4 (глубина 20-40 см), Т5 (20-40 см), Т6 (0-20 см), Т7 (20-40 см) почва имеет экологически опасное состояние.

Сырая масса кресс-салата на пробах загрязненной почвы также была существенно ниже, чем масса растений на тест-контроле (рис. 2). На 7-ми почвенных пробах масса растений были ниже на 32-50% по сравнению с тест-контролем; еще на 7-ми пробах масса растений снижалась более, чем на 50%. В соответствии с методикой фитотестирования [6] половина почвенных проб характеризуется неудовлетворительным экологическим состоянием, вторая половина – экологически опасным состоянием.

Редокс-активность растительных экстрактов из кресс-салата, выращенного на нефтезагрязненной почве, колебалась в широком интервале (рис. 3). Половина почвенных проб оказалась не токсичной, т.к. редокс-активность растений не увеличивалась относительно тест-контроля. На другой половине почвенных проб растения характеризовались повышенной восстановительной активностью. По сравнению с тест-контролем, этот показатель повышен в пределах 10-30%, что характеризует почву как умеренно токсичную. Почва с глубины 20-40 см на участке Т2 оказалась сильно токсичной, т.к. редокс-активность возросла на 46%.

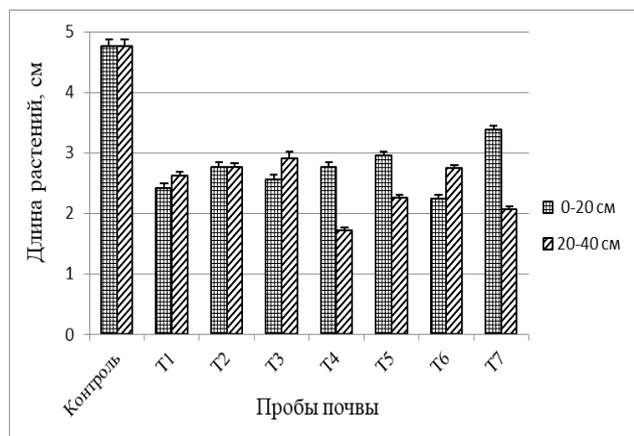


Рисунок 1 – Длина кресс-салата, см.

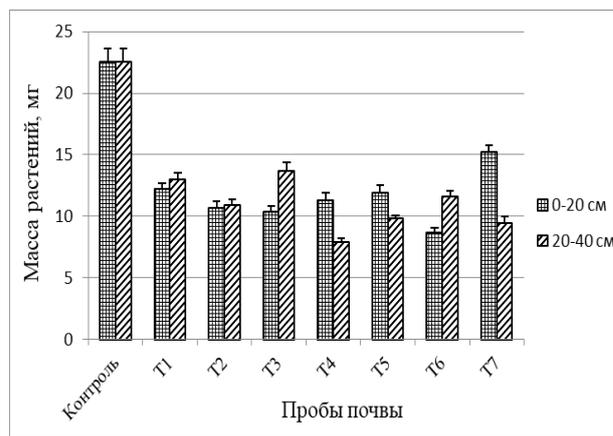


Рисунок 2 – Сырая масса кресс-салата, мг.

Данные о повышенной редокс-активности тест-культуры, выращенной на пробах нефтезагрязненной почвы, соответствуют сведениям по аккумуляции в проростках растений при нефтяном стрессе веществ, характеризующихся восстановительной активностью (антоцианы, рибофлавин, аскорбиновая кислота и др.) [8, 9]. Содержание остаточной нефти во всех пробах темногумусовой почвы (табл. 4) превышало допустимое остаточное содержание нефтепродуктов относительно норматива для дерново-карбонатных почв Пермского края [7], который составляет 2500 мг/кг почвы. Следовательно, технический этап рекультивации не обеспечил снижения нефтесодержания в почве до уровня, допустимого для соответствующего типа почвы.

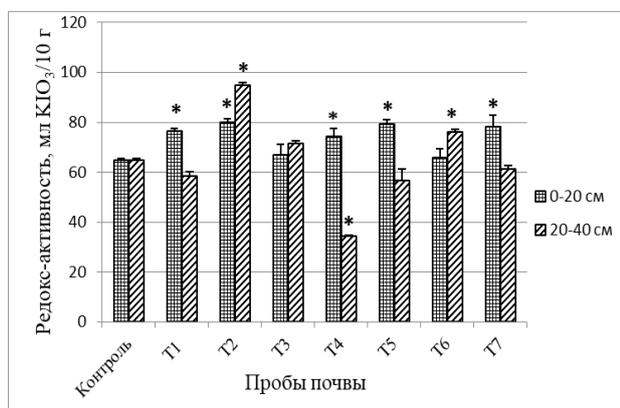


Рисунок 3 – Редокс-активность экстрактов из кресс-салата, мл 0,001 н КЮ₃/10 г сырой массы.

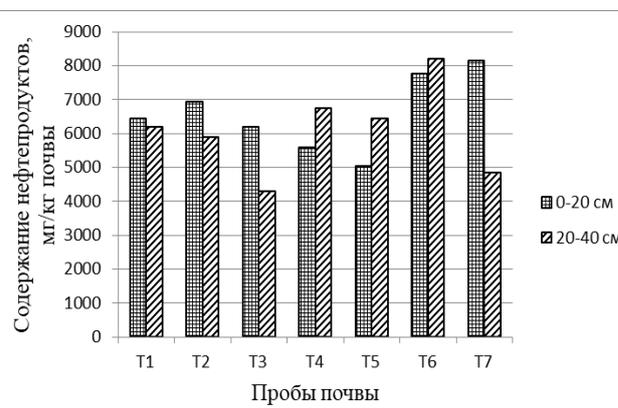


Рисунок 4 – Остаточное содержание нефтепродуктов в темногумусовой почве, мг/кг почвы.

Таким образом, темногумусовая почва через 1,5 года после нефтезагрязнения и проведения технического этапа рекультивационных работ находится в неудовлетворительном экологическом состоянии; отдельные загрязненные участки почвы характеризуются фитотоксичностью. Содержание остаточной нефти в слое 0-40 см в несколько раз превышает региональный норматив остаточного содержания нефтепродуктов для дерново-карбонатных почв.

Библиографический список

1. Оборин А.А., Хмурчик В.Т., Иларионов С.А., Маркарова М.Ю., Назаров А.В. Нефтезагрязненные биогеоценозы. – Пермь, 2009. – 511 с.

2. Васильченко А.В. Рекультивация нефтезагрязненных земель. Оренбург, 2017. – 124 с.
3. Черняховский Э.Р., Шкидченко А.Н., Юматова О.А., Чушкина З.Ю. Применение различных технологий при ликвидации последствий аварийных разливов нефти, нефтепродуктов и продуктов переработки нефтесодержащих отходов // Проблемы безопасности и чрезвычайных ситуаций. – 2004. – № 6. – С. 27-29.
4. Классификация и диагностика почв СССР. – М.: Колос, 1977. – 224 с.
5. Классификация и диагностика почв России / Л.Л. Шишов, В.Д. Тонконогов, И.И. Лебедева, М.И. Герасимова / под ред. Г.В. Добровольского. – Смоленск: Ойкумена, 2004. – 342 с.
6. Еремченко О.З., Митракова Н.В. Способ оценки биологической активности и токсичности почв и техногенных почвогрунтов: патент РФ № 2620555. – 2017.
7. Постановление Правительства Пермского края №813-п от 20.12.2018 (с изменениями на 23 декабря 2020 года) «Об утверждении региональных нормативов допустимого остаточного содержания нефти и продуктов ее трансформации в почвах Пермского края и Порядка их применения».
8. Чупахина Г.Н., Масленников П.В. Адаптация растений к нефтяному стрессу // Экология. – 2004. – № 5. – С. 330–335.
9. Осипова Е.С., Петухова Г.А., Перекупка А.Г. Активация биохимических механизмов защиты растений при действии нефтяного загрязнения и парааминобензойной кислоты // Вестник Тюменского государственного университета. – 2013. – № 6. – С. 41-47.

ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ И РАЗНОГО УРОВНЯ pH

Мальцева А.Д., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. Представлены результаты исследований по изменению содержания воды в листьях *Avena sativa*, *Triticum aestivum* и *Secale cereale* в условиях засоления и разного уровня pH корневой среды. Отмечено, что не только засоление, но и pH уровень корневой среды влияют на содержание воды в клетках растений. Наибольшие потери воды у всех растений отмечены при действии кислой реакции корневой среды, как с засолением, так и без него, менее значительные – на щелочном фоне и самые небольшие при воздействии засоления NaCl 150 мМ на фоне нейтральной реакции среды.

Ключевые слова: содержание воды, засоление, кислотный стресс, щелочной стресс, осмотический стресс.

CHANGES IN THE WATER CONTENT IN PLANT LEAVES UNDER SALINIZATION CONDITIONS AND DIFFERENT PH LEVELS

Maltseva A. D., Chetina O. A.

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National
Research University, Perm, Russia*

Abstract. The results of studies on changes in the water content in the leaves of *Avena sativa*, *Triticum aestivum* and *Secale cereale* under salinization and different pH levels of the root medium are presented. It is noted that not only salinization, but also the pH level of the root medium affects the water content in plant cells. The greatest water losses in all plants were observed under the action of an acidic reaction of the root medium, both with and without salinization, less significant – on an alkaline background and the smallest when exposed to NaCl 150 mM salinization on the background of a neutral reaction of the medium.

Keywords: water content, salinity, acid stress, alkaline stress, osmotic stress.

Вода необходима растениям для нормального функционирования и жизнедеятельности. Она участвует в транспорте минеральных и органических веществ, т.к. является уникальным растворителем. Играет важную роль в терморегуляции, влияет на активность ферментов и является структурным элементом мембран. При недостатке воды концентрация растворимых веществ в клетке возрастает, целостность мембран и физиологические функции нарушаются [1, 2].

Избыточное накопление солей в почве угнетает растительность. Повышенное осмотическое давление почвенного раствора, вызванное накоплением солей, затрудняет поступление воды в клетки растений. Также и сами соли, попадая в цитоплазму клеток растений, оказывают токсическое действие, вызывая нарушения метаболизма [3].

В природных и техногенных ландшафтах развитие засоления может сопровождаться как снижением, так и повышением pH [4]. В условиях щелочной реакции среды у растений наблюдается нарушение проницаемости мембран, накопление осмолитов. Кислая реакция среды увеличивает подвижность ионов алюминия, которые негативно влияют на растения, нарушая процессы деления и растяжения клеток корня, уменьшая поглощение микро- и макроэлементов [5, 6].

Объектами нашего исследования являлись *Avena sativa* L. сорта Стайер, *Triticum aestivum* L. сорта Горноуральский, *Secale cereale* L. сорта Фаленская. Растения выращивали в контейнерах объемом 1 л, в качестве субстрата использовался влажный вермикулит (на 65 г вермикулита 180 мл дистиллированной воды при посадке). На 7 день после появления всходов растения подвергались воздействию стресс-факторов. В качестве стрессовых факторов использовались растворы с различным уровнем pH (pH3, pH7, pH10) и засолением NaCl 150 мМ. Для создания щелочной среды использовался боратный буфер (pH10), для кислой – ацетатный (pH3). Контрольным являлся вариант с pH 7 без засоления. Сбор материала проводили через 2, 4, 6, 24, 48, 72 часа после стресс-воздействия. Срезанный материал взвешивали и сушили в сушильном шкафу при температуре 80° С. Высушенный материал снова взвешивался, высчитывался процент потери воды. Данные статистически обрабатывались в программе STADIA с применением методов описательной статистики, критериев сдвига/положения для определения достоверности различий между вариантами.

Изменение содержания воды в листьях пшеницы мягкой в условиях засоления и разного уровня pH представлены на рисунке 1.

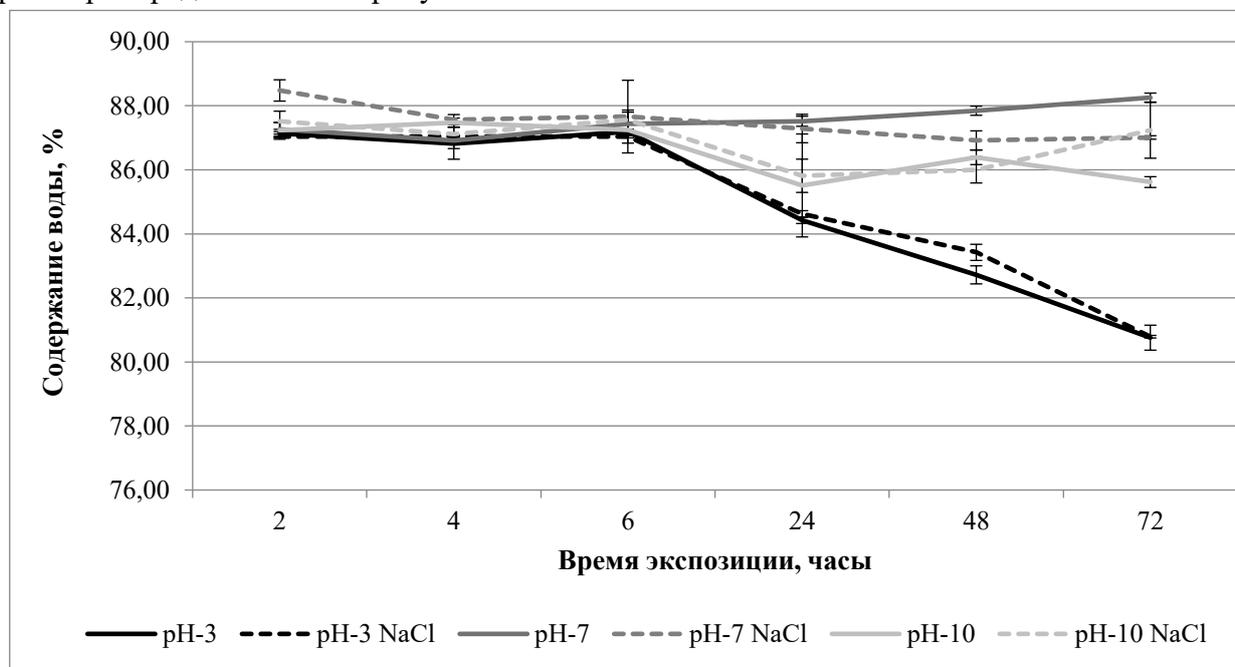


Рисунок 1 – Содержание воды в листьях пшеницы мягкой в условиях засоления и разного уровня pH корневой среды.

В первые 6 часов после добавления стресс-факторов значимых различий по содержанию воды между разными вариантами опыта не обнаружено. Через 24 часа зафиксировано

снижение уровня воды на фоне кислой и щелочной реакций корневой среды, как в сочетании с засолением, так и без него. В вариантах опыта рН 3 и рН3+NaCl через 24 часа количество воды уменьшилось на 3–5 % относительно контроля, через 48 часов эти отличия составляли в среднем 10,5%, а через 72 часа – 15%. В опытных вариантах рН10 и рН10+ NaCl снижение уровня воды было не столь значительным: в среднем на 0,75% через 24 часа, на 4% – через 48 часов и на 5,5% через 72 часа. На фоне кислой и щелочной реакций среды достоверных различий между вариантом с засолением и без него не обнаружено. На фоне нейтральной реакции среды некоторое снижение количества воды (на 1–2 %) отмечено в варианте с засолением через 48 и 72 часа относительно контроля.

Содержание воды в листьях ржи при нейтральной реакции корневой среды незначительно снижалось в вариантах с засолением (на 1–1,5 %) через 4 и 48 часов после стресс-воздействия относительно варианта рН 7 (рис. 2). В остальные временные промежутки эксперимента значимых различий с контролем не обнаружено. На фоне кислой реакции корневой среды, как с засолением, так и без него, достоверное уменьшение количества воды началось через 4 часа после стресс-воздействия (на 3–3,6 % меньше контроля) и достигло минимальных значений к 72 часам (на 5,4–7,4 % меньше контроля). На фоне щелочной реакции корневой среды, как с засолением, так и без него, зафиксировано статистически значимое снижение воды в некоторые временные промежутки (через 4, 24 и 48 часов после стресс-воздействия) в пределах 1,2–3,2 %, в остальные временные промежутки эксперимента значимых различий с контролем не обнаружено. При сравнении вариантов опыта с засолением и без него на фоне рН 3 и рН 10 достоверных различий по содержанию воды не обнаружено на всем протяжении эксперимента, за исключением варианта рН3+ NaCl, где через 72 часа воды в листьях было меньше на 2%, чем в варианте рН 3.

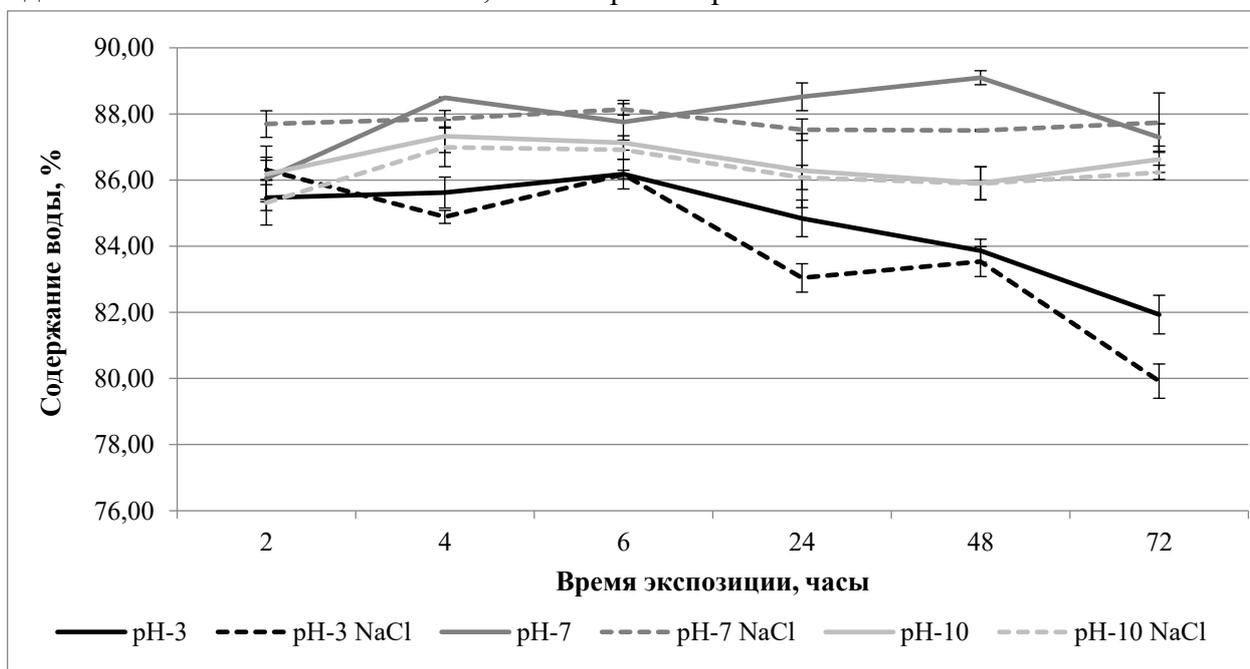


Рисунок 2 – Содержание воды в листьях ржи посевной в условиях засоления и разного уровня рН корневой среды.

Содержание воды в листьях овса при нейтральной реакции корневой среды в вариантах с засолением варьировало относительно варианта рН 7 на 1–2 %, как в большую, так и в меньшую стороны (рис. 3).

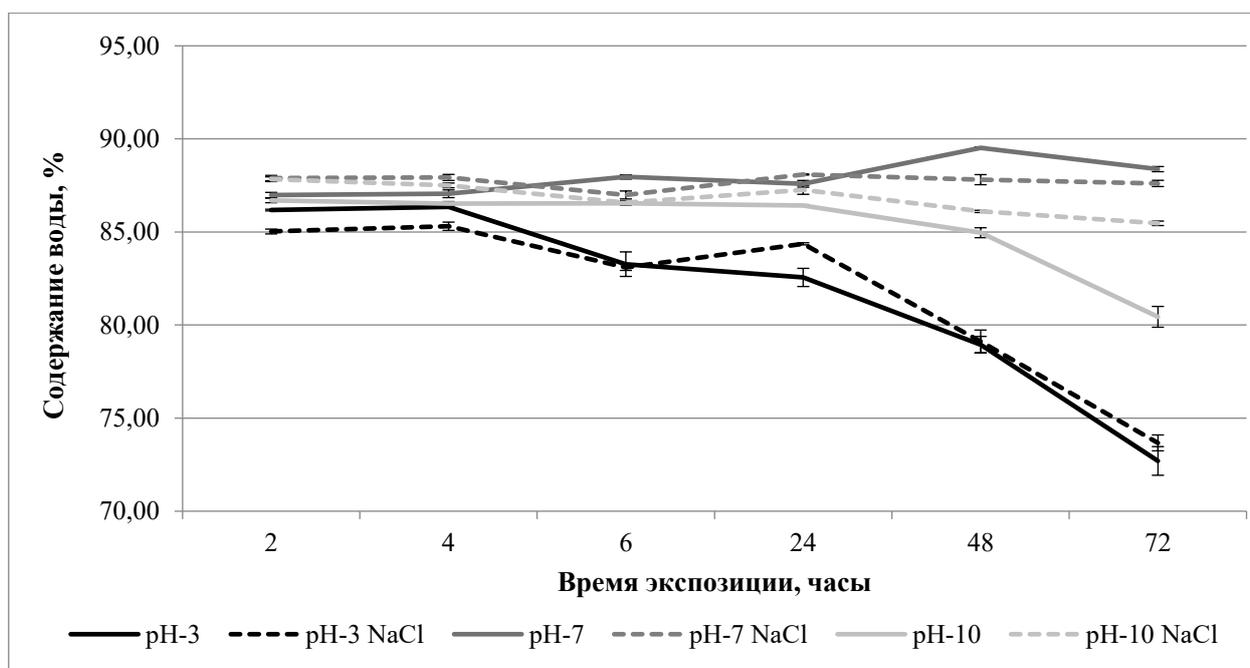


Рисунок 3 – Содержание воды в листьях овса посевного в условиях засоления и разного уровня pH корневой среды.

На фоне кислой реакции среды наблюдалось значительное снижение количества воды в сравнении с контрольным вариантом: от 1–2 % через 2 часа после стресс-воздействия, до 15–16 % через 72 часа. В варианте опыта pH3+NaCl меньшее количество воды, чем в варианте pH 3 на 1–1,8 % отмечено в некоторые временные промежутки (2, 4 и 24 часа после стресс-воздействия). На щелочном фоне достоверное снижение уровня воды отмечается через 6 часов после стресс-воздействия на 1,4 % и к 72 часам в варианте без засоления достигает 8 %, в сочетании с засолением – 3%.

Таким образом, у всех исследованных растений содержание воды в листьях в варианте с засолением и нейтральным уровнем среды, либо достоверно не отличалось от варианта pH 7, либо различия были минимальны (в пределах 1–2 %).

Наибольшие потери воды у всех растений отмечены при действии кислой реакции корневой среды, как отдельного фактора, так и в сочетании с засолением. По мнению Захарина А.А. и Паничкина Л.А. [7] избыток протонов в апопласте резко меняет проницаемость клеток, за счет положительно заряженного примембранного слоя («протонный барьер»), который не пропускает катионы в обе стороны, а анионы пропускает предпочтительно наружу. Поскольку диполи воды в этих условиях превращаются в ионы гидроксония, то, как и другие ионы, они неспособны пройти через водный канал. Развивается значительное обезвоживание клеток корня, а водонепроницаемость клеток может сохраняться даже после прекращения воздействия еще длительное время.

При действии щелочного стресса, как в сочетании с засолением, так и без него, так же отмечены потери воды листьями всех исследуемых растений, хоть и менее значительные, чем при кислотном воздействии. Ион гидроксила обезвоживает клетки корня, в них создается «гидроксильный барьер», не пропускающий воду [7]. Высокий уровень pH может приводить к потере нормальных физиологических функций корней и к разрушению структуры клеток корня [8], препятствует усвоению неорганических анионов (Cl^- , NO_3^- и H_2PO_4^-), влияет на селективное поглощение катионов, изменяет ионный баланс и pH гомеостаз в тканях [9].

Ряд авторов [10–12] так же отмечают, что при высоком и низком уровне рН наблюдается ингибирование транспорта воды в корне, что приводит к уменьшению потока воды через корни, потере гидратации листьев и закрытию устьиц. Кроме того, максимальная при нейтральном уровне рН устойчивость белков клеточной мембраны при снижении или увеличении рН уменьшается, проницаемость мембраны меняется, что сказывается на осмотическом равновесии системы «клетка – среда» [7]. Воздействие кислотных и щелочных растворов вызывает устойчивую непроницаемость клеток для воды даже после снятия воздействия.

Таким образом, в ходе наших исследований обнаружено, что не только засоление, но и рН уровень корневой среды влияют на содержание воды в клетках растений. Наибольшие потери воды у всех растений отмечены при действии кислой реакции корневой среды, как отдельного фактора, так и в сочетании с засолением (до 16 % от контрольных значений). При действии щелочного стресса, как в сочетании с засолением, так и без него, потери воды листьями были менее значительные, чем при кислотном воздействии (до 8 %). Минимальные изменения в количестве воды зафиксированы при воздействии засоления NaCl 150 мМ на фоне нейтральной реакции среды.

Библиографический список

1. Кузнецов В.В., Дмитриева Г.А. Физиология растений. – 2 изд., перераб. и доп. – М.: Высш. Шк., 2006. – 742 с.
2. Семенютина В.А., Свинцов И.П. Обоснование адаптивности сортов *Zizyphus jujuba* к климатическим условиям Волгоградской области // Наука. Мысль. – 2021. – №2. – С. 82-101.
3. Иванищев В.В., Евграфкина Т.Н., Бойкова О.И., Жуков Н.Н. Засоление почвы и его влияние на растения // Известия Тульского государственного университета. Науки о земле. – 2020. – №3. – С. 28-42.
4. Еремченко О.З., Митракова Н.В., Шестаков И.Е. Природно-техногенная организация почвенного покрова территории воздействия солеотвалов и шламохранилищ в Соликамско-Березниковском экономическом районе // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2017. – Вып. 3. – С. 311-320.
5. Иванов М.В., Иванова Н.В. Устойчивость растений ячменя к кислотному и алюминиевому стрессу // II Лужские научные чтения. Современное научное знание: теория и практика: материалы междунар. науч. конф. – Санкт-Петербург: Изд-во ЛГУ им. А.С. Пушкина. – 2014. – С. 55-59.
6. Четина О.А., Боталова К.И., Кайгородов Р.В. Влияние щелочности и кислотности корневой среды на состояние защитных систем *Triticum aestivum* L. и *Secale cereale* L. // Физиология растений. – 2020. – №2. – С. 177-187.
7. Захарин А.А., Паничкин Л.А. Модель протонного барьера. Полная односторонняя непроницаемость клеток корня для воды под влиянием избытка протонов в апопласте // Известия ТСХА. – 2005. – Вып.3. – С. 69-81.
8. Yang, C.W., Jianaer, A.H., Li, C.Y., Shi, D.C., Wang, D.L.: Comparison of the effects of salt-stress and alkali-stress on the photosynthesis and energy storage of an alkali-resistant halophyte *Chloris virgata* // Photosynthetica. – 2008. – Vol. 46. – P. 273-278.

9. Yang, C.W., Shi, D.C., Wang, D.L.: Comparative effects of salt stress and alkali stress on growth, osmotic adjustment and ionic balance of an alkali-resistant halophyte *Suaeda glauca* (Bge.) // *Plant Growth Regul.* – 2008. – Vol. 56 – P. 179-190.
10. Zhang W., Zwiazek J.J. Effects of root medium pH on root water transport and apoplastic pH in red-osier dogwood (*Cornus sericea*) and paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings // *Plant Biology.* – 2016. – Vol. 18. – P. 1001-1007.
11. Kamaluddin M., Zwiazek J.J. Effects of root medium pH on water transport in paper birch (*Betula papyrifera*) seedlings in relation to root temperature and abscisic acid treatments // *Tree Physiology.* – 2004. – Vol. 24. – P. 1173-1180.
12. Yang, C. et al. Comparative effects of salt stress and alkali-stress on the growth, photosynthesis, solute accumulation, and ion balance of barley plants // *Photosynthetica.* – 2009. – Vol. 47. – P. 79-86.

ЭКОЛОГО-ГЕОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЧВ ГОРОДА КОГАЛЫМА И ПОКАЗАТЕЛИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ

Мурзина А.Е.¹, Шеуджен А.Ш.², Решетников М.В.², Плешакова Е.В.¹

¹ *Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

² *Филиал ООО «ЛУКОЙЛ-Инжиниринг» «КогалымНИПИнефть», Тюмень, Россия*

Аннотация. В рамках проведения комплексного мониторинга экологического состояния урбанизированной территории нефтедобывающего города Когалыма, Ханты-Мансийского автономного округа (ХМАО), Тюменской области осуществлены анализы эколого-геохимических показателей почв, в результате которых в некоторых пробах выявлено незначительное превышение ПДК подвижных форм тяжёлых металлов, таких как Cu, Ni и Zn. Методом биотестирования, основанном на определении дегидрогеназной активности микробного штамма *Dietzia maris* AM3, высокой токсичности почв не установлено.

Ключевые слова: тяжёлые металлы, мониторинг урбосистем, биотестирование, дегидрогеназная активность.

ECOLOGICAL AND GEOCHEMICAL PROPERTIES OF KOGALYM'S SOILS AND BIOTESTING INDICATORS

Murzina A.E.¹, Sheudzhen A.Sh.², Reshetnikov M.V.², Pleshakova E.V.¹

¹ *Chernyshevskii Saratov State University, Saratov, Russia*

² *LUKOIL-Engineering LLC, Kogalymnpineft branch in Tyumen, Kogalym, Russia*

Abstract. As part of the comprehensive monitoring of the environmental condition of the urbanized area of the oil-producing city of Kogalym, Khanty-Mansi Autonomous Okrug (KMAO), Tyumen Oblast, the analysis of environmental and geochemical parameters of soils were carried out, which resulted in some samples revealed a slight excess of MPC of mobile forms of heavy metals, such as Cu, Ni and Zn. By the method of biotesting based on determination of dehydrogenase activity of microbial strain *Dietzia maris* AM3, high toxicity of soils was not established.

Keywords: heavy metals, monitoring of urban systems, biotesting, dehydrogenase activity

До недавнего времени при оценке загрязнения урбанизированных экосистем приоритетными являлись физико-химические методы анализа, но в последнее время всё больше внимания уделяется использованию биологических методов (биоиндикации и биотестированию), а также комплексного подхода, основанном, например, на учёте данных биодиагностики и химического анализа [1]. В то же время, нет универсального подхода для

оценки воздействия техногенных факторов городской среды на почвы в связи с существованием множественных факторов техногенеза. Максимально возможное сохранение городских почв на фоне высокого уровня техногенного загрязнения с широким спектром поллютантов представляется не только экологически, но и экономически чрезвычайно важным. Наличие различных источников поступления загрязняющих веществ и их вклад в загрязнение окружающей среды городов, городских почв, подчёркивают необходимость проведения комплексного анализа урбанизированных территорий [2].

Как известно, нефтедобывающая отрасль оказывает мощное техногенное воздействие на почвенный покров, загрязняя его нефтяными углеводородами и сопутствующими загрязнителями разной степени токсичности, например, тяжёлыми металлами [3]. Загрязнение почвы в районах нефтедобычи может представлять собой значительную геохимическую угрозу для экосистем, т.к. в сырой нефти и буровых растворах присутствует ряд тяжёлых металлов (ТМ): свинец (Pb), никель (Ni), кадмий (Cd), хром (Cr), ванадий (V) и цинк (Zn) [4, 5]. Комплексная оценка эколого-функционального состояния почв районов нефтедобычи является одной из приоритетных задач в современной природоохранной сфере, решение которой необходимо для обеспечения устойчивого функционирования и восстановления экосистем, нарушенных в процессе хозяйственной деятельности человека.

В рамках проведения исследований, по комплексной оценке, экологического состояния почв территории города Когалыма, Ханты-Мансийского автономного округа (ХМАО), Тюменской области – основного нефтегазоносного района России, были осуществлены анализы эколого-геохимических показателей почв. Когалым – быстро развивающийся город, основан в 1975 году, площадью 20,5 км², с численностью населения 68 700 человек (по данным 2021 г.). Градообразующее предприятие: ООО «ЛУКОЙЛ – Западная Сибирь». Город Когалым приравнен к районам Крайнего Севера. Здесь преобладает резко континентальный климат. Почвы Когалымского региона подзолистые тайги и болотные. Сосновые леса развиваются на торфянисто-подзолисто-глеевых почвах в условиях длительного избыточного увлажнения, а также на заторфованных понижениях среди дренированных массивов. Сосняки приурочены в основном к дренированным поверхностям водно-ледниковых равнин, песчаным субстратам. Под ними обычно формируются иллювиально-железистые почвы.

Отбор почвенных проб производили сотрудники Центра исследования керна и пластовых флюидов Филиала ООО «ЛУКОЙЛ-Инжиниринг» «КогалымНИПИнефть» в г. Тюмени. Отбор и подготовка проб велись в соответствии с ГОСТ 17.4.4.02-84 [6]. Подвижные кислоторастворимые формы ТМ (Pb, Zn, Ni, Cu) в почве определяли атомно-абсорбционной спектрометрией с пламенной атомизацией [7].

Отдельной составляющей комплексного мониторинга явилось проведение биотестирования почв территории города Когалым. Биотестирование – это эффективный метод оценки потенциальной опасности химического, физического или биологического воздействия на почву. Это экспериментальный метод, в котором используются стандартизированные лабораторные тест-системы. Определяются изменения биологически важных показателей таких систем под воздействием исследуемых образцов. На этой основе образцы располагаются в соответствии с их уровнем токсичности. Тест-системы представляют собой пространственно ограниченные комплексы чувствительных биологических элементов (сенсоров), помещённых в исследуемую среду. Методы биотестирования в настоящее время чрезвычайно разнообразны. Чаще всего их классифицируют по типу применяемых тест-систем, в основном это: биотесты на основе микроорганизмов, простейших, грибов и водорослей, растений, а также животных объектов [8].

Мы использовали метод биотестирования, разработанный нами ранее [9], который основан на способности ферментов бактерий – дегидрогеназ восстанавливать за счёт

дегидрирования бесцветный 2,3,5-трифенилтетразолийхлорид (ТТХ) до 2,3,5-трифенилформаза (ТФФ), имеющего тёмно-красный цвет. Дегидрогеназы высоко чувствительны к действию токсичных веществ, в присутствии которых их активность снижается. Это позволяет путём сравнения количества трифенилформаза, образованного дегидрогеназами микробного штамма *Dietzia maris* АМЗ, в опытах и контроле оценить степень токсичности исследуемых образцов почвы. Данный метод биотестирования прост, хорошо воспроизводим, обеспечивает получение точных и стабильных результатов, обладает высокой чувствительностью. В качестве тест-организма применялся штамм *D. maris* АМЗ, который является широко распространённым почвенным микроорганизмом, обладает значительной дегидрогеназной активностью. Он не требует специальных методов хранения и культивирования, хорошо растёт на классических микробиологических средах.

Исследуемые почвенные пробы в количестве 1 г автоклавировали для инактивации почвенных ферментов. Затем согласно методике, вносили в пробирки с почвой перечень субстратов: 1,2 мл Na_2HPO_4 ; 0,5 мл 0,1 М глюкозы; 0,1 мл 0,1 М MgSO_4 ; 0,2 мл 0,5% ТТХ и микробную суспензию с оптической плотностью 0,5 ед., приготовленную на основе трёхсуточной культуры *D. maris* АМЗ. Полученную смесь инкубировали в термостате в течение 6 сут. до появления окраски ТФФ. В качестве контроля были приготовлены пробирки с субстратами и бактериальной суспензией *D. maris* АМЗ без добавления почвы. Далее проводили экстракцию ТФФ ацетоном и колориметрировали отфильтрованный экстракт. В результате были получены данные оптической плотности, по которым с использованием калибровочной кривой рассчитывали количество образованного бактериями ТФФ. Все анализы проводили в нескольких повторностях. Достоверность различий между средними значениями оценивали на основе критерия Стьюдента. Корреляционный анализ взаимосвязей между эколого-геохимическими показателями и показателями биотестирования почв проводили с помощью расчёта коэффициента Пирсона. Результаты эколого-геохимического анализа почвенных проб и биотестирования представлены в таблице.

Таблица – Результаты эколого-геохимического анализа почвенных проб и биотестирования

№ почвенной пробы	Количество 2,3,5-ТФФ, мг/мл	Концентрация подвижных форм тяжёлых металлов, мг/кг			
		Cu	Pb	Zn	Ni
1	0,342 ± 0,006	1,88	1,24	10,61	2,15
2	0,265 ± 0,010	0,63	1,14	4,31	1,42
3	0,675 ± 0,010	0,16	0,62	2,45	0,24
4	0,312 ± 0,040	0,87	0,75	4,97	1,46
5	0,550 ± 0,028	1,65	1,73	12,13	4,06
6	0,583 ± 0,120	2,18	0,87	9,13	1,83
7	0,501 ± 0,080	2,12	1,04	8,53	2,43
8	0,350 ± 0,003	1,81	2,49	13,83	4,25
9	0,335 ± 0,005	2,10	2,63	16,76	3,57

Таблица (продолжение)

№ почвенной пробы	Количество 2,3,5-ТФФ, мг/мл	Концентрация подвижных форм тяжёлых металлов, мг/кг			
		Cu	Pb	Zn	Ni
10	0,533 ± 0,030	1,70	2,87	16,83	4,55
11	0,495 ± 0,029	0,99	1,41	10,35	1,16
12	0,610 ± 0,102	0,46	0,47	3,84	0,51
13	0,367 ± 0,030	1,15	1,17	17,05	0,80
14	0,425 ± 0,043	1,60	1,30	11,99	1,94
15	0,505 ± 0,071	1,65	0,80	7,74	1,40
16	0,443 ± 0,009	1,20	1,95	6,85	1,65
18	0,273 ± 0,010	2,11	2,35	11,10	2,79
19	0,338 ± 0,040	0,77	1,57	16,97	0,63
20	0,493 ± 0,004	0,35	0,65	3,86	0,50
21	0,498 ± 0,027	0,38	1,32	3,25	1,11
22	0,650 ± 0,029	1,24	1,58	10,33	1,60
23	0,668 ± 0,040	2,08	2,73	12,79	2,33
24	0,747 ± 0,030	1,95	1,25	9,39	1,43
25	0,458 ± 0,022	0,29	0,71	1,76	0,53
27	0,448 ± 0,001	1,44	2,29	15,56	2,66
28	0,453 ± 0,029	2,82	2,59	23,27	7,03
29	0,463 ± 0,005	0,94	2,93	12,36	0,98
31	0,312 ± 0,014	1,79	0,33	11,16	3,23
32	0,613 ± 0,090	6,45	0,23	15,73	3,66
33	0,373 ± 0,017	2,85	0,26	24,30	3,37
34	0,252 ± 0,017	2,55	0,27	14,85	3,03
35	0,182 ± 0,005	2,96	0,35	18,39	4,05
36	0,276 ± 0,040	2,75	0,29	18,95	4,46
37	0,159 ± 0,090	3,24	0,33	21,56	3,53
38	0,221 ± 0,110	11,55	0,81	26,01	5,80
39	0,397 ± 0,015	3,02	0,39	17,34	6,68
41	0,617 ± 0,070	1,23	0,33	9,93	0,96
42	0,290 ± 0,010	2,13	0,27	8,78	2,34
43	0,230 ± 0,010	1,30	0,08	5,72	1,01
44	0,377 ± 0,002	4,26	0,19	10,28	5,12
45	0,525 ± 0,118	6,43	0,28	18,06	6,81
46	0,448 ± 0,078	7,06	0,22	15,85	3,32
47	0,408 ± 0,030	5,33	0,27	14,10	8,73
48	0,183 ± 0,001	4,68	0,18	12,29	6,19

Таблица (окончание)

№ почвенной пробы	Количество 2,3,5-ТФФ, мг/мл	Концентрация подвижных форм тяжёлых металлов, мг/кг			
		Cu	Pb	Zn	Ni
49	0,535 ± 0,170	3,15	0,09	8,46	3,25
50	0,195 ± 0,002	2,40	0,25	7,65	3,21
51	0,398 ± 0,045	9,43	0,29	18,33	5,24
52	0,625 ± 0,014	2,02	0,12	3,65	1,29
53	0,368 ± 0,040	4,20	0,36	16,11	5,23

В 12-ти из 49-ти проанализированных проб подвижные формы Cu превышали ПДК (3,0 мг/кг) [10]. Выделялся один из районов города, расположенный в восточной части исследованной территории, в котором отмечено превышение над ПДК в большинстве проб. В пробе №38 превышение было максимальным (3,85 ПДК). В 14-ти из 49-ти проанализированных проб подвижные формы Ni превышали ПДК (4,0 мг/кг) [8]. В том же районе на востоке были сосредоточены почвы с повышенным содержанием подвижных форм Ni. В пробе №47, находящейся на востоке территории, показано максимальное превышение над ПДК (в 2,2 раза). Во всех пробах обнаружены подвижные формы Pb от 0,08 до 2,93 мг/кг почвы, которые не превышали ПДК (6,0 мг/кг почвы) [11]. Во всех пробах обнаружены подвижные формы Zn в концентрации от 1,76 до 26,01 мг/кг почвы. Только в трёх пробах (№ 28, 33 и 38) концентрация подвижных форм Zn незначительно превышала ПДК (23,0 мг/кг почвы) [12]. Максимальная концентрация отмечена в пробе №38, в которой было обнаружено также и максимальное содержание подвижных форм Cu.

Результаты биотестирования показали, что количество ТФФ, образованного дегидрогеназами *D. maris* АМЗ, составляло от 0,159 до 0,747 мг/мл, что свидетельствовало об отсутствии высокой токсичности почвы. Не было выявлено значимых превышений по показателю биотестирования для исследованных почвенных проб. В результате проведённого корреляционного анализа установлена слабая отрицательная корреляция между количеством ТФФ, образованным дегидрогеназами *D. maris* АМЗ, и концентрацией в почве подвижных форм металлов (Cu, Zn и Ni): $r = -0,2$; $-0,3$ и $-0,3$, соответственно, и слабая положительная корреляция с концентрацией в почве подвижных форм Pb ($r = 0,2$).

Таким образом, использованное нами сочетание методов позволило оценить загрязнённость территории города Когалыма. Данные эколого-геохимического анализа показали, что содержание подвижных форм Pb в почве и Zn (в большинстве проб) было в пределах нормы. В то же время содержание подвижных форм Ni и Cu превышало ПДК в восточной части городской территории. В то же время, это превышение не влияло на уровень токсичности почвы.

Полученные результаты могут послужить основой для последующей системы долгосрочного мониторинга развивающегося города, для разработки комплексного подхода при экологическом мониторинге урбосистем и прогнозирования состояния антропогенно нарушенных территорий.

Библиографический список

1. Шумилова Л.П., Терехова В.А. Биотические и химические показатели в оценке экологического качества почв урбанизированной экосистемы // Экология урбанизированных территорий. – 2017. – №1. – С. 34-38.
2. Скугорева С.Г. Комплексный подход в оценке экологического состояния городских почв // Теоретическая и прикладная экология. – 2019. – №3. – С. 57-65. DOI: 10.25750/1995-4301-2019-3-057-065
3. Геннадиев А.Н. Нефть и окружающая среда // Вестник Московского университета. Серия 5: География. – 2016. – №6. – С. 30-39.
4. Fu J., Wang Q., Wang H., Yu H., Zhang X. Monitoring of non-destructive sampling strategies to assess the exposure of avian species in Jiangsu Province, China to heavy metals // Environmental Science and Pollution Research. – 2014. – V. 21, №4. – P. 2898-2906. DOI: 10.1007/s11356-013-2242-4
5. Mustafa A.D., Juahir H., Yunus K., Amran M.A., Hasnam C.N.C., Azaman F., Abidin I.Z., Azmee S.H., Sulaiman N.H. Oil spill related heavy metal: a review // Malaysian Journal of Analytical Sciences. – 2015. – V. 19, №6. – P. 1348-1360.
6. ГОСТ 17.5.4.01-84 Охрана природы (ССОП). Рекультивация земель. Метод определения рН водной вытяжки вскрышных и вмещающих пород. Москва, 1984.
7. Решетников М.В., Соколов Е.С., Шешнев Р.М., Мамедов Р.М. Концентрация подвижных форм тяжелых металлов в почвах поселка городского типа Степное (Саратовская область) // Экологическая химия. – 2017. – №26 (3). – С. 141-145.
8. Терехова В.А. Биотестирование почв: подходы и проблемы // Почвоведение. – 2011. №2. – С. 190-198.
9. Плешакова Е.В. Разработка нового метода определения токсичности нефтезагрязнённой почвы // Вестник СГТУ. – 2010. – №3. – С. 188-193.
10. Кузнецов А.В., Фесюн А.П., Самохвалов С.Г., Махонько Э.П. Методические указания по определению тяжелых металлов в почвах сельхозугодий и продукции растениеводства. – М.: ЦИНАО, 1992. – 61 с.
11. ГН 2.1.7.2511-09 Ориентировочно допустимые концентрации (ОДК) химических веществ в почве // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти от 23.06.2009.
12. СанПиН 42-128-4433-87 «Санитарные нормы допустимых концентраций химических веществ в почвах», утв. заместителем Главного государственного санитарного врача СССР, 30.10.88 № 4433-87.; ред. от 07.02.99. – 1999. – 25 с.

**АНАЛИЗ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ
КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ
TARAXACUM KOK-SAGHYZ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В НЕЙ ЦЕЛЕВЫХ
ВЕЩЕСТВ (КАУЧУКА И ИНУЛИНА)**

Мартиросян Л.Ю.^{1,2}, Мягкова Е.Р.², Мартиросян В.В.²

¹*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук», Москва, Россия*

²*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва, Россия*

Аннотация. В работе использовали культуру трансформированных изолированных корней «hairy roots» кок-сагыза (*Taraxacum kok-saghyz*), перспективного каучуконоса и источника инулина. Были получены данные о ростовой активности культуры трансформированных корней кок-сагыза и содержания в ней каучука и инулина в течение цикла культивирования, а также на основе этих данных получена математическая модель динамики роста биомассы.

Ключевые слова: кок-сагыз, hairy roots, трансформированные корни, натуральный каучук, инулин.

**ANALYSIS AND MATHEMATICAL MODELING OF THE CULTURE OF ISOLATED
TRANSFORMED ROOTS OF TARAXACUM KOK-SAGHYZ GROWTH ACTIVITY
AND DETERMINATION OF TARGET SUBSTANCES (NATURAL RUBBER AND
INULIN) CONTENT IN IT**

Martirosyan L. Yu.^{1,2}, Mygkova E. R.², Martirosyan V. V.²

¹*Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

²*Russian Timiryazev State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia*

Abstract. The culture of transformed isolated "hairy roots" of promising rubber-producing plant and source of inulin, *Taraxacum kok-saghyz*, was used in this research. Data on the culture of transformed roots of *T. kok-saghyz* growth activity and the content of natural rubber and inulin in it during the cultivation cycle were received along with mathematical model of the biomass growth dynamics on the basis of these data.

Keywords: taraxacum kok-saghyz, hairy roots, transformed roots, natural rubber, inulin.

Введение

Натуральный каучук является уникальным биополимером, который не может быть полностью заменен синтетическими аналогами в большинстве сфер использования, и поэтому имеет огромное экономическое значение [1, 2]. Однако мировое производство натурального каучука переживает кризис. В результате гибели от болезней большей части плантаций гевеи бразильской (*Hevea brasiliensis*), единственного промышленно выращиваемого каучуконоса, на Американском континенте и риска возникновения схожих проблем на южно-азиатских плантациях, встал вопрос о необходимости поиска альтернативных источников натурального каучука [2]. Одуванчик кок-сагыз (*Taraxacum kok-saghyz*), произрастающий на территории Казахстана, является перспективной альтернативой, так как в его корневой системе синтезируются и накапливаются большие количества натурального каучука, а также ценного углевода инулина [4]. В настоящее время для наработки веществ вторичного метаболизма, к которым относятся каучук и инулин, используют растения с генетически трансформированными корнями «hairy roots». Характерной особенностью таких корней является их быстрый рост и увеличенный синтез целевых продуктов на средах без добавления гормонов [3, 5]. Благодаря этому, их выращивание может существенно сократить затраты на получение растительного сырья из кок-сагыза.

Анализ ростовой активности культуры трансформированных («hairy roots») корней и содержания в ней каучука и инулина в течение цикла культивирования.

Полученная нами в ходе агробактериальной трансформации культура изолированных корней «hairy roots» выращивалась в колбах на жидкой питательной среде В5. Цикл культивирования составлял 56 суток, прирост биомассы оценивали каждые 7 суток. Для этого корни стерильно извлекали из колбы и взвешивали. На основании полученных данных был рассчитан индекс роста (I) по следующей формуле:

$$I = (X_{\text{кон}} - X_0) / X_0,$$

где $X_{\text{кон}}$ – масса конечная, X_0 – масса начальная.

Результаты измерений сырой биомассы трансформированных корней представлены в таблице 1. Индекс роста культуры трансформированных корней кок-сагыза представлен на рисунке 1.

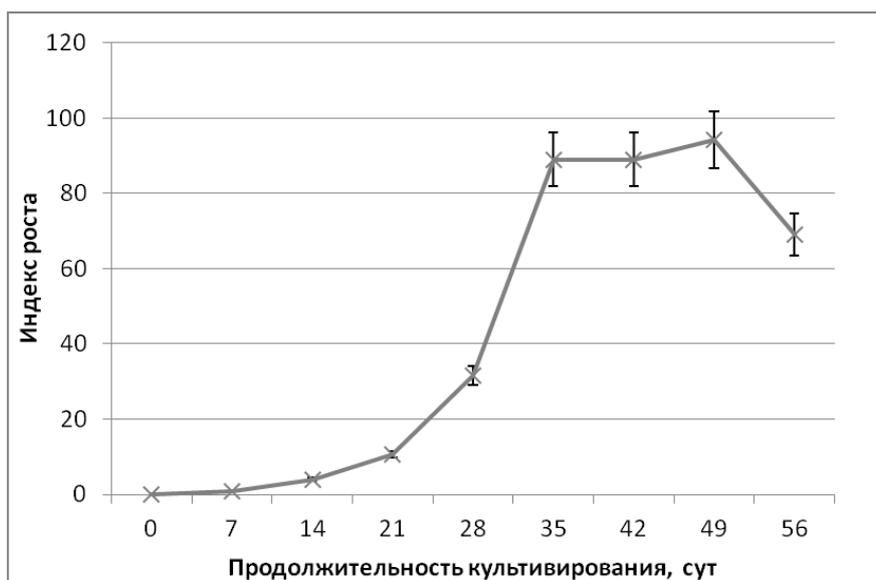


Рисунок 1 – Индекс роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 56 суток.

Полученная кривая роста имеет типичную S-образную форму. Лаг-фаза продолжалась в течение первых двух недель культивирования. Затем наступала фаза ускорения роста, которая длилась 7 суток (индекс роста от 4 до 11). После культура корней вступала в фазу экспоненциального роста, продолжавшуюся следующие 14 суток, что соответствовало резкому увеличению индекса роста с 11 до 89. Далее культура вступала в стационарную фазу роста, длившуюся 14 суток. На этой стадии индекс роста был максимальным и составил 89–94. После трансформированные корни переходили на стадию деградации, индекс роста за 7 суток падал до 69. Сокращение биомассы культуры в конце цикла выращивания является нормальным явлением, связанным с прохождением литических процессов.

Результаты анализа содержания каучука и инулина в трансформированных корнях кок-сагыза в течение цикла культивирования представлены в таблице.

Таблица – Характеристики роста и накопления каучука и инулина в процессе культивирования трансформированных корней кок-сагыза

Продолжительность культивирования, сутки	Вес сырой биомассы, г	Каучук, %	Инулин, %
0	0,5±0,01	–	–
7	0,95±0,10	5,50 ± 0,4	2,3±0,2
14	2,53±0,21	5,9±1,0	3,8±0,3
21	5,79±0,34	7,3±1,8	5,40 ± 0,4
28	16,24±0,98	9,0±1,0	10,5±0,7
35	44,95±1,02	12,5±1,6	13,9±0,5
42	45,0±1,53	12,8 ± 1,1	14,1 ± 1,1

Динамика накопления каучука и инулина в процессе культивирования трансформированных корней кок-сагыза представлены на рисунках 2 и 3 соответственно. Полученные кривые содержания каучука и инулина в процессе роста корней имеют куполообразные формы.

В фазе экспоненциального ускорения роста трансформированных корней с 14 по 28 сутки удельное содержание каучука и инулина возрастает в 1,52 и 2,76 раза, соответственно. Затем с 28 по 35 сутки накопление каучука и инулина возрастает дополнительно и достигает 12,5% и 13,9%, соответственно. Далее в стационарной фазе роста корней с 35 по 49 сутки накопление каучука не наблюдали, а содержание инулина было максимальным и составило 14,6%. Затем, с 49 по 56 сутки, трансформированные корни переходили в стадию деградации. В результате аутолитических процессов ткани корня начинают разрушаться, и запасные вещества переходят в жидкую среду для культивирования корней. При этом в корнях наблюдается падение содержания и каучука до 5,8% и инулина до 8,7%.

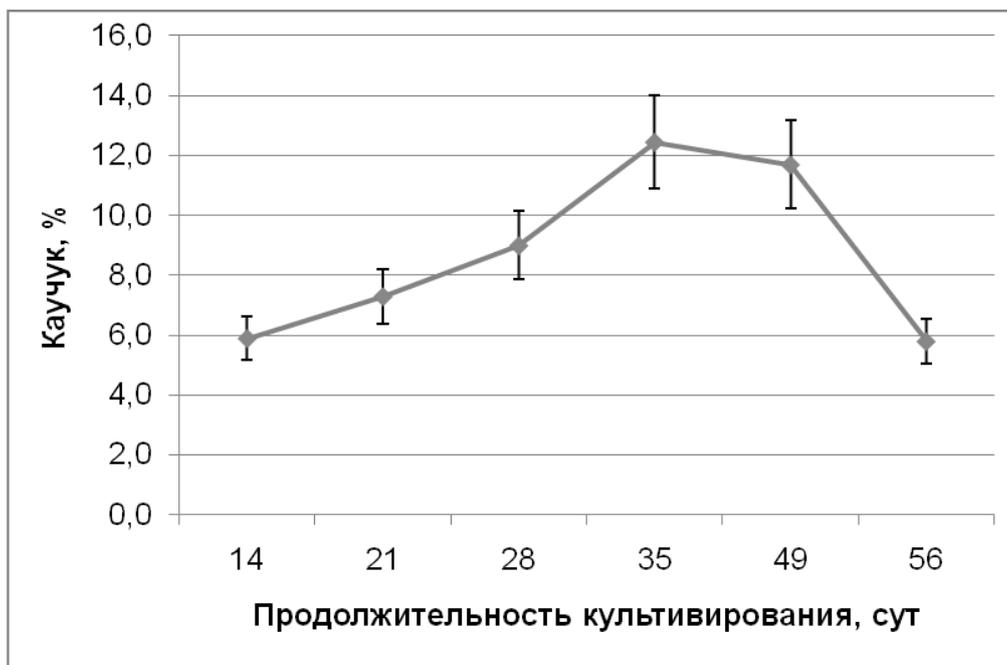


Рисунок 2 – Динамика изменения удельного содержания каучука в процессе роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 56 суток.

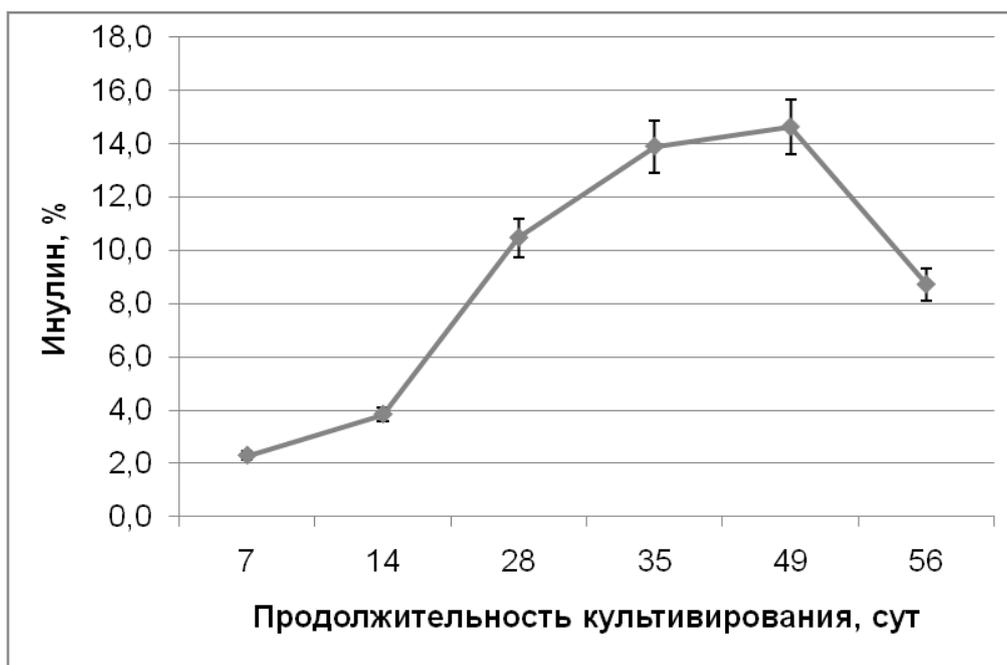


Рисунок 3 – Динамика изменения удельного содержания инулина в процессе роста трансформированных корней кок-сагыза при культивировании в течение 56 суток.

Таким образом, трансформированные корни кок-сагыза при культивировании в колбах за 35-49 суток накапливают биомассу в 89 раз большую, по сравнению с исходным корнем и накапливают каучук и инулин до 12,5% и 14,6 %, соответственно.

Анализ динамики роста биомассы растений кок-сагыза и математическое моделирование биопроцесса. Кинетическая кривая роста трансформированных корней кок-сагыза

представлена на рисунке 4. Как показал анализ этой кинетической кривой первая ее часть, вплоть до 35 суток хорошо описывается экспоненциальной функцией (рис. 5).

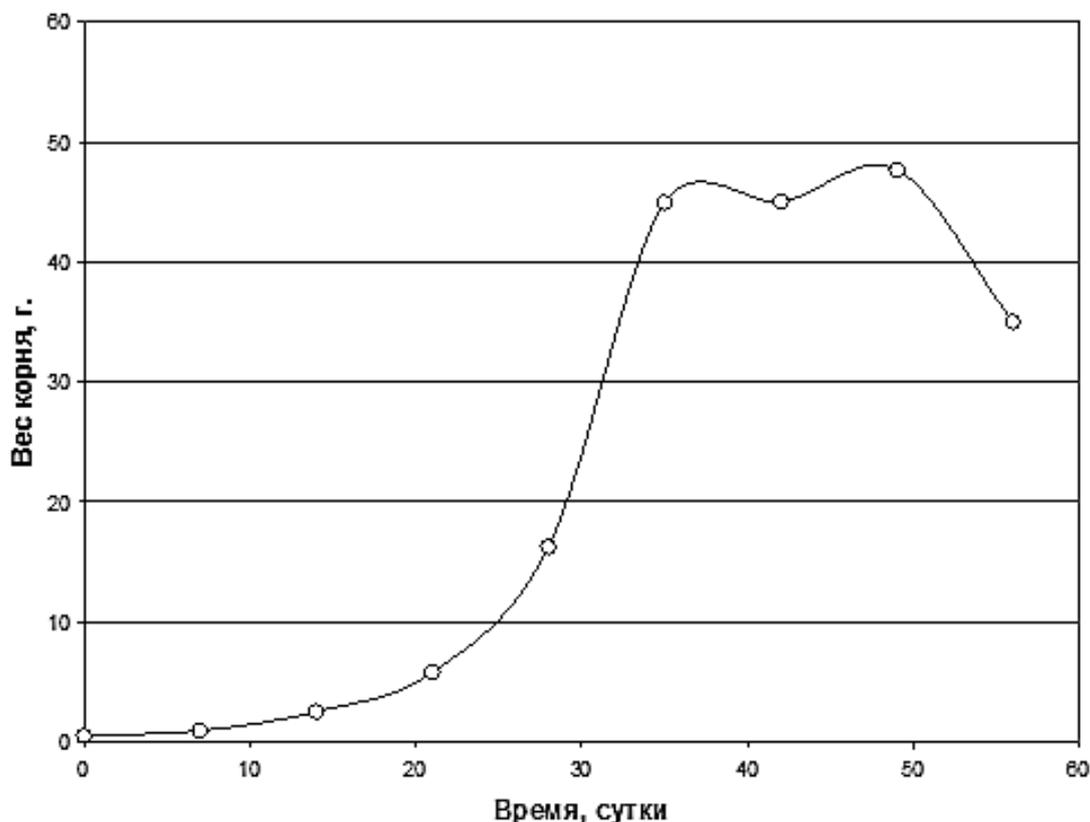


Рисунок 4 – Кинетика роста массы сырых трансформированных корней кок-сагыза.

Однако конечная часть кинетической кривой на рисунке 4 свидетельствует о нарастании процесса гибели клеток корня, что свидетельствует о: 1) прогрессирующей некомпетентности, т. е. неспособности части клеток к размножению; 2) апоптозе. По первой модели процесс роста развивается по экспоненте, показатель которой просто уменьшается на соответствующий коэффициент. В случае же апоптоза, скорость гибели клеток предполагается пропорциональной их концентрации.

По мере роста корней увеличивается и скорость их отмирания. Этот процесс описывается законом первого порядка, и общая кинетическая кривая должна линеаризироваться двойной логарифмической функцией, в которую входит еще и время. На рисунке 6 показано преобразование конечной части кинетической кривой роста массы трансформированных корней кок-сагыза.

Как видно, линейное преобразование в координатах модели запрограммированного отказа имеет отрицательный наклон. Величина этого наклона является константой скорости гибели клеток. Она может давать ценную информацию по жизнеспособности растения в условиях переменного воздействия на него различных внешних параметров – света, полива, стимуляторов роста и т.п.

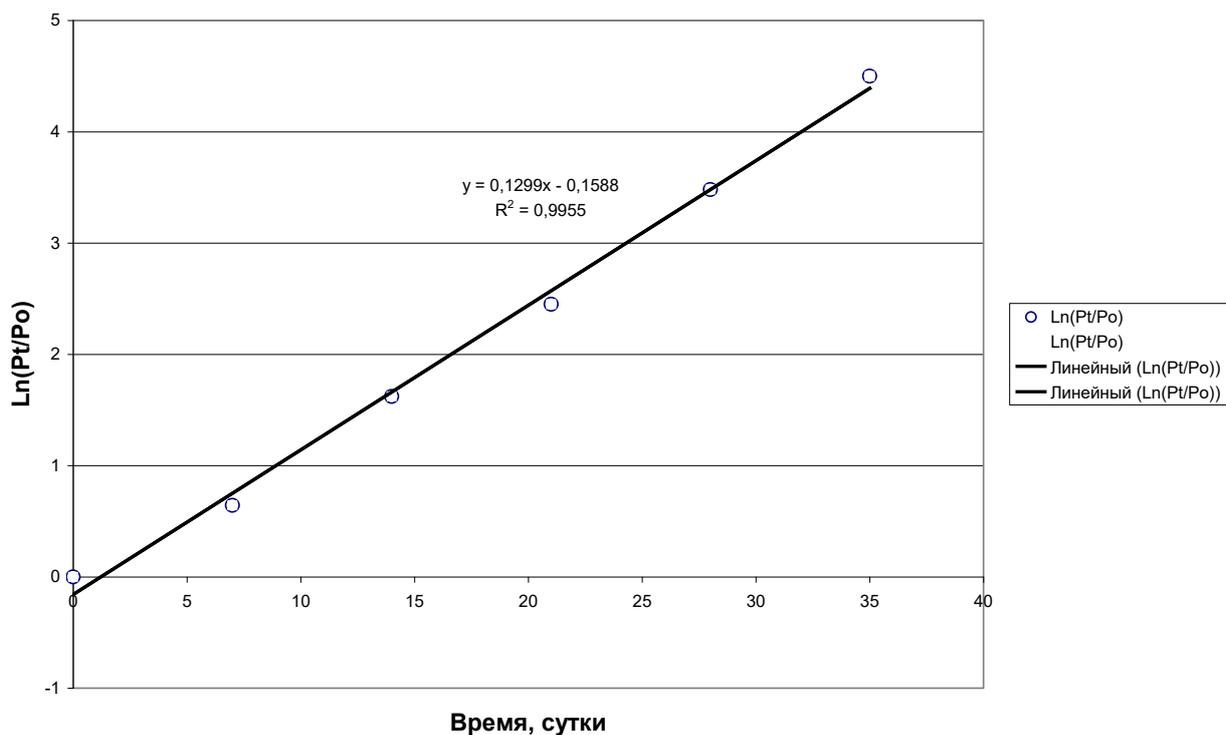


Рисунок 5 – Полулогарифмическое преобразование начальной части кинетической кривой роста трансформированных корней кок-сагыза. Величины массы корней нормированы на исходное значение массы.

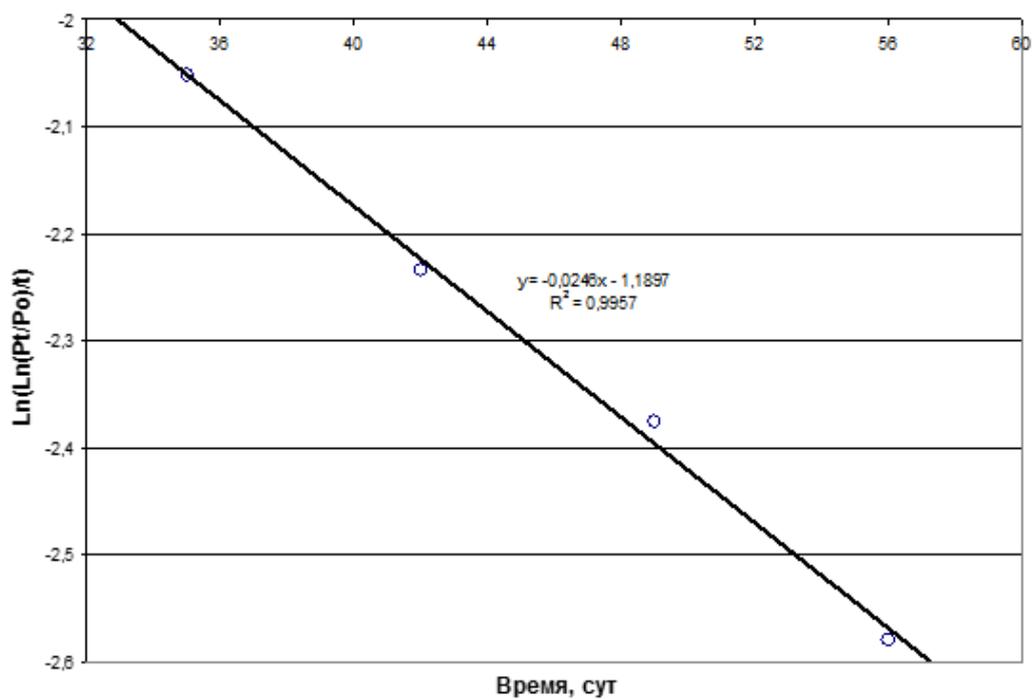


Рисунок 6 – Преобразование кинетики роста корней кок-сагыза в координатах гибели клеток по механизму апоптоза.

Выводы

Трансформированные корни кок-сагыза при культивировании в колбах за 35-49 суток накапливают биомассу в 89 раз большую, по сравнению с исходным корнем и накапливают каучук и инулин до 12,5% и 14,6 %, соответственно.

Проведенное математическое моделирование динамики роста биомассы трансформированных корней кок-сагыза показало, что гибель клеток корня происходит по механизму апоптоза. Полученная модель ценна тем, что отражает жизнеспособность культуры корней, в том числе и в условиях промышленного выращивания.

Работа поддержана грантом РФФИ, проект № 20-316-90032\20.

Библиографический список

1. Америк А. Ю. и др. *Parthenium argentatum* A. Gray, *Taraxacum kok-saghyz* L.E. Rodin и *Scorzonera tau-saghyz* Lipsch. et Bosse Альтернативные источники натурального каучука: нужны ли они нам? // *Сельскохозяйственная биология*. 2022. Т. 57. № 1. С. 3-26.
2. Cornish K. Alternative natural rubber crops: why should we care? // *Technology & Innovation*. 2017. Т. 18. №. 4. P. 244-255.
3. Rangslang R.K., Liu Z., Lütken H. et al. *Agrobacterium* spp. genes and ORFs: Mechanisms and applications in plant science // *Ciência e Agrotecnologia*. 2018. Vo1. 42. P. 453-463.
4. Salehi M. et al. Natural rubber-producing sources, systems, and perspectives for breeding and biotechnology studies of *Taraxacum kok-saghyz* // *Industrial Crops and Products*. 2021. Т. 170. P. 113667.
5. Zhang Y. et al. Rapid and hormone-free *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation in rubber producing dandelions *Taraxacum kok-saghyz* and *T. brevicorniculatum* // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – Т. 66. – С. 110-118.

ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ СОЛЕННЫХ ВОД НА КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ ТАЕЖНО-ЛЕСНОЙ ЗОНЫ ПРИКАМЬЯ

Пахоруков И. В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Обследованы вторично засоленные аллювиальные почвы, формирующиеся в долинах малых рек Прикамья. Под воздействием минерализованных техногенных вод с нейтральным составом солей формируются вторично засоленные аллювиальные почвы, обладающие сильнокислой и щелочной реакцией почвенной среды.

Ключевые слова: вторичное засоление, аллювиальные почвы, кислотно-основные свойства.

INFLUENCE OF TECHNOGENIC SALT WATERS ON ACID-BASE PROPERTIES OF ALLUVIAL SOILS OF THE TAIGA-FOREST ZONE OF THE KAMA REGION

Pakhorukov I.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The second saline alluvial soils formed in the valleys of small rivers of the Kama region were examined. Under the influence of mineralized man-made waters with a neutral salt composition, secondary saline alluvial soils with a strongly acidic and alkaline reaction of the soil environment are formed.

Keywords: secondary salinization, alluvial soils, acid-base properties.

Засоленные почвы распространены на всех континентах, они встречаются в 100 странах мира и практически во всех природных зонах, но господствуют в зонах степей, полупустынь и пустынь. Большинство исследователей к засоленным относят почвы, в жидкой и твердой фазах которых содержатся легкорастворимые соли в количестве, снижающем плодородие почв, отрицательно влияющем на рост и развитие растений – негалофитов [1, 2, 3].

Тема влияния естественного засоления на почву хорошо изучена и отражена в монографиях и учебных пособиях, в то время как работ по техногенному засолению почв сравнительно немного. Большинство работ посвящено солевому загрязнению при нефтедобыче [4, 5], проблемам применения антигололедных покрытий [6, 7, 8, 9]. Вторичное засоление почв также связано с производством солей, в частности соды [10, 11].

В природных условиях накопление солей в почвах возможно лишь в том случае, если испаряемость преобладает над количеством осадков, что соответствует условиям аридного климата. Специфика техногенного засоления заключается в том, что оно проявляется в почвах гумидных территорий. При этом накопление солей определяется не только их высокой концентрацией в загрязнителях, но и систематическим поступлением высокоминерализованных вод в ландшафт и слабой дренированностью территории.

Легкорастворимые соли, попадая в почву, способны изменить ее свойства. Сумма поглощенных катионов возрастает в 1,3-1,5 раза; почвенная щелочность может увеличиваться до 7,8-8,3. В почвенно-поглощающий комплекс (ППК) внедряются ионы натрия, происходит активное вытеснение обменных ионов водорода и алюминия [12, 13].

В Пермском крае, в связи с добычей калийных солей, происходит накопление большого количества отходов. При складировании, содержащиеся в этих отходах легкорастворимые техногенные соли, растворяются атмосферными осадками и принимают участие в формировании грунтового стока. В долинах малых рек Прикамья из-за разгрузки высокоминерализованных грунтовых вод развивается вторичное засоление аллювиальных почв. Цель исследований – изучение физико-химических и химических свойств аллювиальных солончаковых почв в поймах рек Ленва и Черная.

В пробах почв определяли рН водной и солевой вытяжки – потенциометрическим методом; гидролитическую кислотность – по Капену; емкость катионного обмена (ЕКО) рассчитали по сумме оснований и гидролитической кислотности. Сумму солей и токсичные соли – расчетным методом.

В России пойменные земли занимают около 42 млн га. Отличительными особенностями аллювиальных почв таежно-лесной зоны являются: серо-бурый цвет, кислая и слабокислая реакция среды, ненасыщенность основаниями, фульватный состав, большая профильная и пространственная динамичность свойств, а также неоднородный минералогический состав, формирующийся водосборной питающей провинцией [14].

Как правило, природные засоленные почвы обладают нейтральной или щелочной реакцией среды и насыщены основаниями [3]. Техногенные минерализованные воды, поступающие от источников засоления, имеют 6,8 рН и характеризуются нейтральным составом солей [15]. Под их воздействием сформировались почвы, содержащие с поверхности легкорастворимые соли в количестве от 0,14 до 39%. Часть этих почв характеризовалась нейтральной и слабощелочной реакцией почвенной среды, однако нередко встречались ненасыщенные основаниями, кислые и резкокислые засоленные почвы (таблица).

Таблица – Физико-химические и химические свойства вторично засоленных почв в поймах рек Ленва и Черная

Глубина, см	рН _{вод}	рН _{сол}	Н ⁺ +Аl ³⁺ , % от ЕКО	%	
				Сумма солей	Токсичные соли
Солончак вторичный (соровый), разрез 1, Ленва					
0-3	5,9	5,8	13,6	39,00	27,23
3-15	6,7	6,7	6,2	24,80	17,23
45-55	5,8	5,8	-	17,80	10,18
Аллювиальная гумусовая глееватая почва, разрез 2, Ленва					
5-15	4,7	5,4	-	0,50	0,34
20-30	4,5	4,5	29,5	0,30	0,17
32-42	5,0	4,8	-	0,40	0,23
50-60	4,2	4,0	-	0,60	0,38
70-80	4,7	4,7	-	1,40	0,90
95-105	5,2	5,2	-	1,10	0,75

Таблица (окончание)

Глубина, см	pH _{вод}		pH _{сол}	H ⁺ +Al ³⁺ , % от ЕКО	%	
					Сумма солей	Сумма солей
Солончак вторичный, разрез 3, Ленва						
9-19	7,2		6,8	0	1,20	1,10
25-35	6,8		6,6	0	1,90	1,79
45-55	6,5		6,4	0	2,60	2,39
63-73	6,4		6,3	0	2,40	2,19
Аллювиальная гумусовая глееватая почва, разрез 4, Ленва						
5-15	3,0		2,8	27,1	0,90	0,49
20-30	2,8		2,6	26,9	1,20	0,90
40-50	3,4		3,2	25,7	1,20	0,89
55-65	3,3		3,0	19,2	1,04	0,75
74-84	3,3		3,2	-	1,40	1,06
Аллювиальная гумусовая глееватая почва, разрез 5, Ленва						
10-20	6,5		6,4	0	0,60	0,50
21-31	5,9		5,8	0,7	1,05	0,89
35-45	6,5		6,2	0	1,90	1,62
59-69	6,9		6,8	0	1,70	1,50
Аллювиальная серогумусовая глееватая почва, разрез 1, Черная						
0-9	7,2		7,1	0	0,90	0,79
15-25	7,6		7,6	0	0,92	0,86
35-45	6,2		6,0	14,1	3,30	3,02
50-60	5,9		5,6	16,9	3,34	3,18
70-80	6,7		6,4	8,0	1,58	1,47
85-95	6,4		6,3	10,1	2,46	2,28
Аллювиальная серогумусовая глееватая почва, разрез 2, Черная						
3-13	7,1		6,8	0	0,14	0,10
16-26	8,0		7,6	0	0,66	0,59
35-45	7,2		7,2	0	1,88	1,40
Аллювиальная серогумусовая глееватая почва, разрез 3, Черная						
2-12	7,9		7,8	0	0,96	0,85
20-30	7,8		7,7	0	1,50	1,41
40-50	7,6		7,6	0	1,46	1,34

Примечания: (-) – данные отсутствуют.

Как известно, реакция почвы зависит от совокупного действия ряда факторов: химического и минералогического состава минеральной части почвы, наличия свободных солей, содержания и качества органического вещества, состава почвенного воздуха, влажности почвы, жизнедеятельности организмов. По-видимому, изначально все варианты аллювиальных почв обладали слабокислой и кислой реакцией почвенной среды, но под воздействием высокоминерализованных техногенных вод образовались щелочные и сильнокислые почвы.

Аллювиальные почвы таежно-лесной зоны не насыщены основаниями, взаимодействие минерализованных вод с почвой может приводить к вытеснению обменного H⁺ и Al³⁺ и подкислению почвенных растворов. Эффект подкисления почв при воздействии минерализованных вод уже отмечался в работах Н.П. Солнцевой [12] и Т.В. Ронжиной [16] (2011).

При модельном засолении дерново-подзолистых почв Калининградской области, проведенных Т.В. Ронжиной [16], отмечается подкисление почвенного раствора в первые недели после эксперимента (с 4,5 до 3,5), через один год рН повысился до 6,0 единиц. В связи с этим, не исключаем, что в долинах малых рек Прикамья засоленные разности почв, характеризующиеся кислой и резкокислой реакцией почвенной среды, образуются на начальных стадиях техногенного засоления, а нейтральные и слабощелочные варианты почв испытывают вторичное засоление продолжительное время.

Таким образом, под воздействием минерализованных вод в аллювиальных почвах происходят глубокие изменения состава обменных катионов, что приводит к формированию сильнокислых и щелочных солончаковых почв.

Библиографический список

1. Почвоведение: в 2 ч. М.: Высш. шк., 1988. Ч 2: Типы почв, их география и использование / под ред. В. А. Ковды, Б. Г. Розанова. 368 с.
2. Панкова Е.И., Айдаров И.П., Ямнова И.А., Новикова А.Ф., Благоволин Н.С. Природное и антропогенное засоление почв бассейна Аральского моря (география, генезис, эволюция). М.: Почв. ин-т им. В.В. Докучаева, 1996. 186 с.
3. Засоленные почвы России / Отв. редакторы Л.Л. Шишов, Е.И. Панкова. М.: ИКЦ “Академкнига”, 2006. 854 с.
4. Соромотин А.В, Гашева С.Н., Казанцева М.Н. Солевое загрязнение таежных биоценозов при нефтедобыче // Проблемы географии и экологии Западной Сибири. Тюмень: ТГУ, 1996. 121–130 с.
5. Ронжина Т.В. Техногенная трансформация дерново-подзолистых почв в районах добычи углеводородного сырья при разливе сточных вод // Естественные и технические науки. 2009. № 6. С. 452–454.
6. Москвина Н.В. Почвы и техногенные поверхностные образования многоэтажных жилых районов городов Прикамья: дис. ... канд. биол. наук. Пермь, 2004. 213 с.
7. Никифорова Е. М., Касимов Н. С., Кошелева Н. Е. Многолетняя динамика антропогенной солонцеватости почв ВАО Москвы при использовании противогололедных реагентов // Почвоведение. 2017, № 1. С. 93–104.
8. Азовцева Н.А., Смагин А.В. Динамика физических и физико-химических свойств городских почв при использовании солевых противогололедных средств // Почвоведение. 2018. № 1. С. 118–128.
9. Ramakrishna D., Viraraghavan T. Environmental impact of chemical deicers – a review // Water Air Soil Pollut. 2005. Vol. 166. P. 49–63.
10. Grunewald G., Kaiser K., Jahn R. Alteration of secondary minerals along a time series in young alkaline soils derived from carbonatic wastes of soda production // Catena. 2007. Vol. 71(3). P. 487–496.
11. Hulisz P., Charzyński P., Giani L. Application of the WRB classification to salt-affected soils in Poland and Germany // Polish Journal of Soil Science. 2010. Vol. 43(1). P. 81–92.
12. Солнцева Н.П. Добыча нефти и геохимия природных ландшафтов. М.: изд-во МГУ, 1998. 367 с.
13. Антропогенные почвы: генезис, география, рекультивация /М.И. Герасимова и др./ под ред. Г.В. Добровольского. Смоленск: Ойкумена, 2003. 268 с.

14. Добровольский Г. В., Балабко П. Н., Стасюк Н. В., Быкова Е. П. Аллювиальные почвы речных пойм и дельт и их зональные отличия // Аридные экосистемы. 2011. Т. 17, № 3 (48). С. 5-12.
15. Eremchenko O. Z., Pakhorukov I. V., Shestakov I. E. Development of the Solonchak Process in Soils of Small River Valleys in the Taiga-Forest Zone in Relation to the Production of Potassium Salts // Eurasian Soil Science. 2020. Vol. 53, No. 4. P. 512–522.
16. Ронжина Т.В. Геохимическая трансформация дерново-подзолистых почв Калининградской области при разливах минерализованных вод: автореф. дис. канд. геогр. наук. Москва, 2011. 23 с.

СОСТОЯНИЕ ПОЧВ И РАСТИТЕЛЬНОСТИ НА ТЕРРИТОРИИ, РЕКУЛЬТИВИРОВАННОЙ ПОСЛЕ НЕФТЕРАЗЛИВА

Ратегов Н.Е., Ушаков В.Ю., Ефимик Е.Г.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Проведено состояние почвенного покрова и растительности территории, рекультивированной после нефтеразлива в период 2018 – 2020 гг.

Ключевые слова: нефтезагрязнения, рекультивация, качественный и количественный состав сосудистых растений на рекультивируемом участке в месте разлива нефтепродуктов.

STATE OF SOILS AND VEGETATION ON THE TERRITORY RECURED AFTER AN OIL SPILL

Rategov N.E., Ushakov V.Y., Efimik E.G.

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National
Research University, Perm, Russia.*

Annotation. The state of the soil cover and vegetation of the territory reclaimed after the oil spill in the period 2018-2020 was carried out.

Keywords: oil pollution, reclamation, qualitative and quantitative composition of vascular plants in the recultivated area at the site of an oil spill.

Отрицательное воздействие нефти и нефтепродуктов на окружающую среду общеизвестно и при нарушении природоохранного законодательства приводит к изменению состава почв, загрязнению поверхностных и подземных вод, атмосферы. Загрязнение почвы нефтью и нефтепродуктами является одним из наиболее распространенных загрязнителей окружающей среды антропогенного происхождения. В процессе нефтедобычи на месторождениях, при транспортировке нефти неизбежно происходят ее разливы, ведущие к нарушению экологического равновесия и функционирования природных экосистем. Цель работы - оценить состояние почв и растительности на территории, рекультивированной после нефтеразлива. [1]

Рекультивация земель сельскохозяйственного назначения идет медленно. Поэтому на правительственном уровне принято решение считать рекультивацию по ГОСТу 17.5.1.01-83, как «комплекс мероприятий, направленных на восстановление продуктивности и хозяйственной ценности нарушенных земель, а также на улучшение условий окружающей среды». Рекультивацию земель выполняют в два этапа: технический и биологический. Технический этап рекультивации земель, включающий их подготовку для последующего целевого использования в народном хозяйстве. Биологический этап рекультивации земель,

включающий комплекс агротехнических и фитомелиоративных мероприятий по восстановлению плодородия нарушенных земель [2,3]

Цель работы - оценить состояние почв и растительности на территории, рекультивированной после нефтеразлива.

Материалы и методы исследования. Материал для исследования был отобран на месте проведения работ по рекультивации земель, ранее загрязненных нефтесодержащей жидкостью. В 2018 г. в пределах центральной части Пермского края произошел разлив нефти на площади около 0,8 га. В ходе технической рекультивации нефтезагрязненная почва из слоя мощностью 0,5 м была вывезена на обезвреживание специализированной организацией, на ее место привезен минеральный грунт. Территория участка до разлива нефти могла быть использована под пастбища и сенокосы. Нефтезагрязненный участок расположен на землях сельскохозяйственного назначения в ареале дерново-подзолистых почв. Методом конверта было отобрано 5 смешанных проб с глубины 0-20 см. А также 5 проб взяты в понижении рельефа относительно рекультивированного участка. Потенциометрическим методом определен рН исследуемых образцов на основе водной и солевой (KCl) суспензий для определения актуальной и обменной кислотности почвогрунтов с места разлива нефтесодержащей жидкости. Кислотность почвенных проб определялась с помощью иономера. Определение проб почв на содержание нефтепродуктов осуществлял филиал «Центр лабораторного анализа и технических измерений по Пермскому краю».

Методика измерений ПНД Ф 16.1:2.2.2.3:3.64-10. Определение массовой доли нефтепродуктов основано на их экстракции из образца воздушносухой пробы хлороформом, отделении от полярных соединений методом колоночной хроматографии после замены растворителя на гексан и количественном определении гравиметрическим методом. Обследование качественного и количественного состава сосудистых растений на рекультивированном участке в месте разлива нефтепродуктов проводилось нами в августе 2020 г.

Полевое обследование флористического состава проводилось на пробной площади по общепринятым методикам. Гербарный материал был собран, высушен и заэтикетирован. Видовой состав растений определялся как непосредственно на местности, так и в дальнейшем в камеральных условиях на базе кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ. При определении использовались региональные определители [4]. Для выяснения степени восстановления фитоценоза также была заложена пробная площадь на фоновом участке, на близлежащем участке залежей. Для сравнения видového состава использовался коэффициент сходства видového состава Жаккара:

$$J = N_{AuB} / N_A + N_B - N_{AuB},$$

где N_{AuB} – число видов, общее для двух сравниваемых описаний

(площадок), N_A , N_B – число видов соответственно в описаниях А и В.

Результаты. Видовой состав сосудистых растений двух пробных площадок представлен в таблице 1. Номенклатура и объем видов приняты по «Иллюстрированному определителю растений Пермского края» (2007).

Таблица 1 – Список видов сосудистых растений на рекультивированном (№1)
и фоновом (№2) участках

№	Вид растения	Уч. №1	Уч. №2
1	<i>Deschampsia cespitosa</i> (L.) Beauv. – Щучка дернистая	+	+
2	<i>Digraphis arundinacea</i> (L.) Trin. – Двуклосточник тростниковидный	+	+
3	<i>Agrostis tenuis</i> Sibth. – Полевица тонкая	+	+
4	<i>Trifolium hybridum</i> L. – Клевер гибридный	+	+
5	<i>Melilotus albus</i> Medik – Донник белый	+	
6	<i>Phleum pratense</i> L. – Тимофеевка луговая	+	+
7	<i>Agropyron repens</i> (L.) Beauv. – Пырей ползучий	+	
8	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud. – Тростник обыкновенный	+	+
9	<i>Poa pratensis</i> L. – Мятлик луговой	+	+
10	<i>Plantago major</i> L. – Подорожник большой	+	
11	<i>Cirsium setosum</i> (Willd.) Bess. – Бодяк щетинистый	+	
12	<i>Epilobium montanum</i> L. – Кипрей горный	+	+
13	<i>Cirsium arvense</i> (L.) Scop. – Бодяк полевой	+	+
14	<i>Trifolium medium</i> L. – Клевер средний	+	+
15	<i>Rumex crispus</i> L. – Щавель курчавый	+	+
16	<i>Lepidotheca suaveolens</i> (Pursh) Nutt. – Лепидотека пахучая	+	
17	<i>Ranunculus repens</i> L. – Лютик ползучий	+	
18	<i>Tripleurospermum inodorum</i> (L.) Sch. Bip. – Трехреберник непахучий	+	+
19	<i>Carduus crispus</i> L. – Чертополох курчавый	+	+
20	<i>Artemisia vulgaris</i> L. – Полынь обыкновенная	+	+
21	<i>Leucanthemum vulgare</i> Lam. – Нивяник обыкновенный	+	
22	<i>Pastinaca sylvestris</i> Mill. – Пастернак лесной	+	+
23	<i>Typha latifolia</i> L. – Рогоз широколистный	+	+
24	<i>Picris hieracioides</i> L. – Горчак ястребинковый	+	+
25	<i>Medicago lupulina</i> L. – Люцерна хмелевидная	+	
26	<i>Taraxacum officinale</i> Wigg. – Одуванчик лекарственный	+	
27	<i>Chenopodium album</i> L. – Марь белая	+	
28	<i>Tussilago farfara</i> L. – Мать-и-мачеха обыкновенная	+	
29	<i>Vicia cracca</i> L. – Горошек мышиный	+	+
30	<i>Scirpus sylvaticus</i> L. – Камыш лесной	+	+
31	<i>Linaria vulgaris</i> Mill. – Лянка обыкновенная	+	+
32	<i>Sonchus arvensis</i> L. – Осот полевой	+	
33	<i>Galium aparine</i> L. – Подмареник цепкий	+	
34	Донник лекарственный	+	+
35	<i>Lathyrus pratensis</i> L. – Чина луговая	+	+
36	<i>Potentilla norvegica</i> L. – Лапчатка норвежская	+	
37	<i>Achillea millefolium</i> L. – Тысячелистник обыкновенный	+	+
38	<i>Juncus articulatus</i> L. – Ситник членистый	+	
39	<i>Juncus compressus</i> Jacq. – Ситник сплюснутый	+	
40	<i>Rorippa palustris</i> (L.) Bess. – Жерушник болотный	+	
41	<i>Dactylis glomerata</i> L. – Ежа сборная	+	+
42	<i>Alisma plantago-aquatica</i> L. – Частуха подорожниковая	+	

Таблица 1 (окончание)

№	Вид растения	Уч. №1	Уч. №2
43	<i>Galega orientalis</i> Lam. – Козлятник восточный	+	
44	<i>Equisetum palustre</i> L. – Хвощ болотный	+	+
45	<i>Myosotis arvensis</i> (L.) Hill. – Незабудка полевая	+	+
46	<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke – Смолевка обыкновенная	+	
47	<i>Odontites vulgaris</i> Moench – Зубчатка обыкновенная	+	+
48	<i>Heracleum sosnowskyi</i> Manden. – Борщевик Сосновского	+	+
49	<i>Arctium tomentosum</i> Mill. – Лопух паутинистый	+	+
50	<i>Tanacetum vulgare</i> L. – Пижма обыкновенная	+	
51	<i>Vaeronica scutellata</i> L. – Вероника щитковая	+	+
52	<i>Filipendula ulmaria</i> (L.) Maxim. – Лабазник вязолистный		+
53	<i>Calamagrostis epigeios</i> (L.) Roth. – Вейник наземный		+
54	<i>Calamagrostis</i> sp. – Вейник		+
55	<i>Carex vesicaria</i> L. – Осока пузырчатая		+
56	<i>Epilobium hirsutum</i> L. – Кипрей волосистый		+
57	<i>Stachys palustris</i> L. – Чистец болотный		+
58	<i>Galium mollugo</i> L. – Подмареник мягкий		+
59	<i>Urtica dioica</i> L. – Крапива двудомная		+
60	<i>Bromus inermis</i> Leyss. – Костер безостый		+
61	<i>Galeopsis tetrachit</i> L. – Пикульник обыкновенный		+
62	<i>Ranunculus acris</i> L. – Лютик едкий		+
63	<i>Festuca pratensis</i> Huds. – Овсяница луговая		+
64	<i>Stellaria graminea</i> L. – Звездчатка злаковая		+
65	<i>Geum rivale</i> L. – Гравилат речной		+
66	<i>Aegopodium podagraria</i> L. – Сныть обыкновенная		+
67	<i>Vicia sepium</i> L. – Горошек заборный		+
68	<i>Scrophularia nodosa</i> L. – Норичник шишковатый		+
69	<i>Angelica sylvestris</i> L. – Дудник лесной		+
70	<i>Cirsium oleraceum</i> (L.) Scop. – Бодяк огородный		+
71	<i>Carex acuta</i> L. – Осока острая		+
72	<i>Hypericum perforatum</i> L. – Зверобой продырявленный		+
73	<i>Campanula patula</i> L. – Колокольчик раскидистый		+
74	<i>Polemonium coeruleum</i> L. – Синюха голубая		+
75	<i>Centaurea phrygia</i> L. – Василек фригийский		+
76	<i>Veronica longifolia</i> L. – Вероника длиннолистная		+
77	<i>Alchemilla vulgaris</i> L. – Манжетка обыкновенная		+
78	<i>Potentilla anserina</i> L. – Лапчатка гусиная		+
79	<i>Succisa pratensis</i> Moench – Сивец луговой		+
	ИТОГО	51	57

При сравнении качественного состава выявлены некоторые различия по видовому составу, коэффициент сходства обследованных участков составляет 0,38 (30 видов одинаковы для 1 и 2 участков). Коэффициент сходства высокий, разница связана с вышеизложенными причинами, а именно:

1. На рекультивированном участке использован привозной грунт, заселенный семенами растений, не характерными для окружающей территории;

2. Луговые виды из соседних биотопов проникают на рекультивированный участок довольно медленно, поскольку первоначально участок заселяется большим количеством

сорно-рудеральных видов растений, конкуренция с которыми на первых этапах формирования фитоценоза затруднена.

По результатам аналитической проработки отобранных почвенных образцов нами были сделаны следующие выводы. Актуальная кислотность в почвогрунтах с места рекультивации варьирует от нейтральной до слабощелочной (рН 7,15 – 7,91). Обменная кислотность в пределах нейтральной (рН 6,72 – 7,15). Средние показатели актуальной и обменной кислотности в почвогрунтах выше таковых для природных дерново-подзолистых почв. Результаты и интерпретация агрохимического анализа представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Агрохимические показатели рекультивированной почвы

	Глубина отбора(см)	H ₂ O(дистил.)	рН акт.	KCl	рН обм.
1 прикопка	0-20	7,765	Слабощелочная	7,150	Нейтральная
2 прикопка	0-20	7,157	Нейтральная	6,721	Нейтральная
3 прикопка	0-20	7,911	Слабощелочная	7,132	Нейтральная
4 прикопка	0-20	7,858	Слабощелочная	7,017	Нейтральная
5 прикопка	0-20	7,882	Слабощелочная	7,095	Нейтральная

Таблица 3 – Содержание остаточных нефтепродуктов в 2018 году

Год	Определяемые показатели	Методика измерений	Единицы измерения	Результаты	
				Проба №1 (фон)	Проба №2
2018	Нефтепродукты	ПНД Ф 16.1:2:2.2:2.3:3.64-10	мг/кг	83±33	>5000

Проба №1 входит в норматив содержания нефтепродуктов, по сравнению с участком, где произошёл разлив нефти. В участке №2 (загрязнённом) отмечено превышение содержания нефтепродуктов.

Таблица 4 – Содержание остаточных нефтепродуктов в 2019 году

Год	Определяемые показатели	Методика измерений	Единицы измерения	Результаты		
				Точка отбора	Проба №1 (фон)	Проба №2
2019	Нефтепродукты	ПНД Ф 16.1:2:2.2:2. 3:3.64-10	мг/кг	aI	36	58
				aII	69	60
				aIII	56	103
				aIV	467	184
				bI	57	253
				bII	40	1040
				bIII	104	1461
				bIV	108	483
				cIV	269	1043
				Среднее		

Уменьшение содержание нефтепродуктов в пробе №2 в 2019 году по сравнению с 2018 связано с проведением рекультивации. Среднее содержание в пробах №1 и №2 входит в региональный норматив содержания нефтепродуктов.

Таблица 5 – Содержание остаточных нефтепродуктов в 2020 году

Год	Определяемые показатели	Методика измерений	Единицы измерения	Результаты		
				Точка отбора	Проба №1 (фон)	Проба №2
2020	Нефтепродукты	ПНД Ф 16.1:2:2.2:2.3 :3.64-10	Мг/кг	I	73	480
				II	84	540
				III	108	380
				IV	120	430
				V	104	450
				Среднее		

Среднее содержание нефтепродуктов в пробах №1 и №2 в 2020 году уменьшилось, по сравнению с 2019 годом на 36,5 и 64 соответственно.

Заключение. Для образцов, отобранных с места рекультивации после разлива нефтепродуктов характерно изменение концентрации остатков нефтепродуктов. Так в 2018 после аварии содержание нефтепродуктов составляло >5000 мг/кг, что превышает региональный норматив. В 2019 году среднее содержание нефтепродуктов в почве составило 520 мг/кг, что что значительно меньше с предыдущим годом, связано с тем что была проведена механическая рекультивация. В 2020 году среднее содержание нефтепродуктов в почве

составило 456 мг/кг, что на 64мг/кг меньше чем в 2019 году. Актуальная кислотность в почвогрунтах с места рекультивации варьирует от нейтральной до слабощелочной (рН 7,15 – 7,91). Обменная кислотность в пределах нейтральной (рН 6,72 – 7,15).

Средние показатели актуальной и обменной кислотности в почвогрунтах выше таковых для природных дерново- подзолистых почв. Количество видов на рекультивированном участке составляет 51, на фоновом это достаточно высокий показатель для луговых фитоценозов, разница по количеству видов в данном случае незначительна. Коэффициент сходства видового состава участков высокий и составляет 0,38, что говорит о небольшой разнице в видовом составе.

Библиографический список

1. Кузнецов Ф.М., Иларионов С.А., Середин В.В., Иларионова С.Ю. Рекультивация нефтезагрязненных почв. Пермь: Изд. Пермского государственного университета, 2000. – 105 с.
2. Назаров А.В. Влияние нефтяного загрязнения почвы на растения // Вестник Пермского университета. – 2007. – Вып.5 (10). –С. 134-136.
3. Шамраев А.В., Шорина Т.С. Влияние нефти и нефтепродуктов на различные компоненты окружающей среды. // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – Вып.6 (100) – С.642 – 645.
4. Иллюстрированный определитель растений Пермского края / С.А. Овеснов, Е.Г. Ефимик, Т.В. Козьминых и др. // под ред. д-ра биол. наук С.А. Овеснова. Пермь: Кн. мир, 2007. 743 с.

ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ РЕДОКС–ПРОЦЕССОВ, СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ И РАЗВИТИЕ КРЕСС-САЛАТА

Сапцын Р.В.¹, Чудинова Н.В.¹, Еремченко О.З.¹, Баландина А.В.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия

Аннотация. При оценке почвенных загрязнений часто используют кресс-салат *Lepidium sativum* L. Исследование посвящено изучению ответной реакции кресс-салата на загрязнение почвы сырой нефтью из расчета 1, 3, 5%. При выращивании на нефтезагрязненной почве наблюдалось уменьшение высоты и длины надземной части кресс-салата, а также усиление редокс-активности. Снижение содержания белков в кресс-салате следует использовать в качестве биохимического показателя фитотоксичности нефтезагрязненной почвы.

Ключевые слова: нефтезагрязненные почвы, фитотестирование, кресс-салат.

EFFECT OF OIL CONTAMINATION ON REDOX ACTIVITY, PROTEIN CONTENT AND WATERCRESS DEVELOPMENT

Saptsyn R.V.¹, Chudinova N.V.¹, Eremchenko O.Z.¹, Balandina A.V.²

¹Perm State National Research University, Perm, Russia

²Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

Abstract. Watercress (*Lepidium sativum* L.) is often used in the assessment of soil contamination. The study is devoted to studying of the response of watercress to soil pollution with crude oil at the rate of 1, 3, 5%. When growing on oil-contaminated soil, there was a decrease in the height and length of the above-ground part of watercress, as well as an increase in the redox activity. The decrease in protein content in watercress should be used as a biochemical indicator of phytotoxicity of oil-contaminated soil.

Keywords: oil-contaminated soils, phytotesting, watercress.

В нефтегазовом комплексе России транспортировка нефти и нефтепродуктов от мест добычи и до мест потребления не исключает вероятность аварийных разливов и последующего загрязнения почвенного покрова. Негативное влияние нефтезагрязненной почвы сказывается уже на начальных этапах развития растений, подавляется рост подземных и надземных органов растений; в дальнейшем задерживается формирование генеративных органов и сроки созревания сельскохозяйственных культур [1]. На развитие и интенсивность роста растений влияют изменения почвенных условий: снижение доступа кислорода, влаги, питательных веществ и др. Исследователи отмечают разную степень устойчивости растений к нефтезагрязнению [2, 3].

В условиях нефтезагрязнения растения являются чувкими индикаторами уровня токсичности почвы [4]. При анализе почвенных загрязнений, оценке фитотоксичности почв

часто используют кресс-салат *Lepidium sativum* L. [5, 6, 7]. Считаем перспективным использование данного растения для оценки экологического состояния почв Пермского края не только при загрязнении тяжелыми металлами [8], но и при нефтезагрязнении.

Цель наших исследований – установить изменения в активности редокс-процессов, содержании белков и развитии кресс-салата на нефтезагрязненной почве.

Почву (верхний слой 0-15 см) загрязнили сырой нефтью из расчета 1, 3, 5%. В контейнеры размером 16 x 12 x 7 см в увлажненную почву посадили по 2 г семян кресс-салата. Выращивали в течение шести дней, поливали дистиллированной водой, на 7-й день провели измерения массы и длины надземной части 25-ти растений. В сырой массе растений определили редокс-активность по методу Петта-Прокашева – в 4-кратной повторности, содержание водорастворимых белков с помощью красителя амидо-черного – в 6-кратной повторности.

Данные эксперимента обработаны однофакторным дисперсионным непараметрическим методом (критерий Крускал-Уоллиса) при уровне значимости нулевой гипотезы $P < 0,05$. В рисунках приведены средние арифметические биологических повторностей и их стандартные ошибки.

На нефтезагрязненных почвах кресс-салат отличался меньшей массой и длиной надземной части растений (рис. 1). Значимое угнетение растений прослежено уже в варианте с дозой нефти 1%, по сравнению с контролем. Растения в вариантах с почвой, загрязненной 3 и 5 % нефти, не отличались по массе и длине.

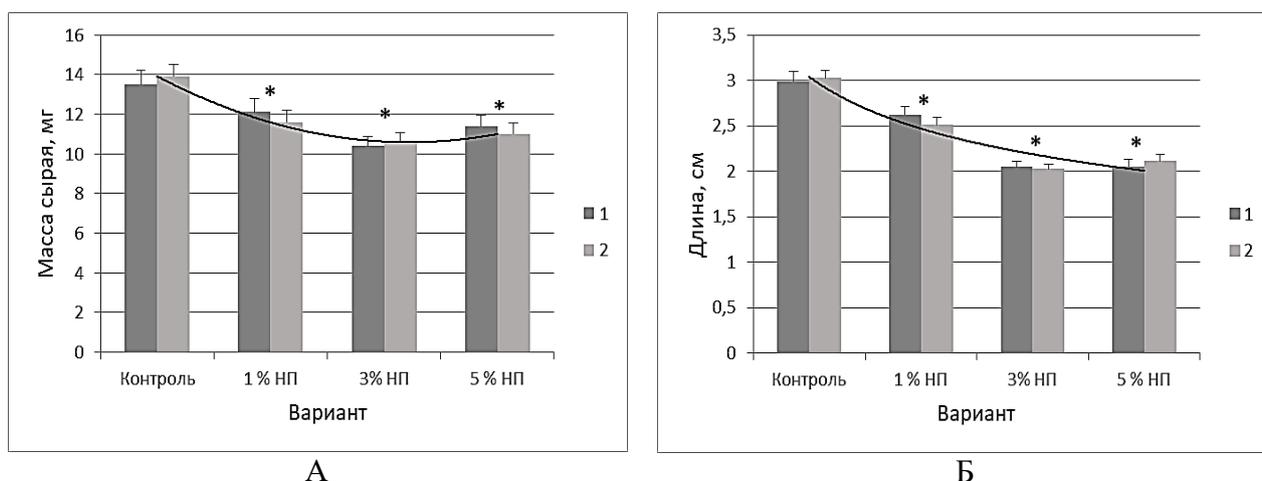


Рисунок 1 – Изменение массы (а, мг сырой массы) и длины (б, см) надземной части кресс-салата на нефтезагрязненной почве, * – значимые различия с контролем при уровне значимости $P < 0,05$.

Известно, что неблагоприятные факторы корневой среды вызывают в растениях развитие окислительного стресса [9]. Ранее установлено повышение редокс-активности кресс-салата в ответ на подкисление, засоление, подщелачивание и загрязнение тяжелыми металлами почв Пермского края [8]. В кресс-салате, выращенном на нефтезагрязненной почве, отмечали изменение редокс-активности; при этом в варианте с 1 и 3% нефти в растениях наблюдали небольшое снижение этого биохимического показателя (рис. 2, А).

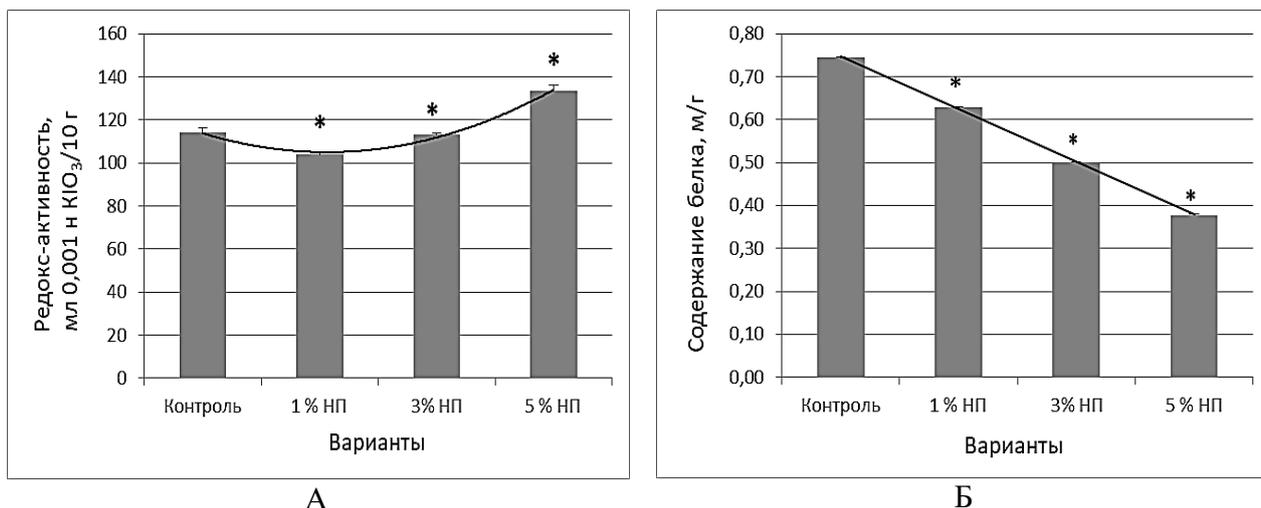


Рисунок 2 - Изменение редокс-активности (А, мг/г сырой массы) и содержания белков (Б, мл 0,001 н КЮ₃/10 г сырой массы) в кресс-салате * – значимые различия с контролем при уровне значимости $P < 0,05$.

Одним из физиолого-биохимических показателей, который используют в качестве индикатора состояния растения при нефтяном загрязнении почвы, является активность синтеза белков [12]. Измерение уровня содержания белка в листьях при изменении условия среды позволяет в определенной степени судить об активности азотного обмена у растений. В нашем эксперименте содержание белка в кресс-салате снижалось пропорционально дозе загрязнения нефтью (рис. 2, Б). Содержание белка рассматривается в качестве показателя способности растений поддерживать нормальное соотношение процессов метаболизма. При негативном влиянии факторов среды наблюдается сдвиг в сторону преобладания деградации белков над их синтезом, обусловленный повышенными потребностями организма на процесс адаптации [13].

Таким образом, эксперимент по выращиванию на нефтезагрязненной почве, показал, что морфометрические показатели кресс-салата ухудшались уже при 1%-ном загрязнении, усиление редокс-процессов отмечали только при 3%-ном загрязнении нефтью. Снижение содержания белков в кресс-салате можно использовать в качестве биохимического показателя фитотоксичности нефтезагрязненной почвы.

Библиографический список

1. Смирнова В.С., Пономаренко Е.В. Влияние нефтезагрязнений на почву и растения // Царскосельские чтения. – 2010. – С. 149-153.
2. Robson D.B. et al. Hydrocarbon tolerance correlates with seed mass and relative growth rate // *Bioremediation J.* – 2004. V. 8. – №3-4. – P. 185-199.
3. Высоцкая Л.Б. и др. Сравнение реакции растений различных видов на нефтяное загрязнение // *Биомика.* – 2019. – Т. 11(1). – С. 86-100.
4. Чупахина Г.Н., Масленников П.В. Адаптация растений к нефтяному стрессу // *Экология.* – 2004. – № 5. – С. 330–335.
5. Czerniawska-Kusza I. et al. Comparison of the Phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments // *Environmental Toxicology: An International Journal.* – 2006. – V. 21. – №. 4. – P. 367-372.

6. Sujetovienė G., Griauslytė L. Toxicity Assessment of Roadside Soil Using Wild Oat (*Avena sativa* L.) and Cress (*Lepidium sativum* L.) Morphometric and Biochemical Parameters // Environmental Research, Engineering & Management. – 2008. V. 46. – №. 4. – P. 29-35.
7. Lisovitskaya O.V., Terekhova V.A. Phytotesting: basic approaches, problems of the laboratory method and modern solutions // Doklady po ěkologiĉeskomu poĉvovedeniju. – 2010. – №. 1. – P. 13.
8. Еремченко О.З., Митракова Н.В. Способ оценки биологической активности и токсичности почв и техногенных почвогрунтов. Патент на изобретение № 2620555. – 2017.
9. Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. Активные формы кислорода, антиоксиданты и устойчивость растений к действию стрессоров. – Киев: Логос. – 2019. – 277 с.
10. Осипова Е.С., Петухова Г.А., Перекупка А.Г. Активация биохимических механизмов защиты растений при действии нефтяного загрязнения и парааминобензойной кислоты // Вестник Тюменского государственного университета. – 2013. – № 6. – С. 41-47.
11. Булуктаев А.А., Сангаджиева Л.Х., Даваева Ц.Д. Влияние нефтедобывающего комплекса на свойства почв в зоне заповедного режима // Известия Саратовского университета. Серия: Химия. Биология. Экология. – 2015. – № 4. – С. 109-114.
12. Швец А.А. Фиторемедиация нефтезагрязненных нефтью почв. Краснодар. – 2009. – 23 с.
13. Дубровская Е.В. и др. Влияние нефтяного загрязнения на растения в условиях пониженной влажности // Экобиотехнология. – 2019. – Т.2. – № 3. – С. 391-401.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АССОЦИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ

Сафьянникова У.И., Алескерова Л.Э.

Московский Государственный Университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация: Из нефтепродуктов выделена ассоциация углеводородокисляющих микроорганизмов. В лабораторных условиях была исследована их способность к утилизации углеводородов нефти в свободном и иммобилизованном на полимерных сорбентах состояниях. Исследованы физиологические и молекулярно-биологические свойства ассоциации, показана их психротолерантность и перспективность использования биопрепаратов на их основе в арктических регионах.

Ключевые слова: консорциум углеводородокисляющих микроорганизмов, биоремедиация, биодegradация.

USE OF THE ASSOCIATION OF HYDROCARBON-OXIDIZING BACTERIA FOR BIOREMEDIATION OF OIL POLLUTIONS

Safyannikova U.I., Aleskerova L.E.

Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Faculty of Biology, Department of Bioengineering, Moscow, Russia

Abstract: An association of hydrocarbon-oxidizing microorganisms was isolated from petroleum products. Under laboratory conditions, their ability to utilize oil hydrocarbons in the free and immobilized states on polymeric sorbents was studied. The physiological and molecular-biological properties of the association have been studied, their psychrotolerance and the prospects for the use of biopreparations based on them in the Arctic regions have been shown.

Keywords: consortium of hydrocarbon-oxidizing microorganisms, bioremediation, biodegradation.

Ежегодно в мире фиксируется более 100 крупных техногенных аварий, приводящих к масштабным разливам нефти и нефтепродуктов [1]. Загрязнение окружающей среды нефтепродуктами приводит к уменьшению видового разнообразия и ухудшению экологического состояния. Биологические методы ликвидации последствий таких аварий являются наиболее безопасными [2]. В РФ температура на большей части территорий не поднимается выше 20 °С и поэтому актуально выделение и изучение психрофильных штаммов углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и разработка на их основе биопрепаратов. Использование УОБ, иммобилизованных на полимерных носителях увеличивает эффективность биоремедиации за счет сорбирующих свойств носителя и высокой

доступности углеводов для УОБ, позволяет избавиться также от нефтяной пленки на поверхности воды.

Целью настоящего исследования являлось охарактеризовать углеводородокисляющих бактерий (УОБ) и смоделировать возможность создания биокompозитного материала на основе нетканых полимерных материалов.

Из нефтепродуктов, собранных на механическом дворе ББС имени Н.А.Перцова, микробиологическими методами выделена и идентифицирована на основе гена 16 S рРНК ассоциация УОБ, состоящая из двух культивируемых штаммов – *Herminiimonas* sp. и *Pseudomonas* sp. [3]. Биомасса выделенных УОБ изучена метабаркодингом по гипервариабельному участку V4 фрагмента гена 16 S рРНК (на платформе Illumina). [4] По результатам метабаркодинга установлено, что в состав ассоциацию входят не только культивируемые, но и 2 некультивируемых штамма бактерий, относящиеся к рр. *Microbacterium* и *Brevundimonas* (рис.1).

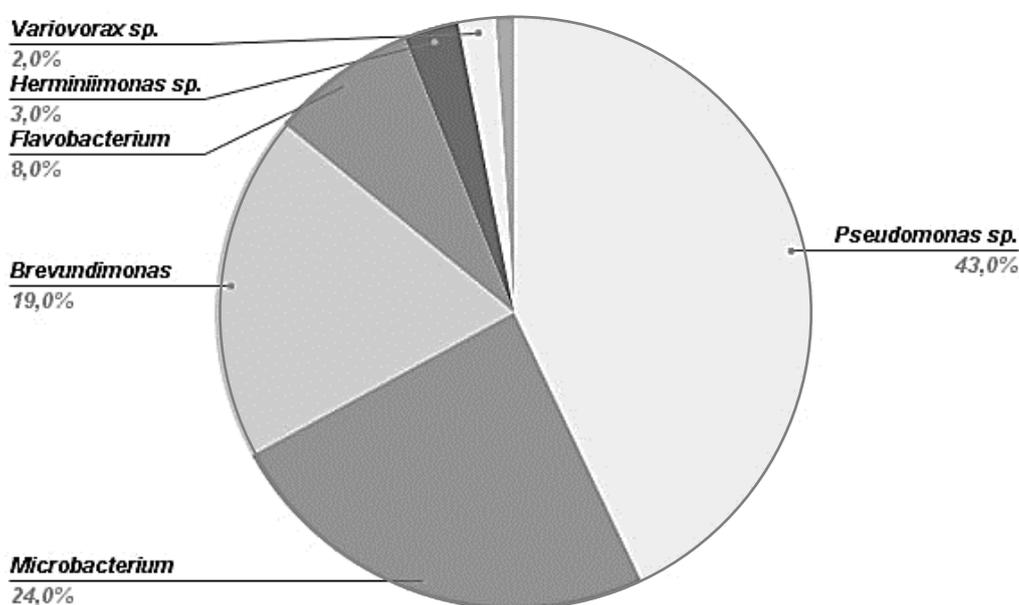


Рисунок 1 – Состав природной ассоциации УОБ на уровне родов, установленный методом метабаркодинга.

Культивируемые штаммы УОБ проверены на способность к росту на плотной среде Эванса в присутствии углеводов разных групп, изучены особенности их роста при 5, 20 и 27 °С. Установлено, что при 5°С экспоненциальная фаза роста (ЭФР) культивируемых штаммов УОБ составляет 200 часов, а стационарная фаза (СФ) длится около 25 суток, тогда как при 20 и 27 °С ЭФР составляет 72 часа, а СФ -4-10 часов, а затем лизируются. Это свидетельствует о психротолерантности штаммов УОБ, что делает перспективным их использование в качестве УОБ в условиях Арктики. [5] Изучена эмульгирующая активность и показатель гидрофобности выделенных штаммов УОБ. Проведена иммобилизация, выделенных штаммов на нетканых полимерных сорбентах на основе полипропилена, полиэтилена и полиэтилена с добавлением 25% свекольного жома. Показано, что иммобилизация УОБ на сорбентах сопровождается формированием биопленок как на поверхности волокон сорбентов в виде грибовидных тел, так и в межволоконном пространстве

в виде флоккул. В составе внеклеточного полимерного матрикса биопленок обнаружены кислые экзополисахариды. Показана стабильность УОБ в составе полученных биокомпозитных сорбентов.

Методом газожидкостной хроматографии была исследована эффективность деградации различных классов углеводов из модельной смеси (предельные, непредельные, циклические, ароматические). Показано, что уже на 14 сутки большинство фракций модельной смеси УВ деградировано более чем на 50% при температуре 20°C и более чем на 25% при 5°C, что свидетельствует о высокой активности природной ассоциации УОБ к биодegradации нефтепродуктов. (Рис.2)

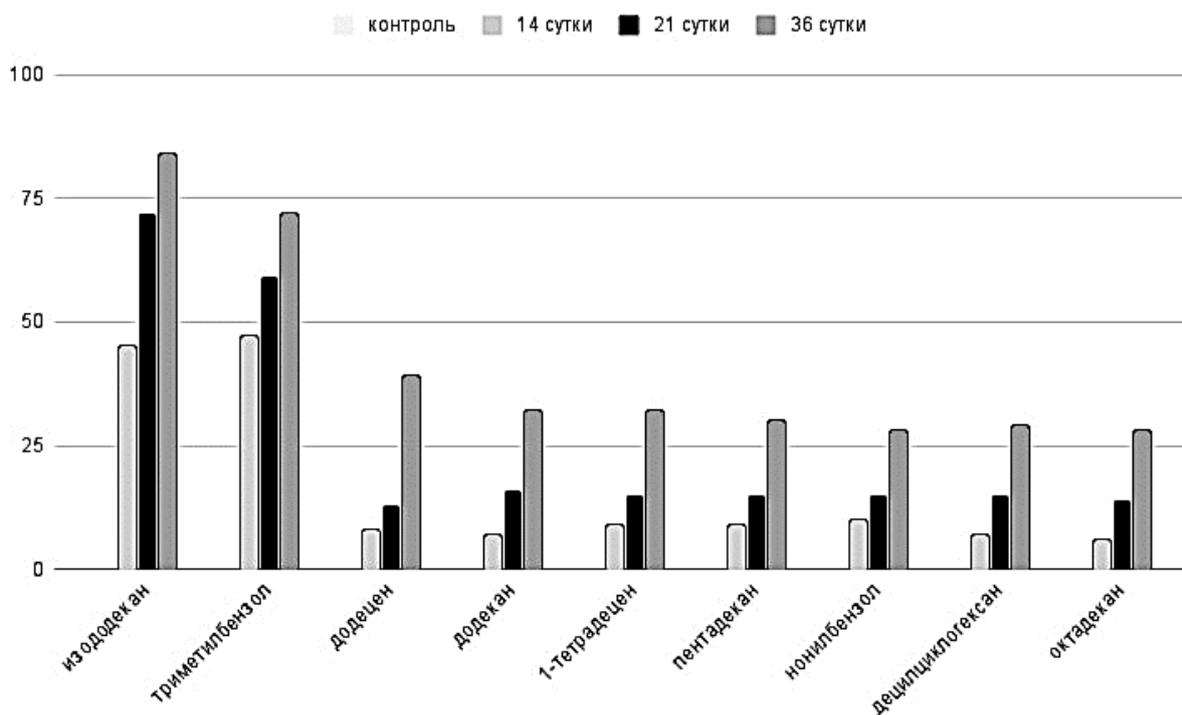


Рисунок 2 – Количество использованной модельной смеси углеводов (в %) при 5 °С.

Библиографический список

1. Владимиров В. А. Разливы нефти: причины, масштабы, последствия // Стратегия гражданской защиты: проблемы и исследования. 2014 №1.
2. Жуков Д.В. и другие. Кинетические закономерности биодegradации алифатических углеводов бактериями *Rhodococcus ruber* и *Rhodococcus erythropolis* // Прикладная биохимия и микробиология, 2007 – том 43, №6, с. 657-663
3. Современная микробиология. Прокариоты: в 2-х томах // Мир, – 2005 – 656 с.
4. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data // Nat. Methods. 2010 V. 7., № 5 – P. 335– 336
5. Atlas R.M. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation // Mar. Pollut. Bull. 1995 V. 31., № 4–12. – P. 178–182.

ФОРМИРОВАНИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ (*TRITICUM AESTIVUM L.*) В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ

Сиголаева Т. Е., Переломов Л. В., Иванищев В.В.

Тульский государственный педагогический университет им. Л.Н. Толстого, Тула, Россия

Аннотация: Исследовали всхожесть семян, формирование проростков и содержание фотосинтетических пигментов *Triticum aestivum L.*, выращенных на черноземе выщелоченном и дерново-подзолистой почве в присутствии различных концентраций нитратов цинка и свинца. Показано, что концентрации свинца и цинка 3,3 ммоль/кг и 9,9 ммоль/кг не были токсичными для растений пшеницы. Концентрации металлов 27 ммоль/кг и 45 ммоль/кг проявляли токсичность, что отражалось в изменении изучаемых биометрических и биохимических признаков.

Ключевые слова: тяжелые металлы, пшеница, биометрические показатели, фотосинтетические пигменты, буферность почв.

FORMATION OF SEEDLINGS OF TRITICUM AESTIVUM IN CONDITIONS OF HEAVY METAL POLLUTION

Sigolaeva T. E., Perelomov L. V., Ivanishchev V. V.

Tula State Lev Tolstoy Pedagogical University, Tula, Russia

Abstract. The germination of seeds, the formation of seedlings and the content of photosynthetic pigments of *Triticum aestivum L.* grown on leached chernozem and sod-podzolic soil in the presence of various concentrations of zinc and lead nitrates were studied. It was shown that lead and zinc concentrations of 3.3 mmol/kg and 9.9 mmol/kg were not toxic to wheat plants. Metal concentrations of 27 mmol/kg and 45 mmol/kg showed toxicity, which was reflected in changes in the studied biometric and biochemical signs.

Keywords: heavy metals, wheat, biometric indicators, photosynthetic pigments, soil buffering.

Загрязнение почвы тяжелыми металлами (ТМ) вызывает серьезную обеспокоенность из-за присущей им токсичности для живых организмов, в том числе человека [1,2]. Высокие концентрации ТМ снижают биологическую продуктивность основных сельскохозяйственных культур, препятствуя их росту и развитию. Даже физиологически значимые металлы, жизненно необходимые в низких концентрациях, при дальнейшем увеличении их содержания в среде и/или организме становятся прямой или косвенной причиной нарушения биохимических и физиологических процессов, приводящих к негативным последствиям для организма [3,4]. ТМ вызывают неблагоприятные морфологические и физиологические изменения в растениях, создавая активные формы кислорода, инактивируя метаболические

ферменты, подавляя фотосинтез и др. Помимо этого, растения тратят значительную энергию на транспорт, хелатирование и дислокацию поглощенных ТМ [5].

Ведущей зерновой культурой России и Тульской области является пшеница, площадь ее возделывания в нашей стране составляет 29,5 млн. га [5]. По этой причине актуален поиск допустимых концентраций ТМ в почвах, не приводящих к токсическому действию на эту культуру, снижению её урожайности и качеству зерна. В нашей работе мы изучено действие высоких концентраций свинца и цинка на биометрические и биохимические показатели растений пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.) на ранних стадиях её развития.

Объектом исследования были проростки пшеницы сорта «Московская 40», выращиваемые в сосудах с дерново-подзолистой почвой и черноземом выщелоченным в течение 21 дня. В сосуды к 300 г соответствующей почвы были внесены растворы нитратов свинца и цинка в концентрациях: 3,3 ммоль/кг, 9,9 ммоль/кг, 27 ммоль/кг и 45 ммоль/кг почвы. В качестве контроля использовали раствор нитрата калия в концентрации 3,3 ммоль/л. Почву с металлом инкубировали в течение 14 дней, затем в сосуды высевали протравленные семена пшеницы в количестве 16 штук на сосуд. Растения выращивали при 12-часовом освещении при температуре воздуха 20-23°C, относительной влажности воздуха – 55-75 % и влажности почвы около 60% от предельной полевой влагоёмкости. Экстракцию пигментов проводили 96%-ым этиловым спиртом. Содержание пигментов в вытяжке определяли на спектрофотометре ПЭ-5300ВИ при длинах волны: 665 нм, 649 нм и 470 нм, и затем рассчитано по формуле [6]. Эксперимент проводили в трех повторностях. Результаты экспериментов обработаны статистически с использованием программы Excel.

Результаты вегетационных опытов показали, что концентрации тяжелых металлов, оказывающие достоверное негативное воздействие на растения, отличаются для дерново-подзолистой почвы и чернозема выщелоченного в соответствии с показателями буферности почв (рН, гранулометрического состава, содержания гумуса).

При загрязнении Pb и Zn в дозах 3,3 и 9,9 ммоль/кг на черноземе выщелоченном всхожесть семян была схожа с контролем. При концентрации 27 и 45 ммоль/кг наблюдалось значительное снижение всхожести. На дерново-подзолистой почве внесение тяжелых металлов в целом привело к снижению всхожести и энергии прорастания для культур по сравнению с черноземом. При концентрации 45 ммоль/кг семена на дерново-подзолистой почве не прорастали при внесении и свинца, и цинка.

Длина побегов пшеницы, выращенных как на черноземе, так и на дерново-подзолистой почве, независимо от используемого металла, начинала значительно уменьшаться по сравнению с контролем только при дозе 9,9 ммоль/кг. При дозе 3,3 ммоль/кг наблюдалось стимулирующее влияние на развитие побегов, возможно, за счет нитрат-ионов. В случае, для дерново-подзолистой почвы увеличение средней длины побегов при данной концентрации было более выраженным, что также можно объяснить низкой буферной емкостью этой почвы.

Синтез хлорофилла *a* в растений, выращенных на черноземе, имел тенденцию к снижению, начиная с концентрации ТМ в почве 27 ммоль/кг. Более низкие концентрации ТМ не влияли на содержание этого пигмента и не способствовали его синтезу (рис. 1). Изменения содержания хлорофилла *b* и каротиноидов имело показали аналогичную картину.

Подобные описанным выше закономерностям содержания пигментов отмечены для дерново-подзолистой почвы (рис. 2). При использовании цинка в нетоксичных дозах (3,3 ммоль/кг и 9,9 ммоль/кг) абсолютные значения содержания пигментов в растениях на дерново-подзолистой почве были выше, чем на черноземе.

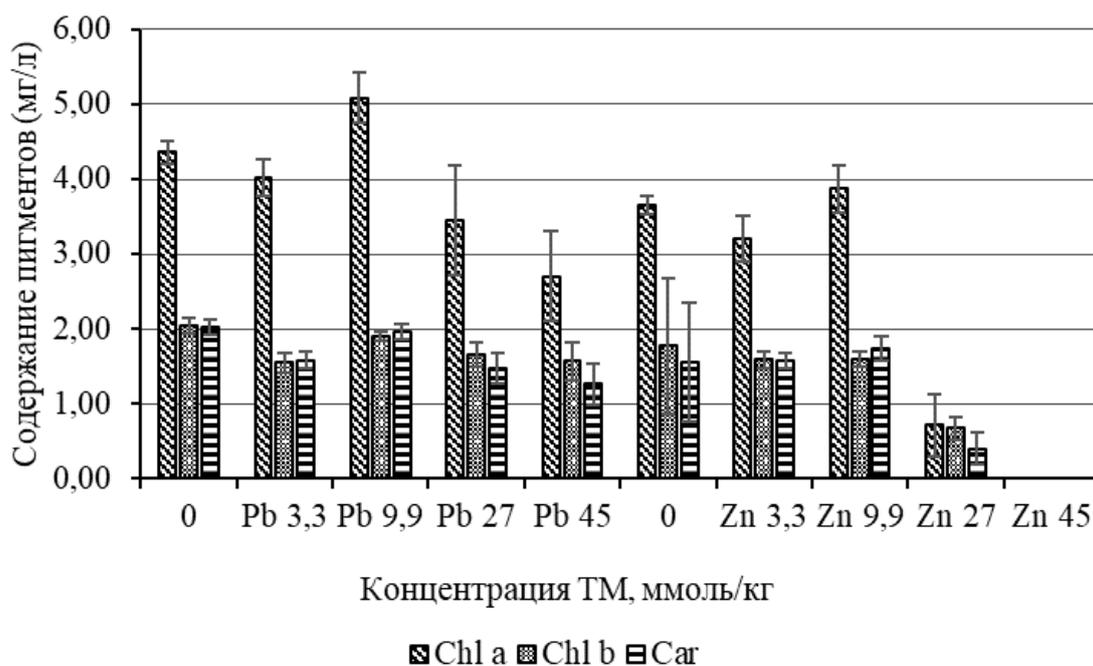


Рисунок 1 – Содержание растительных пигментов в вытяжках растений, выращенных на выщелоченном черноземе при загрязнении свинцом и цинком.

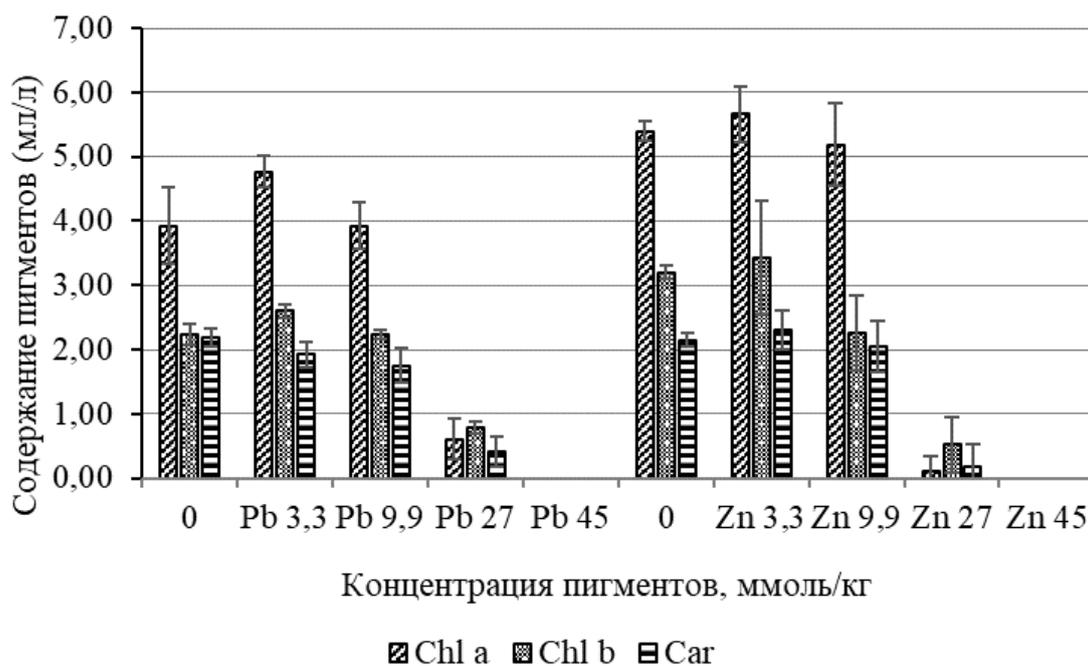


Рисунок 2 – Содержание растительных пигментов в вытяжках растений, выращенных на дерново-подзолистой почве при загрязнении свинцом и цинком.

Из этого следует, что концентрации свинца и цинка 3,3 ммоль/кг и 9,9 ммоль/кг в черноземе выщелоченном и дерново-подзолистой почве не были токсичными для растений пшеницы по всем рассмотренным биометрическим и биохимическим показателям. Высокие концентрации ТМ 27 ммоль/кг и 45 ммоль/кг проявляли токсичность, что существенно отразилось на показателях всхожести, длина побегов, биомассы и содержания растительных пигментов. На проявления токсичности ионов ТМ и на стимулирование роста вследствие доступности нитрат-ионов их солей оказывала влияние буферность использованных почв.

Работа поддержана Грантом правительства Тульской области в области науки и техники (2021–022 гг.), соглашение № ДС/262.

Библиографический список

1. Башмаков, Д. И. Эколого-физиологические аспекты аккумуляции и распределения тяжелых металлов у высших растений / Д. И. Башмаков, А. С. Лукаткин; под ред. А. С. Лукаткина. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та. – 2009. – 236 с.
2. Bumhan B., Hyesun P., Sua K. Quantitative Estimation of Synergistic Toxicity of Cu and Zn on Growth of *Arabidopsis thaliana* by Isobolographic Method // *Toxics*. – 2022. – Vol.10. – P. 195.
3. Казнина Н. М. Влияние свинца и кадмия на рост, развитие и некоторые другие физиологические процессы однолетних злаков: Автореф. дис... канд. биол. наук. – Петрозаводск. – 2003. – 25 с.
4. Титов А.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / А.Ф. Титов, В.В. Таланова, Н.М. Казнина, Г.Ф. Лайдинен. Институт биологии КарНЦ РАН. – Петрозаводск: Карельский научный центр РАН. – 2007. – 172 с.
5. Грузнова К.А. Влияние экзогенных регуляторов роста на степень токсичности тяжелых металлов для растений пшеницы: Дисс. ... канд. биол. наук. – Саранск. – 2016. – 139 с.
6. Lichtentaller H.K., Welburn A.R. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents // *Biochem. Soc. Trans.* – 1983. – V. 11. – № 6. -P. 591-592.

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАИБОЛЕЕ ПРОДАВАЕМЫХ ЖИДКОСТЕЙ
ДЛЯ СНЯТИЯ ЛАКА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КРЕСС-САЛАТА
(*LEPIDIUM SATIVUM* L.) СОРТА «ДАНСКИЙ»**

Симакова В.С.

Вятский колледж профессиональных технологий, управления и сервиса, Киров, Россия.

Аннотация. Впервые показан качественный состав косметических средств (жидкостей для снятия лака). Показано влияние морфометрических показателей и ингибирующее действие косметических средств на рост и развитие высших растений (кресс-салата). Был определен условный показатель потенциальной химической опасности жидкостей для снятия лака. Кроме того, проанализированы полученные данные и сделан вывод о токсичности различных шампуней и возможности использования кресс-салата в качестве биотеста.

Ключевые слова: фитотестирование, жидкость для снятия лака.

**STUDY OF THE INFLUENCE OF THE BEST SELLING LIQUIDS FOR POLISH
REMOVER ON THE GROWTH AND DEVELOPMENT OF CRESS (*LEPIDIUM
SATIVUM* L.) VARIETIES «DANSKY»**

Simakova V.S.

KOGROBU Vyatka College of Professional Technologies, Management and Service, Kirov, Russia

Abstract. For the first time, the qualitative composition of cosmetics (nail polish removers) is shown. The influence of morphometric parameters and the inhibitory effect of cosmetics on the growth and development of higher plants (watercress) is shown. A conditional indicator of the potential chemical hazard of nail polish removers was determined. In addition, the data obtained were analyzed and a conclusion was made about the toxicity of various shampoos and the possibility of using watercress as a biotest.

Keywords: phytotesting, nail polish remover.

Введение

Косметология – это большая, перспективная, динамичная и очень разносторонняя дисциплина, которая активно интегрируется с другими медицинскими специальностями и вбирает в себя самые последние достижения науки [8].

Также, высокое развитие косметических средств привело к развитию химической промышленности [4], что представляет особую опасность для почвенных водорослей, поскольку происходит загрязнение вод и почв поллютантами, в частности, синтетическими поверхностно-активными веществами (СПАВ), например, в городе Кирове.

Поэтому, для изучения токсичности действия косметических средств используют биологические методы, которые дают интегральную оценку воздействия загрязняющих веществ на экосистемы и определяет качество среды обитания микроорганизмов. К ним относится биотестирование, с помощью которого определяют действие поллютантов на специально выбранные тест-организмы в стандартных условиях с регистрацией различных поведенческих, физиологических или биохимических показателей [7].

Одним из таких методов является метод фитотестирования, основанный на ответной реакции высших растений на негативное воздействие загрязняющих веществ. Данный метод является наиболее экспрессным и экономичным, а также обладает высокой чувствительностью, универсальностью, интегральностью, простотой и соответствует международным стандартам оценки качества почвы.

Поэтому, цель данной работы – определение влияния косметических средств на энергию прорастания и морфометрические показатели кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта «Данский», а также условного показателя потенциальной химической опасности косметических средств и возможность использования ее в качестве тест-организма для определения степени токсичности косметических средств.

Объекты и методы

В стерильные чашки Петри помещали фильтровальную бумагу, предварительно смоченную дистиллированной водой, и раскладывали по 50 семян. Повторность опыта трехкратная. Экспозиция опыта 3 суток в темноте при температуре +22–24 °С.

Ранее было показано, что в условиях загрязнения почв поллютантами (тяжелые металлы) подавляются такие показатели начального роста растений, как всхожесть, энергия, дружность прорастания и длина корней растений [7].

В качестве тест-объекта использовали семена кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта «Данский», которые характеризуются быстрым ростом и развитием.

Поэтому, нами была определена энергия роста семян и морфологические параметры проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта «Данский» – длина корня и побега согласно ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести [1] и «Методике выполнения измерений всхожести семян и длины корней проростков высших растений для определения токсичности техногенно загрязненных почв» [5].

Перед закладкой семена проходили калибровку: с повреждениями, сколами, плесенью, недозревшие убирали.

В качестве косметических средств для исследований использовали жидкость для снятия лака пяти марок в соответствии с ГОСТ 31693-2012 [2]: Severina, произведенная в ООО «Северина» (РФ, Московская область, г. Москва); Мечта, произведенная в ООО «ЭВИ Косметик Лаб» (РФ, Московская область, г. Коломна); Econta, произведенная в ООО «ПАРИС» (РФ, Московская область, г. Егорьевск); La fresh, произведенная в ООО «ЭВИ Косметик Лаб» (РФ, Московская область, г. Коломна); Мечта (для гель-лака), произведенная в ООО «ЭВИ Косметик Лаб» (РФ, Московская область, г. Коломна).

Данные косметические средства состоят из различных ингредиентов (табл. 1).

В контрольном варианте зерновки кресс-салата увлажняли дистиллированной водой [3]. Во всех вариантах в течение срока экспозиции влажность в чашках Петри поддерживали на уровне 60% от полной влагоёмкости.

Таблица 1. Ингредиенты косметических средств

Ингредиенты косметических средств	Жидкость для снятия лака				
	Severina	Мечта	Escoria	La fresh	Мечта*
Вода	-	+	+	+	-
Увлажнители кожи	-	-	Глицерин	-	Глицерин, ПЭГ-40
Ароматизаторы	Гидрогенизированное касторовое масло, парфюмерная композиция, метилэтилкетон, ацетон, изобутанол	Парфюмерная композиция, изопропанол, ацетон, бутилацетат	Гидрогенизированное касторовое масло, парфюмерная композиция, изопропанол	Гидрогенизированное касторовое масло, парфюмерная композиция, изопропанол	Гидрогенизированное касторовое масло, парфюмерная композиция, изопропанол
Растворители (солнобелшазаторы)	Метилэтилкетон, изобутанол, ацетон	Изопропанол, ацетон, бутилацетат	Изопропанол, этилацетат	изопропанол	изопропанол
Консерванты	изобутанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол
Пенотрасители	изобутанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол
Стабилизаторы кислотности	изобутанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол	изопропанол
Денатуранты	ацетон	ацетон	-	-	-
Витамины	Токоферола ацетат	-	-	-	-
Антиоксиданты	Токоферола ацетат	-	-	-	-
Кондиционеры	Токоферола ацетат	-	-	-	-
Агенты, маскирующие запахи	-	бутилацетат	-	-	-
Красители	-	+	-	-	-

Примечание: * - жидкость для снятия гель – лака.

Для оценки действия тестируемых косметических средств рассчитывали процент ингибирования тест-отклика растений (1):

$$I = 100 \% - \frac{K_1 * 100 \%}{K_2}, \text{ где}$$

I – процент ингибирования тест – отклика растений, %;

K₁ – среднее значение тест – отклика растений в опыте;

K₂ – среднее значение тест – отклика растений в контроле.

Для определения условного показателя потенциальной химической опасности косметических средств использовали следующую формулу (2):

$$M = \sqrt{N_{4 \text{ класса}} * 1,0 + N_{3 \text{ класса}} * 1,5}, \text{ где}$$

N_{4 класса} – число химических веществ IV класса опасности, содержащихся в косметическом средстве;

N_{3 класса} – число химических веществ III класса опасности, содержащихся в косметическом средстве;

1,0 – условный коэффициент для химических веществ IV класса опасности;

1,5 – условный коэффициент для химических веществ III класса опасности.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 6.0.

Результаты

Изучаемые косметические средства попадают в организм человека не только на кожу, а также на дыхательные пути и слизистые оболочки, и обладают кожно-резорбтивным и ингаляционным действием, вызывая общее негативное действие на весь организм [6].

Проведенный сравнительный анализ результатов, выявил различия между средними показателями при определении энергии прорастания семян кресс-салата в контрольном и исследуемых вариантах (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние различных косметических средств на энергию прорастания кресс-салата, %

Признак	Контроль	Жидкость для снятия лака				
		Severina	Мечта	Econta	La fresh	Мечта*
Энергия прорастания, %	92±2	6±2	8±3	18±3	26±2	24±2
Количество пораженных растений, шт.	4±1	47±8	46±7	41±4	37±3	38±5
Количество пораженных растений, %	8±1	94±7	92±5	82±8	74±3	76±5

Примечание: * – жидкость для снятия гель – лака.

Максимальные показатели энергии прорастания и минимальные значения пораженных растений имели жидкости для снятия лака, в состав которых не входит ацетон. При этом, жидкости для снятия лака, в состав которых входил ацетон, наблюдали максимальное количество пораженных растений и минимальную энергию роста по сравнению с контролем. Минимальное количество пораженных растений было в контрольном варианте (3 штуки).

Косметические средства в водных вытяжках привели к изменению длины корня и надземной части проростка кресс-салата (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние жидкостей для снятия лака на морфометрические показатели кресс-салата

Признак	Контроль	Severina	Мечта	Econta	La fresh	Мечта*
Длина корней, см	8,04±	0,27±	0,35±	0,62±	0,60±	0,61±
	2,82	0,05	0,11	0,17	0,19	0,14
Надземная часть проростков, см	3,49±	0,13±	0,18±	0,25±	0,32±	0,28±
	0,97	0,05	0,08	0,12	0,11	0,09

Примечание: * – жидкость для снятия гель – лака.

Наибольшие морфометрические показатели наблюдались в контрольном варианте. Так, максимальная длина корня была у Econta, а максимальная надземная часть – у La fresh. Ризогенный эффект был отмечен во всех остальных вариантах, где показатель длины корней и надземная часть проростков оказались выше по сравнению с этими вариантами.

По полученным результатам был рассчитан процент ингибирования растений *Lepidium sativum* L. (табл. 4) и условный показатель потенциальной опасности косметических средств (табл. 5).

Таблица 4 – Процент ингибирования *Lepidium sativum* L., %

Признак	Контроль	Жидкость для снятия лака				
		Severina	Мечта	Econta	La fresh	Мечта*
Длина корней	0	96,64	95,65	92,29	92,54	92,41
Надземная часть проростков	0	96,28	94,84	92,84	90,83	91,98

Примечание: * – жидкость для снятия гель – лака.

Во всех вариантах кроме контроля при внесении косметических средств ингибировало подземную и надземную часть проростков.

Таблица 5. Условный показатель потенциальной опасности косметических средств

Признак	Жидкость для снятия лака				
	Severina	Мечта	Econta	La fresh	Мечта*
$M_{\text{косм. средств}}$	2,739	2,449	2,739	2,236	2,449

Примечание: * – жидкость для снятия гель – лака.

По классу потенциальной химической опасности из исследуемых жидкостей для снятия лака наибольшие интегральные показатели имели Severina и Econta, что говорило о более негативном воздействии данных косметических средств на организм человека.

Выводы

1. Изученный качественный состав косметических средств позволил определить реальную химическую нагрузку и оценить опасность влияния косметических средств на организм человека при попадании через ингаляционный и кожно-резорбтивный пути и возникновение заболеваний.

2. Минимальное ингибирующее действие на развитие проростков кресс-салата (*Lepidium sativum* L.) сорта «Данский» наблюдался в контроле, а в остальных вариантах – стимулирующее.

3. Водные вытяжки исследуемых образцов отрицательно влияли на рост и развитие высших растений. При этом, максимальные значения были получены в вариантах без ацетона.

4. Предлагаемый условный показатель позволил дать гигиеническую оценку потенциальной химической опасности косметической продукции и проводить их сравнительный анализ между собой, а также ранжировать косметические средства по потенциальной химической опасности воздействия на организм человека.

5. Таким образом, для более детального изучения влияния косметических средств на биотест, необходимо проведение дополнительных исследований.

Библиографический список

1. ГОСТ 12038-84 Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести (с Изменениями № 1, 2, с Поправкой). М.: Стандартинформ, 2011. 64 с.
2. ГОСТ 31693-2012 Продукция косметическая для ухода за ногтями. Общие технические условия. М.: Стандартинформ, 2013. 16 с.
3. ГОСТ Р 52501-2005 Вода для лабораторного анализа. Технические условия. М.: Стандартинформ, 2006. 11 с.
4. Грухин Ю.А, Ванина Ю.Р., Коган К.Е. Вредная косметика // Современное инновационное общество: от стагнации к развитию: экономические, социальные, философские, политические, правовые, общенаучные закономерности: материалы Международной научно-практической конференции: в 3-х частях. Энгельс: ООО «Академия управления», 2017. С. 80-82.
5. Методика выполнения всхожести семян и длины корней проростков высших растений для определения токсичности техногенно загрязненных почв М-П-2006. Федеральный реестр ФР.1.39.2006.02264.
6. Митрохин О.В. Гигиеническая классификация косметических средств // Здоровье населения и среда обитания. 2013. № 5 (242). С. 4-6.
7. Шунелько Е.В., Федорова А.И. Экологическая оценка городских почв и выявления уровня токсичности тяжелых металлов методом биотестирования // Вестн. Воронеж. гос. ун – та. География и экология. 2000. № 4. С. 77-83.
8. Эрнандес Е.И., Юцковская Я.А. Новая косметология. Основы современной косметологии. М.: ООО «ИД «Косметика и медицина», 2019. 500 с.

**ВЛИЯНИЕ ЭКССУДАТОВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ,
ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА,
НА ПРОДУКЦИЮ ИУК БАКТЕРИЯМИ РОДА *PSEUDOMONAS***

Хасанова К.А.¹, Замалиева Ф.Ф.², Лутфуллин М.Т.¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² ТамНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Аннотация. Работа посвящена анализу влияния экссудатов растения картофеля, полученных при действии абиотического стресса, на продукцию ауксинов ризосферными бактериями. Установлено, что экссудаты, полученные в присутствии ионов меди, повышают уровень синтеза индол-3-уксусной кислоты штаммами *Pseudomonas putida* MG-2 и *Pseudomonas koreensis* MG-8. Также показано, что исследуемые штаммы обладают фунгистатической активностью.

Ключевые слова: бактерии, стимулирующие рост растений, экссудаты, абиотический стресс, индол-3-уксусная кислота.

**EFFECT OF POTATO PLANT EXUDATES UNDER ABIOTIC STRESS ON
PRODUCTION OF IAA BY PSEUDOMONAS**

Khasanova K.A.¹, Zamalieva F.F.², Lutfullin M.T.¹

¹ Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

² TATNIISKh FIC KazNTs RAS, Kazan, Russia

Abstract. This research is devoted to the impact of potato plant exudates obtained under abiotic stress on the production of auxins by rhizosphere bacteria. The exudates obtained in the presence of copper ions were shown to increase the synthesis of indole-3-acetic acid by *Pseudomonas putida* MG-2 and *Pseudomonas koreensis* MG-8 strains. The studied strains were also shown to possess fungistatic activity.

Keywords: plant growth-promoting bacteria, exudates, abiotic stress, indole-3-acetic acid.

Введение.

Различные виды биотических и абиотических стрессов влияют на рост, продуктивность и устойчивость сельскохозяйственных культур растений. К числу абиотических стрессов относятся высокие и низкие температуры, соленость, засуха, наводнения, ультрафиолетовое излучение, загрязнение воздуха (озон) и тяжелые металлы. Абиотические стрессы являются основными лимитирующими факторами для сельскохозяйственного производства во всем мире. Потери урожая, связанные с абиотическими стрессовыми условиями, могут достигать 50-82% в зависимости от типа сельскохозяйственной культуры и периода стресса [1].

Ряд тяжелых металлов необходимы растениям в качестве микроэлементов. Они способны действовать как кофакторы в составе простетической группы ферментов, которые участвуют в самых разных метаболических путях. При высокой концентрации большинство тяжелых металлов могут действовать как токсиканты, снижая урожайность растений [2]. Среди металлов, наиболее токсичных для растений и животных, есть те, которые вытесняют основные ионы металлов (кадмия, цинка, ртути, меди и др.) в биологических процессах. Также показано, что высокие концентрации металлов в почве вызывают повышенный синтез этилена [3, 4], подавляют развитие корней и побегов, снижают фиксацию CO₂ и ограничивают транслокацию сахаров [5]. Тяжелые металлы способны связываться с железом, а комплексы сидерофоров могут служить источником железа для растений [6, 7].

Ризосфера – это зона почвы, окружающая корневую систему растений, представляет собой резервуар микробного разнообразия [8]. Микробиота ризосферы состоит из архей, бактерий, вирусов, грибов, оомицетов, нематод, простейших, водорослей и членистоногих. Свободноживущие почвенные бактерии, которые обитают в ризосфере и колонизируют корни растений, называются бактериями, стимулирующими рост растений (БСРР) [9]. Группа БСРР представляет собой важный компонент почвенного микробиома. Различные штаммы БСРР способны повышать урожайность и устойчивость растений к различным абиотическим стрессам, ингибировать рост фитопатогенов, также стимулировать образование клубеньков у бобовых и увеличивать появление всходов. Известно, что БСРР влияют на общее здоровье растений за счет продукции разных вторичных метаболитов, способствуют усвоению питательных веществ корнями растений [10]. Доминирующими представителями группы БСРР являются рода *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* и другие [11]. Род *Pseudomonas* представляет важную экологическую группу бактерий, которые являются продуцентами антимикробных метаболитов, сидерофоров, фитогормонов и способны влиять на рост и развитие растений. Известно, что многие штаммы *Pseudomonas* используются в качестве биопрепаратов для защиты растений от фитопатогенов и стимуляции их роста [12].

БСРР, ассоциированные с растениями, помогают им выдерживать стрессовые условия, изменяя их физиологические и биологические свойства за счет экспрессии белков, устойчивых к холоду, жаре, засухе, засолению и щелочности [13]. Абиотические стрессы являются основным препятствием для повышения урожайности, качества продуктов питания и глобальной продовольственной безопасности. Альтернативным решением проблемы влияния различных стрессов на растения является изучение механизмов взаимодействия растений с микробным сообществом [14].

Целью работы являлась характеристика влияния экссудатов картофеля, полученных в условиях абиотического стресса, на динамику синтеза ИУК бактериями рода *Pseudomonas* и их фунгистатической активности.

Материалы и методы.

В работе использовали ризосферные штаммы *Pseudomonas putida* MG-2 и *Pseudomonas koreensis* MG-8. В качестве тест-культуры использовали микромицет *Alternaria alternata*.

Для культивирования бактерий использовали среду LB (Lysogeny broth) (г/л): триптон – 10.0, дрожжевой экстракт – 5.0, NaCl – 5.0. Культивирование бактерий проводили в термостате-шейкере (INFORS HT Standard”, Швейцария) при температуре 37°C и интенсивности качания 180 об/мин. Для культивирования грибов использовали среду Чапека (г/л): глюкоза – 14.0, CaCO₃ – 0.7, KNO₃ – 0.7, MgSO₄ – 0.35, NaCl – 0.35, K₂HPO₄ – 0.35, FeSO₄ – следы; агар-агар – 20.0.

Асептические растения картофеля были предоставлены сотрудниками ТатНИИСХ ФИЦ КазНЦ РАН, г. Казань. Экссудаты картофеля получали согласно методу, описанному в работе [15] с использованием асептических растений картофеля, выращенных *in vitro* на жидкой питательной среде Мурасига-Скуга из стеблевых черенков размером 30 мм при температуре 18-22°C, 16 часовом световом периоде и интенсивности освещения 2000 люкс/м². После образования хорошо сформированных корней (через 14-15 сут) черенки переносили в стерильную воду объемом 10 мл с добавлением тяжелого металла CuSO₄ в концентрации 75 мкМ. Экссудаты растений картофеля отбирали на 7 сутки, затем пробирку заполняли новой стерильной водой.

Для исследования влияния экссудатов растений картофеля на синтез ауксинов бактерии культивировали на среде LB с добавлением экссудатов картофеля в концентрации 20% при 37°C в термостате-шейкере при интенсивности качания 180 об/мин. В качестве контроля использовали среду LB, в которую добавляли стерильную воду. Динамику накопления ИУК в культуральной жидкости бактерий определяли по методу [16]. Супернатант бактерий получали центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 5 мин. К 70 мкл супернатанта добавляли 140 мкл реагента Сальковского (0.5 М FeCl₃ – 1 мл; H₂O – 50 мл; H₂SO₄ – 30 мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Оптическую плотность определяли при длине волны 540 нм на спектрофотометре xMark™ (Bio-RAD). Появление розовой окраски в образце свидетельствует о наличии ИУК. Концентрацию ИУК определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием Indole acetic acid (Sigma-Aldrich).

Результаты и обсуждение.

БСРР широко используются в качестве биопрепаратов, которые стимулируют рост и развитие растений. Данная группа бактерий повышает переносимость биотических и абиотических стрессов и поддерживает питание растений-хозяев.

Около 80% ризосферных микроорганизмов продуцируют ауксины, среди которых в качестве вторичного метаболита распространена ИУК [17]. ИУК, синтезируемая ризобактериями, способствует стимуляции роста растений: увеличивает размер, биомассу, количество разветвлений корней и стеблей [18]. Показано, что штамм *P. fluorescens* AK1, продуцирующий ИУК в концентрации от 19.4 мкг/мл до 30.02 мкг/мл, стимулирует урожайность растений риса [19].

Исследовали влияние экссудатов картофеля, полученных в присутствии и отсутствии ионов тяжелых металлов (CuSO₄), на продукцию ИУК бактериями *P. putida* MG-2 и *P. koreensis* MG-8.

На 24 час культивирования концентрация ИУК во всех исследуемых вариантах культуральной жидкости штамма *P. putida* MG-2 была на уровне 19.2±0.8 мкг/мл. На 48 час культивирования продукция ИУК у штамма MG-2 достоверно повышалась на 39% (31.7 мкг/мл) только в варианте с добавлением экссудатов, полученных в присутствии тяжелых металлов. На 72 час роста концентрация ИУК при добавлении экссудата, полученного при действии тяжелого металла, достоверно превышала контроль на 17% и составила 24.13 мкг/мл. На 96 час культивирования концентрация ИУК во всех вариантах была на уровне 20.8±2.3 мкг/мл (Рисунок 1А).

На 24 час культивирования ИУК во всех вариантах культуральной жидкости штамма *P. koreensis* MG-8 была на уровне 19.6±0.85 мкг/мл. На 48 час роста в вариантах с добавлением экссудатов, полученных в стрессовых условиях, концентрация ИУК была на уровне 31.6±0.7 мкг/мл, что на 37% больше контроля. На 72 час концентрация ИУК в варианте с экссудатом, полученным при действии CuSO₄, была на 10% выше контроля и составляла 35.8 мкг/мл. На

96 час культивирования MG-8 концентрация ИУК была на 18% выше контроля в случае добавления экссудата, полученного при действии тяжелого металла (Рисунок 1Б). Таким образом, экссудаты картофеля, полученные в присутствии ионов тяжелых металлов, стимулируют синтез ИУК ризосферными бактериями.

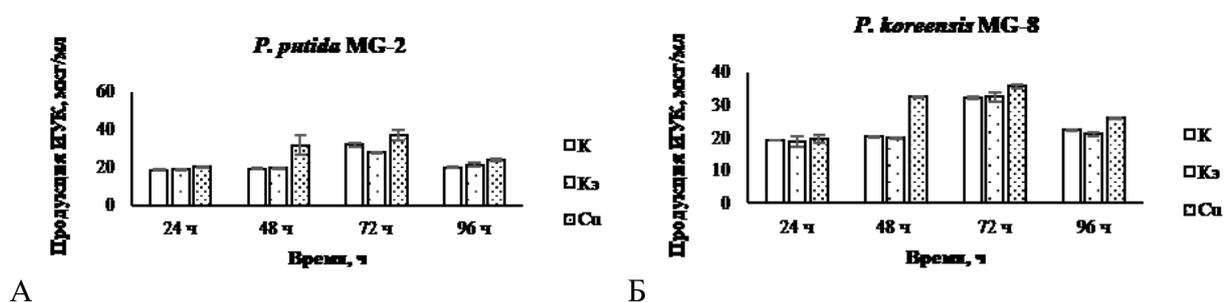


Рисунок 1 – Динамика продукции ИУК *P. putida* MG-2 (А) и *P. koreensis* MG-8 (Б). К – контроль (среда LB); Кэ – контроль (среда LB) с добавлением экссудата; Сu – среда LB с добавлением экссудатов, полученными при действии тяжелого металла CuSO_4 .

БСРР продуцируют различные низкомолекулярные вещества, которые обладают антимикробной и фунгистатической активностью, например, цианистый водород (HCN). За счет продукции антимикробных метаболитов БСРР могут подавлять рост патогенных грибов *Thielabiopsis basicola*, *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. [20]. Известно, что *B. subtilis* CL1, *Bacillus* sp. CL3, *P. putida* CL9, *P. fluorescens* CL12 проявляют фунгистатическую активность в отношении *A. alternata*, *A. niger*, *B. fulva* и *A. fumigatus* [21].

Фунгистатическую активность штаммов бактерий *P. putida* MG-2 и *P. koreensis* MG-8 исследовали в отношении *Alternaria alternata* методом блоков. Как видно из рисунка 2, оба исследуемых штамма ингибируют рост колонии микромицета: штамм MG-2 на 29%, MG-8 – на 47% (Рисунок 2).



Рисунок 2 – Фунгистатическая активность *P. putida* MG-2 и *P. koreensis* MG-8 в отношении *A. alternata*.

Таким образом, было показано, что добавление в среду культивирования экссудатов корней картофеля, полученных при действии тяжелого металла, повышало уровень синтеза ИУК у штаммов *P. putida* MG-2 и *P. koreensis* MG-8 на 48 и 72 час культивирования.

Также было показано, что исследуемые штаммы обладают фунгистатической активностью. Выделение и характеристика новых ростостимулирующих ризосферных штаммов является важным для развития биотехнологий в сельском хозяйстве.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-316-90047 и Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Библиографический список

1. Kumari B., Mallick M. A., Solanki M.K., Solanki A., Hora A., Guo W. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): modern prospects for sustainable agriculture // *Plant Health Under Biotic Stress*. – 2019. – V. 31. – P.109-127.
2. Kalam S., Basu, A., Podile A.R. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere // *Heliyon*. – 2020. – V.6. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04734.
3. Burd G.I., Dixon D.G., Glick B.R. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings // *Appl Environ Microbiol*. – 1998. –V. 64. – P. 3663-3668.
4. Goren R., Siegel S. M. Mercury-induced Ethylene Formation and Abscission in Citrus and *Coleus* Explants // *Plant Physiol*. – 1976. – V. 57. – P. 628-631
5. Basu A., Prasad P., Das S.N., Kalam S., Sayyed R.Z., Reddy M.S., El Enshasy H. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects // *Sustainability*. – 2021. – V. 13. – P. 11-40.
6. Bar-Ness E., Hadar Y., Chen Y., Shanzer A., Libman J. Iron uptake by plants from microbial siderophores : a study with 7-nitrobenz-2 oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog // *Plant Physiol*. – 1992. – V. 99. – P.1329-1335.
7. Wang Y., Brown H.N., Crowley D.E., Szanislo P.J. Evidence for direct utilization of a siderophore, ferrioxamine B, in axenically grown cucumber // *Plant, Cell & Environment*. – 1993. – V.16. – P. 579–585.
8. Backer R., Rokem J.S., Ilangumaran G., Lamont J., Praslickova D., Ricci E., Subramanian S., Smith D.L. Plant growth- promoting rhizobacteria: Context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture // *Plant Sci*. – 2018. – V. 9. doi: 10.3389/fpls.2018.01473.
9. Dutta S., Podile A. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): the bugs to debug the root zone // *Critical Reviews in Microbiology*. – 2010. – V.36. – P. 232-244.
10. Parray J.A., Jan S., Kamili A.N., Qadri R.A., Egamberdieva D., Ahmad P. Current perspectives on plant growth-promoting rhizobacteria // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2016. – V .35. – P. 877-902.
11. Kalam S., Basu A., Podile A.R. Functional and molecular characterization of plant growth promoting *Bacillus* isolates from tomato rhizosphere // *Heliyon*. – 2020. – V.6. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.e04734.
12. Costa-Gutierrez S.B., Lami M.J., Caram-Di Santo M.C., Zenoff A.M., Vincent P.A., Molina-Henares M.A., Espinosa-Urgel M., de Cristobal R.E. Plant growth promotion by *Pseudomonas putida* KT2440 under saline stress: role of *eptA* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – V. 104. – P. 4577-4592.
13. Vejan P., Abdullah R., Khadiran T., Ismail S., Boyce A.N. Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability // *Molecules*. – 2016. – V. 21. – P. 573-574.
14. Delshadi S., Ebrahimi M., Shirmohammadi A. Influence of plant-growth-promoting bacteria on germination, Growth and nutrients // *Journal of Plant Interactions*. – 2017. – V. 12. – P. 200-208.

15. Yi Y., Li Z., Kuiper O.P. Plant-microbe interaction: transcriptional response of *Bacillus mycoides* to potato root exudates // J. Visual. Exp. – 2018. – V. 137. doi:10.3791/57606.
16. Gordon S.A., Weber R.P. Colorimetric estimation of indoleacetic acid // Plant Physiol. – 1951. – V. 26. – P. 192-195.
17. Cuartero J., Fernández-Muñoz R. Tomato and salinity // Scientia Horticulturae. – 1998. – V.78. – P. 83-125.
18. Shao J., Li S., Zhang N., Cui X., Zhou X., Zhang G., Shen Q. Analysis and cloning of the synthetic pathway of the phytohormone indole-3-acetic acid in the plant-beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 // – 2015. – V. 14. – P. 130.
19. Karnwal A. Production of indole acetic acid by fluorescent *Pseudomonas* in the presence of L-tryptophan and rice root exudates // JOURNAL OF PLANT PATHOLOGY. – 2009. – V. 91. – P. 61-63.
20. Bonaldi M., Chen X., Kunova A., Pizzatti C., Saracchi M., Cortesi P. Front Colonization of lettuce rhizosphere and roots by tagged *Streptomyces* // Microbiol. – 2015. – V.6. – P. 1-10.
21. Kumar A., Singh M., Singh P.P., Singh S.K., Singh P.K., Pandey K.D. Isolation of plant growth promoting rhizobacteria and their impact on growth and curcumin content in *Curcuma longa* L // Biocatalysis and agricultural biotechnology. – 2016. – V. 8. – P. 1-7.

ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОМОНОСПОР В ПОЧВАХ ГОРОДА РОСТОВ-НА-ДОНУ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ

Чайкина А. П., Горовцов А. В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. Проведен мониторинг численности микромоноспор в различные сезоны в городских почвах Ростова-на-Дону, отличающихся по уровню антропогенного воздействия. Определены границы варьирования численности микромоноспор летом (51,5 – 324,4 тыс. КОЕ/г), и осенью (73,7– 484,3 тыс. КОЕ/г). Установлено, что в почвах с большим уровнем антропогенной нагрузки численность микромоноспор увеличивается по сравнению с ненарушенными почвами.

Ключевые слова: *micromonospora*, городские почвы, сообщества микромоноспор.

MICROMONOSPORA POPULATION DYNAMICS IN URBAN SOILS OF ROSTOV-ON-DON WITH DIFFERENT DEGREES OF ANTHROPOGENIC LOAD

Chaykina A. P., Gorovtsov A. V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The abundance of *Micromonospora* in different seasons in urban Rostov-on-Don soils was monitored. The total amount of *Micromonospora* in the soils varied from 51,5 to 324,4 CFU/g in the summer and from 73,7 to 484,3 CFU/g in the autumn. The increase of abundance of *Micromonospora* in anthropogenically transformed soils in contrast with unpolluted soils was found.

Keywords: *Micromonospora*, urban soils, *micromonospora* communities.

Актинобактерии рода *Micromonospora*, относящиеся к редким родам актиномицетов, обычно составляют минорный компонент актиномицетного комплекса и значительно количественно уступают роду *Streptomyces*. Однако в загрязненных почвах микромоноспоры могут начинать доминировать над чувствительными к уровню загрязнения стрептомицетами, занимая освобождаемую последними экологическую нишу [1]. Это может быть связано с высоким уровнем устойчивости представителей данного рода к различным антропогенным поллютантам, в том числе к повышенному содержанию тяжелых металлов в почвах. [2] Городские почвы неоднородны по своим характеристикам. Почвы в разных точках одного города могут быть как относительно слабо затронутыми хозяйственной деятельностью, так и сильно антропогенно нарушенными. Обычно почвы в центральных старых районах города являются наиболее антропогенно-преобразованными, вследствие давности вовлечения в процесс урбанизации и продолжительности постоянного воздействия с высокой степенью интенсивности. Почвы на окраинах городов, в рекреационных зонах, близки по своим параметрам к природным почвам и испытывают минимальное влияние урбанизации [3].

Род *Micromonospora* является сравнительно малоизученным и ранее целенаправленного исследования сообществ микромоноспор почв степной зоны юга России и, в частности, городских почв Ростова-на-Дону не проводилось.

Материалом для исследования послужили пробы городских почв, отобранные в соответствии с общепринятыми методами отбора [4] в августе и ноябре в точках, различных по уровню антропогенной нагрузки.

Изоляцию микромоноспор производили высокоселективным методом выделения редких родов актиномицетов на селективной синтетической питательной среде humic-acid vitamin agar с добавлением антибиотиков для подавления роста нежелательной, в том числе актиномицетной, микробиоты (новобиоцина, налидиксовой кислоты и амфотерицина В в концентрации 20 мг/мл) и предобработке почвы 1,5% раствором фенола [5, 6]. Подсчет колоний производили на 28-й день культивирования.

Площадки в городе, где производили отбор проб, были сгруппированы по признаку степени давности вовлечения в процесс урбанизации и антропогенной нагрузке в три условные группы: центральные, селитебные и минимально нарушенные. В таблице 1 приведена численность микромоноспор в разные сезоны на различных площадках.

Таблица 1 – Численность микромоноспор в различные сезоны

Площадка	Численность летом, тыс. КОЕ/г	Численность осенью, тыс. КОЕ/г
1 (р-н Сельмаш, селитебная зона)	210,61±0,24	163,72±0,29
2 (ул. Горького / ул. Островского, центр)	201,11±0,24	304,80±0,21
3 (ул. Журавлева / ул. Суворова, центр)	324,35±0,19	484,30±0,17
4 (АБиБ / НИИ Физики, селитебная зона)	285,71±0,20	260,18±0,23
5 (Левенцовский р-н, мин. нарушенная зона)	96,38±0,35	164,01±0,29
6 (Верхнетемерницкий р-н, мин. нарушенная зона)	94,82±0,35	73,66±0,43
7 (Новое поселение, селитебная зона)	192,00±0,25	308,96±0,21
8 (Ботанический сад, мин. нарушенная зона)	51,52±0,48	168,34±0,29
9 (П-р Космонавтов / б-р Комарова, селитебная зона)	117,74±0,32	252,06±0,24
10 (Ул. Мечникова, центр)	379,49±0,18	355,41±0,20

Значения численности микромоноспор варьировали в широких пределах. В летний период размах варьирования составлял 51,6–324,4 тыс. КОЕ/г, в осенний период размах варьирования составлял 73,7–484,3 тыс. КОЕ/г. Выраженной сезонной динамики выявлено не было.

Наибольшая численность микромоноспор в оба сезона регистрировалась в центральных участках города (2, 3, 10), характеризующихся более высоким уровнем антропогенной нагрузки и большей давностью вовлечения в процесс урбанизации: процесс формирования городской среды на этих участках происходил довольно давно, и почвы этих районов подвергаются сильной антропогенной нагрузке уже, как минимум, век. Средние значения численности в оба сезона регистрировалась в селитебных зонах (1, 4, 7, 9): эти участки города активно осваивались и застаивались примерно в середине прошлого столетия и

характеризуются предположительно средним уровнем антропогенной нагрузки на почвы. Наименьшие значения численности выявлены на слабоурбанизированных, минимально нарушенных участках со слабым уровнем антропогенной нагрузки, близких по своим характеристикам к естественным почвам или относительно недавно вовлеченных в процесс урбанизации (5, 6, 8). По результатам статистического анализа данных с помощью дисперсионного анализа и критерия Тьюки на уровне значимости $p=0,05$ были выявлены различия между следующими площадками летом: 1 и 3; 1 и 5; 1 и 6; 1 и 8, 1 и 10; 2 и 3; 2 и 8; 2 и 10; 3 и 5; 3 и 6; 3 и 7; 3 и 8; 3 и 9; 4 и 5; 4 и 6; 4 и 8; 4 и 9; 5 и 10; 6 и 10; 7 и 8; 7 и 10; 8 и 10; 9 и 10.

Таким образом значения численности по площадкам внутри каждой группы центральных, селитебных и минимально нарушенных участков достоверно не отличались друг от друга, но отличались от численности на площадках других групп практически во всех случаях.

Установлено, что численность микромонопор увеличивается в антропогенно нарушенных почвах, давно вовлеченных в процессы урбанизации. В почвах, вовлеченных в процесс урбанизации относительно недавно и в ненарушенных почвах, близких к естественным, численность микромонопор минимальна.

Исследование выполнено в лаборатории «Здоровье почв» Южного федерального университета при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2022-1122 и при поддержке Программы стратегического академического лидерства Южного федерального университета.

Библиографический список

1. Ашихмина Т.Я. и др. Микроорганизмы как агенты биомониторинга и биоремедиации загрязненных почв – Киров: Науч. изд-во ВятГУ. 2018. 254 с.
2. Schmidt A. и др. In silico prediction of potential metallothioneins and metallothioneins in actinobacteria // J Basic Microbiol. 2010. Т. 50. № 6. Р. 562–569.
3. Капралова О.А. Влияние урбанизации на эколого-биологические свойства почв г. Ростова-на-Дону // Инженерный Вестник Дона. 2011. Т. 18. №. 4. С. 326–331.
4. ГОСТ 17.4.3.01 – 83. «Общие требования к отбору проб почвы».
5. Hayakawa M. и др. New methods for the highly selective isolation of Micromonospora and Microbispora from soil // J Ferment Bioeng. 1991. Т. 72. № 5.
6. Hayakawa M., Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes // Journal of Fermentation Technology. 1987. Т. 65. № 5.

ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ НА *TRITICOSECALE WITTM. EX A. CAMUS*

Боталова К.И., Черных А.Д., Боталов А.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Окислительный стресс растений, вызванный ощелачиванием или подкислением корневой среды, находится в центре внимания современных исследований, т.к. изменение реакции почвенной среды – это распространенное последствие агрогенной деятельности. Цель работы – изучить динамику содержания флавоноидов и каротиноидов в листьях Тритикале озимой при щелочном и кислотном стрессах. После 7 дней выращивания на вермикулите реакцию корневой среды изменили путем внесения глицин-НСl (рН=3) и ацетатного буфера (рН=10). Динамику флавоноидов и каротиноидов в листьях наблюдали в течение 24 ч. Замеры длины и массы растений провели через 24 ч после воздействия стрессовых растворов. В условиях кислой и щелочной корневой среды растения испытывали угнетение, что проявилось в снижении длины и массы надземной части. Установлены изменения в содержании исследуемых компонентов антиоксидантной защиты. Отмечено повышенное содержание каротиноидов при кислотном стрессе. Содержание флавоноидов в листьях *Triticosecale Wittm. ex A. Camus* уменьшалось по сравнению с контролем при изменении рН корневой среды в обоих вариантах опыта, по-видимому, эти соединения не участвуют в устойчивости тритикале к кислотному и щелочному стрессу.

Ключевые слова: *Triticosecale Wittm. ex A. Camus*, рН, антиоксидантная система, флавоноиды, каротиноиды.

INFLUENCE OF ACIDITY AND ALKALINITY OF THE ROOT ENVIRONMENT ON SOME INDICATORS OF THE ANTIOXIDANT SYSTEM ON *TRITICOSECALE WITTM. EX A. CAMUS*

Botalova K.I., Chernykh A.D., Botalov A.A.

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National
Research University, Perm, Russia.*

Abstract. Plant oxidative stress caused by alkalization or acidification of the root environment is the focus of modern research, because changing the response of the soil environment is a common consequence of agrogenic activities. The aim of the work is to study the dynamics of the content of flavonoids and carotenoids in the leaves of winter Triticale under alkaline and acid stress. After 7 days of cultivation on vermiculite, the reaction of the root medium was changed by adding glycine-HCl (pH=3) and acetate buffer (pH=10). The dynamics of flavonoids and carotenoids in the leaves was observed for 24 h. The length and weight of plants were measured 24 h after exposure to stress

solutions. Under conditions of acidic and alkaline root environment, plants experienced oppression, which manifested itself in a decrease in the length and mass of the aerial part. Changes in the content of the studied components of antioxidant protection have been established. An increased content of carotenoids was noted during acid stress. The content of flavonoids in the leaves of *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus decreased compared with the control when the pH of the root medium changed in both variants of the experiment; apparently, these compounds do not participate in the resistance of triticale to acid and alkaline stress.

Keywords: *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus, pH, antioxidant system, flavonoids, carotenoids.

Введение. Актуальность проблемы устойчивости растений к разной реакции почвенной среды связана не только с существованием кислых и щелочных почв, малопригодных для возделывания сельскохозяйственных растений. Изменение реакции почвенной среды – это распространенное последствие агрогенной и техногенной деятельности человека. Изменить pH почвы можно внесением физиологически кислых минеральных удобрений; само отчуждение урожаев с полей приводит к постепенному обеднению почв элементами, в том числе и основаниями. В связи с этим, щелочной и кислотный стресс растений, вызванный изменением pH корневой среды находятся в центре внимания современных исследований.

Классические представления о влиянии реакции корневой среды связаны с особенностями минерального питания растений, конкурентными отношениями ионов при поглощении корнями [1]. Сейчас все более очевидно, что в основе адаптации и кросс-адаптации растений к неблагоприятным условиям находится эффективное функционирование антиоксидантной защитной системы. Все флавоноиды в той или иной степени участвуют в антиоксидантной защите клеток. В соответствии с общепринятой точкой зрения антиоксидантные свойства флавоноидов объясняются их способностью служить ловушками для свободных радикалов, а также хелатировать ионы металлов, участвующих в радикальных процессах [2]. Каротиноиды также рассматривают в качестве важного компонента антиоксидантной системы растений [3]. В ряде научных экспериментов наблюдали накопление каротиноидов в растениях под воздействием неблагоприятных факторов среды [4].

Цель работы – проследить влияние щелочной и кислой реакции корневой среды на состояние защитных систем в листьях тритикале озимой. В задачи исследований входило изучить морфометрические показатели (длина и масса проростков); определить содержание флавоноидов и каротиноидов при внесении кислого (pH=3) и щелочного (pH=10) раствора в корневую среду.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали Тритикале озимую сорт Башкирская короткостебельная (*Triticosecale* Wittm. ex A. Camus).

Предварительно замоченные семена высадили в умеренно увлажненный вермикулит в контейнеры размером 16 x 12 x 7 см. Растения выращивали в течение 7 дней. На восьмой день на корневую среду растений воздействовали стресс-фактором – кислым или щелочным раствором; контрольный вариант поливали дистиллированной водой. Кислую среду (pH=3) создавали глицин-HCl буфером, щелочную (pH=10) – ацетатным буфером. Вермикулит устойчив к кислотным и щелочным воздействиям, поэтому в течение 24 ч наблюдений он не будет служить источником минеральных веществ. Реакцию среды в вермикулите контролировали путем измерения на иономере «Экотест-120» в течение суток; через 24 ч она оставалась устойчивой. Отбор растительных проб провели через 0,5, 2, 4 и 24 ч после

изменения рН. Длину и массу растений замерили по вариантам опыта в 30-кратной повторности через 24 ч после изменения рН корневой среды; значимость различий между вариантами оценили с помощью критерия Стьюдента ($P < 0,05$).

Каротиноиды определяли в сыром растительном материале. После внесения стрессовых растворов проводили отбор проб. Фотосинтетические пигменты экстрагировали 80%-м ацетоном, количество каротиноидов определяли при длине волны 440 нм на спектрофотометре («СФ-2000», Россия). Содержание каротиноидов рассчитывали по формуле D. Wettstein (1957) [5] на единицу сырой массы листьев.

Определение содержания флавоноидов проводили в сухом материале. После внесения стрессовых растворов в каждый срок учета проводили сбор всей растительной массы контейнера, далее ее фиксировали при температуре 105°C и досушивали при 60°C. Из сухой массы отбирали 20–30 растений, растирали и брали навеску. Флавоноиды извлекали 70% раствором этанола; суммарное их содержание установили методом спектрофотометрии продуктов взаимодействия с 5% спиртовым раствором $AlCl_3$ при длине волны 415 нм.

Биологическая и аналитическая повторность определения показателей – трехкратная. Значимость различий между вариантами оценили дисперсионным непараметрическим методом (критерий Крускал-Уоллиса); значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше.

Результаты и обсуждение.

Влияние рН корневой среды на длину и массу растений.

Наблюдения за длиной и массой надземной части растений показали, что в течение суток под воздействием кислого и щелочного растворов у тритикале озимой отмечено снижение длины, по сравнению с контрольным вариантом (рис.1.). В варианте опыта с кислой корневой средой отмечается уменьшение растений по сравнению с контрольным и щелочным вариантом. При внесении щелочного раствора у растений не отмечали значимых изменений длины по сравнению с контролем.

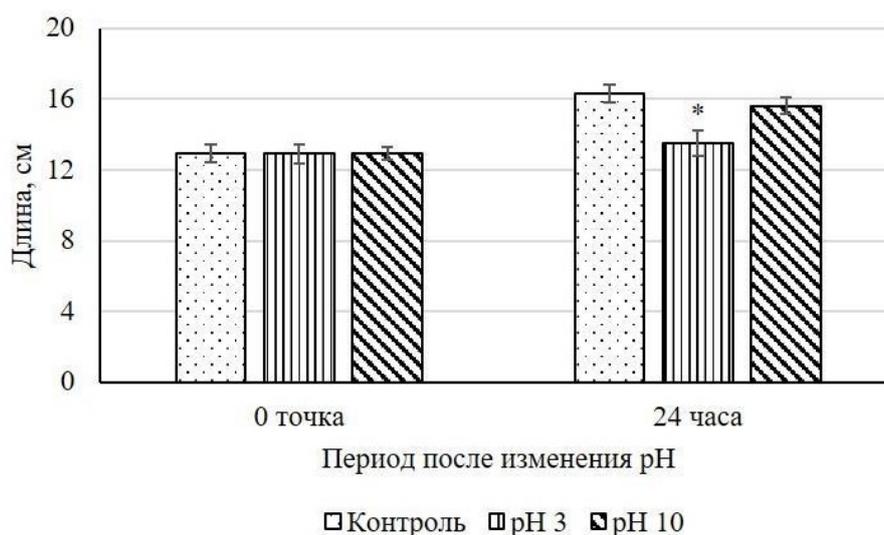


Рисунок 1 – Влияние щелочности и кислотности корневой среды на длину растений тритикале.

Подобная тенденция отмечена в изменениях сырой массы надземной части тритикале (рис.2). В условиях кислотного стресса отмечается уменьшение массы надземной части

растений по отношению к контролю и щелочному варианту. Масса растений в щелочном варианте не отличалась от контрольных растений.



Рисунок 2 – Влияние щелочности и кислотности корневой среды на массу растений тритикале.

Изменение массы растений, по-видимому, обусловлено нарушением функций корневой системы; в экспериментах с разными растениями в условиях кислотного стресса наблюдали уменьшение массы и длины корней, нарушения структуры и функций корневых клеток [6]. Установлено также, что уменьшение рН корневой среды способствовало снижению гидравлической проводимости мембран ризодермы проростков ячменя [7]. Таким образом, результаты исследований показали, что в условиях кислотного стресса тритикале испытывает угнетение, выраженное в снижении высоты и массы растений.

Динамика содержания флавоноидов. Флавоноиды выполняют определенную защитную роль в неблагоприятных условиях среды [8]. Благодаря химической природе они способны выступать в реакции перекисного окисления [9]. В наших экспериментах при изменении рН корневой среды в тритикале наблюдали существенное снижение содержания флавоноидов по сравнению с растениями в контрольном варианте опыта (рис. 3.).

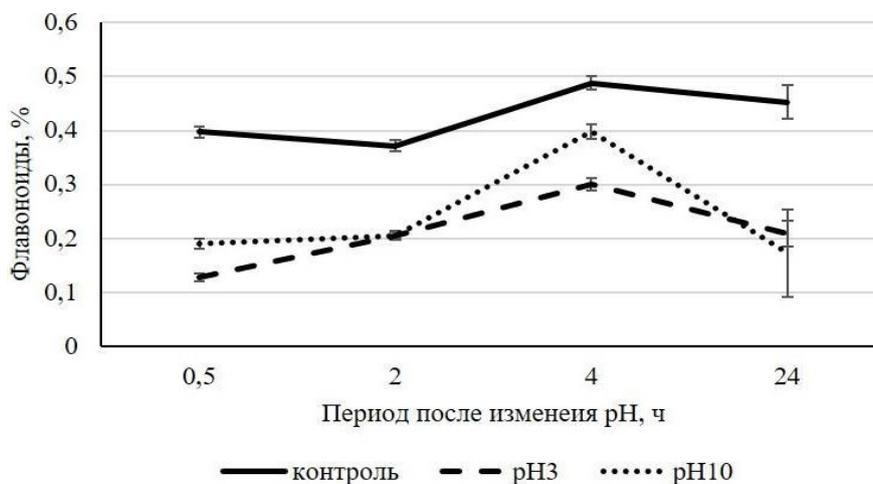


Рисунок 3 – Изменение содержания флавоноидов после воздействия кислотным (рН3) и щелочным (рН10) растворами на корневую среду.

По-видимому, такое снижение в содержании флавоноидов свидетельствует о том, что эти соединения не принимают активного участия в защитных реакциях у тритикале озимой при неблагоприятной реакции корневой среды.

Динамика содержания каротиноидов. Каротиноиды относят к «вспомогательным» фотосинтетическим пигментам, присутствующим во всех автотрофных организмах, одновременно им отводится важная роль и в защите от АФК. Они быстро гасят ^1O , а также могут адсорбировать излишки энергии из молекул хлорофиллов, которые находятся в возбужденном состоянии, таким образом предотвращая образования АФК. Все это свидетельствует о том, что каротиноиды, локализованные в основном в хлоропластах, защищают фотосинтетический аппарат от воздействия синглетного кислорода и других АФК [10-12]. В нашем эксперименте в листьях тритикале наблюдали увеличение содержания каротиноидов при кислотном стрессе в первые сроки наблюдений (0,5 ч; 2 ч; 4 ч). Затем содержание каротиноидов снизилось, по сравнению с контрольным вариантом, но спустя сутки наблюдали значительное увеличение в содержании пигмента, по сравнению с контролем в условиях щелочного стресса (рис.4.).

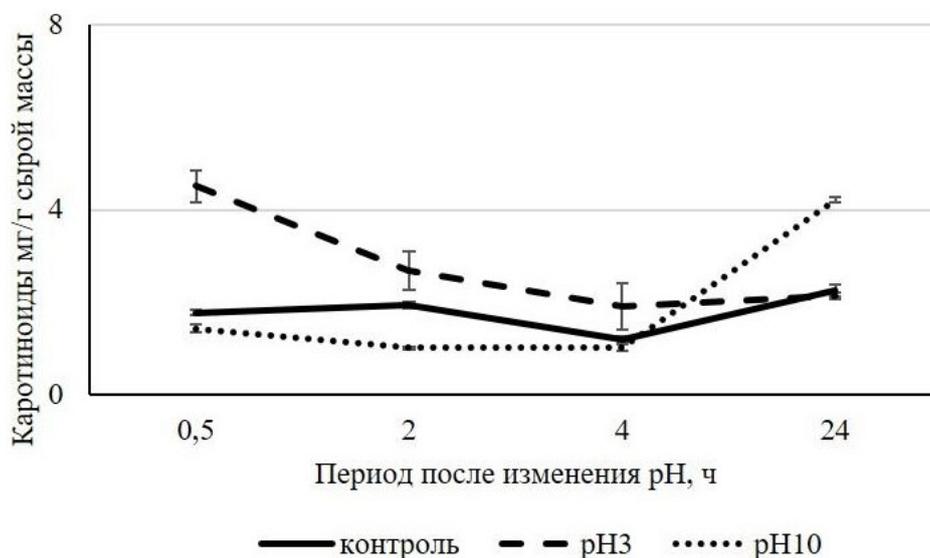


Рисунок 4 – Изменение содержания каротиноидов после воздействия кислым (pH3) и щелочным (pH10) растворами на корневую среду.

Каротиноиды рассматривают в качестве важного компонента антиоксидантной системы растений [3]. В ряде научных экспериментов наблюдали накопление каротиноидов в растениях под воздействием неблагоприятных факторов среды [4]. В наших опытах подтвердилось возможное участие каротиноидов в адаптации растений в условиях кислотного стресса.

Закключение. Через сутки после стрессового воздействия на корневую среду тритикале озимой отмечено торможение роста и снижение массы растений при кислой реакции корневой среды.

У тритикале озимой флавоноиды не участвуют в активной антиоксидантной защите, т.к. было отмечено снижение содержания данных веществ при обоих вариантах стресса и во все сроки измерений по сравнению с контролем.

Каротиноиды участвовали в процессе адаптации к кислотному стрессу на первичном этапе адаптации, при щелочном стрессе у тритикале озимой наблюдается повышение содержания каротиноидов лишь спустя сутки после стресс воздействия.

Библиографический список

1. Сабинин Д.А., Колотова С.С. Характер поступления зольных элементов в растение // Результаты работ агрохимического отдела Пермской опытной сельскохозяйственной станции. Пермь, 1927. Вып. 1. С. 91–113.
2. Es-Safi N.E., Ghidouche S., Ducrot P.H. Flavonoids: hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity // *Molecules*. 2007. V. 12 (9). P. 2228–2258.
3. Прадедова Е.В., Ишеева О.Д., Саляев Р.К. Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений // *Физиология растений*. 2011. Т. 58. № 2. С. 177–185.
4. Курганова Л.Н., Веселов А.П., Гончарова Т.А., Сеницына Ю.В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная система защиты в хлоропластах гороха при тепловом шоке // *Физиология растений*. 1997. Т. 44. № 5. С. 725–730.
5. Гавриленко В.Ф., Жигалова Т.В. Большой практикум по фотосинтезу. М.: Академия, 2003. 254 с.
6. Shavrukov Y., Hirai Y. // *J. Exp. Bot.* 2016. Vol. 67. pp. 15–30.
7. Ктиторова И.Н., Скобелева О.В. Снижение гидравлической проводимости мембран клеток ризодермы при дефиците нитрата связано с закислением у поверхности корня // *Физиология растений*. 2008. Т. 55. № 5. С. 690–698.
8. Креславский В. Д., Лось Д. А., Аллахвердиев С. И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.
9. Aslam R., Bostan N., Nabgha-e-Amen, Maleeha M., Safdar W. // *J. Medical Plant Res.* 2011. Vol. 5, pp. 7108–7118.
10. Мерзляк М.Н. Активный кислород и жизнедеятельность растений // *Соросовский образовательный журнал*. 1999. № 9. С. 20–27.
11. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: КДУ, 2007. 137 с.
12. Креславский В. Д., Лось Д. А., Аллахвердиев С. И., Кузнецов Вл. В. Сигнальная роль активных форм кислорода при стрессе у растений // *Физиология растений*. 2012. Т. 59. № 2. С. 163–178.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛИГНИНА ВО ВТОРИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ ЕЛИ

Шутский Н.А., Вашукова К.С., Покрышкин С.А., Аникеенко Е.А.,
Пиковской И.И., Косяков Д.С., Чухчин Д.Г.

*Северный (Арктический) федеральный университет им. М.В. Ломоносова, Архангельск,
Россия*

Аннотация. Исследование посвящено изучению дифференцирующей ксилемы ели. Применены методы ВЭЖХ, СЭМ, пиролиза с ГХ-МС, МАЛДИ и химического анализа. Результаты исследования подтверждают гипотезу о том, что лигнин в виде лигноуглеводного комплекса (ЛУК) формируется не в клеточной стенке, а внутри клетки. Формирование происходит в аппарате Гольджи и транспортируется с помощью везикул. Разработана модель структуры вторичной клеточной стенки, состоящей из целлюлозных волокон, окруженных лигноуглеводными шарообразными комплексами.

Ключевые слова: вторичная клеточная стенка, лигнин, углеводы, ксилема.

LOCALIZATION OF LIGNIN IN THE SECONDARY CELL WALL OF SPRUCE

Shutskiy N.A., Vashukova K.S., Pokryshkin S.A., Anikeenko E.A.,
Pikovskoi I.I., Kosyakov D.S., Chukhchin D.G.

Northern (Arctic) Federal University, Arkhangelsk, Russia

Abstract. The research work is devoted to the study of the differentiating xylem of spruce. HPLC, SEM, pyrolysis with GC-MS, MALDI and chemical analysis methods were applied. The results of the study confirm the hypothesis that lignin in the form of a lignocarbhydrate complex is formed not in the cell wall, but inside the cell. Formation occurs in the Golgi apparatus and is transported by vesicles. A model of the structure of the secondary cell wall, consisting of cellulose fibers surrounded by lignocarbhydrate spherical complexes, has been developed.

Keywords: secondary cell wall, lignin, carbohydrates, xylem.

Как известно, лигноуглеводная матрица является суперпозицией взаимопроникающих сеток, образованных водородными, углерод-углеродными, эфирными связями лигнина и лигноуглеводными связями [1]. Дополнительную прочность композиции придают механические зацепления сегментов макромолекул лигнина и гемицеллюлоз, как между собой, так и с целлюлозой.

В настоящее время предложено несколько моделей представления вторичной клеточной стенки. При помощи 3D-моделирования Joseph Jakes с соавторами предоставили вариант, в котором целлюлозные волокна расположены практически параллельно и облеплены гемицеллюлозами, а лигнин, не имеющей четкой структуры, со всех сторон окружает волокна [2]. По другим теориям, целлюлозные волокна укладываются в строгом направлении, и их

окружает линейный лигнин, а гемицеллюлозы представлены в виде тонких хаотичных сшивок между целлюлозой и лигнином [1,2].

Швейцарские исследователи полагают, что целлюлозные волокна скомпонованы в виде параллелепipedных блоков, которые окружены гемицеллюлозной сеткой. Лигнин же представлен тонкой цепью, связанной с гемицеллюлозой, расположенной параллельно целлюлозным волокнам [3]. В графических схемах, изображающих данные структуры, плохо учитывается фактическое количественное соотношение целлюлозы, гемицеллюлоз и лигнина в клеточной стенке.

На полученных ранее нами снимках виден рельеф, основанный параллельно уложенными микрофибриллами, на поверхности которых находятся сферические частицы диаметром 20-50 нм (рисунок 1). Таким образом, нецеллюлозные компоненты распределены не равномерно, а локализованы в этих частицах.

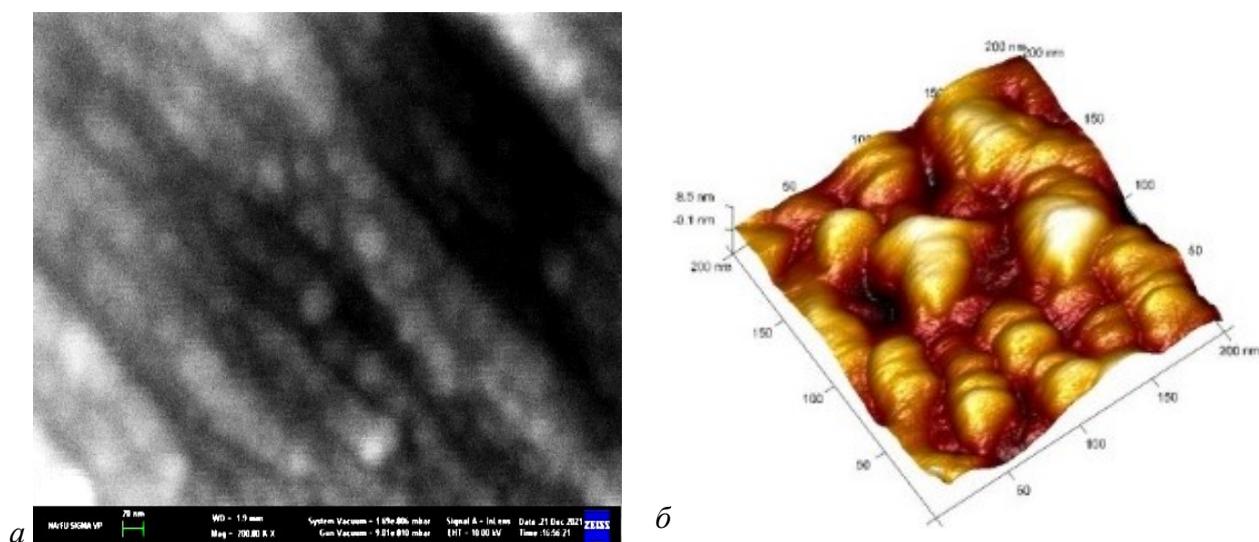


Рисунок 1 – СЭМ-снимок скола S1 слоя клеточной стенки ели (а); АСМ-снимок скола S1 слоя клеточной стенки ели (б).

Несомненно, что синтез полисахаридов из моносахаридов происходит за счет энергии. С этой целью используются внутриклеточные вещества – АТФ, ГДФ, УДФ, ЦТФ. Поэтому синтез гемицеллюлоз вне клетки невозможен. Целлюлоза синтезируется розетками на клеточной мембране из УДФ-глюкозы. Гемицеллюлозы и пектиновые вещества синтезируются в аппарате Гольджи и выплёскиваются на клеточную стенку из везикул Гольджи [4].

По современным представлениям лигнин синтезируется в клеточной стенке. В клетках, синтезирующих лигнин, наблюдается высокая концентрация гликозидов фенилпропановых структурных единиц (ФПСЕ) [6]. Предложена двухэтапная модель одревеснения трахеид хвойных деревьев. Во-первых, секреция, опосредованный аппарат Гольджи откладывает монолигнолы в клеточную стенку, где они полимеризуются в углах клеток и средней пластинке. Во-вторых, лизис клеток высвобождает накопленные вакуолярные монолигнольные гликозиды в стенку, где они дегликозилируются, и на их полимеризацию влияет окружающая среда стенки, включая лигнин, отложенный ранее [7].

Синтез лигнина предполагает эмиссию гликозидов-предшественников лигнина из клетки, ферментативное отщепление глюкозы от сирингина и кониферина, воздействие

дегидрогеназ на ФПСЕ и последующее их случайное сочетание. Для внеклеточного синтеза необходима эмиссия мономеров лигнина, ферментов дегидрогеназ, наличие внеклеточного окислителя (O_2 или H_2O_2), принимающего водород от дегидрогеназ. При этом непонятно как образуется химическая связь лигнина и гемицеллюлоз, которая требует затрат энергии. Энергия в виде АТФ вне клетки – маловероятное событие и воспринимается растением исключительно как сигнал о повреждении [8]. Также вызывает сомнение возможность перемещения «крупной» молекулы фермента в плотной клеточной стенке, стянутой водородными связями.

Вероятность ФПСЕ достигнуть точек, где синтезируется лигнин, мала и большая часть этих веществ будет бесцельно перемещаться по растению. Все это нерационально и с энергетической точки зрения.

Нами предложена гипотеза внутриклеточного синтеза лигнина, которая позволит использовать энергию отщепленного дегидрогеназами водорода, передавая его, например, никотинамидадениндинуклеотиду (NAD) и далее по стандартной «дыхательной» цепочке с получением АТФ. При этом исключается необходимость внеклеточного функционирования дегидрогеназ и ферментов, образующих лигноуглеводную связь. Лигноуглеводный комплекс будет синтезирован, как гемицеллюлозы, каллоза и пектины в цистернах аппарата Гольджи и «выпущен» с помощью везикул (или пузырьков) на внутреннюю поверхность клеточной стенки параллельно с укладкой микрофибрилл целлюлозы.

В аппарате Гольджи образуется мицелла, содержащая лигнинные структуры внутри, а углеводные снаружи. Сначала гликозиды типа кониферина или сирингина формируют мицеллу, а затем идет их гидролиз, полимеризация и поликонденсация с образованием ЛУК. Возможен как гидролиз гликозидов, так и образование новых лигнин-углеводных связей. Последовательный синтез сначала лигнина, а затем гемицеллюлоз способствует формированию водорастворимой структуры. Присутствие снаружи углеводов позволяет «шарику» ЛУК иметь гидрофильную поверхность и средство к целлюлозным микрофибриллам клеточной стенки.

В традиционном понимании лигнин нерастворим в воде и образуется после смерти клеток. Доказательством внутриклеточного синтеза лигнина будет являться его наличие в водном экстракте формирующейся ксилемы во фракциях частиц с размерами сопоставимыми с размерами пузырьков Гольджи, а также с фосфолипидной оболочкой или без нее. При экстракции могут быть выделены внутриклеточные ЛУК в везикулах Гольджи и ЛУК на поверхности раздробленных клеточных стенок. Содержание последних должно сильно зависеть от степени деструктированности клеточных стенок.

Методическая часть

Объект исследования и стратегия выделения лигноуглеводных комплексов

Для данного исследования были собраны образцы ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), произрастающей на границе ее ареала в России, в Архангельской области (64,46 ° с.ш., 40,94 ° в.д.). Подробное описание исследуемого образца и получение экстракта ксилемы ели мы представляли ранее [9].

Активно функционирующие клетки содержат значительное количество рибосом. Устранение мешающего влияния рибосом проводили путем обработки экстракта ксилемы специфическим ферментом – РНК-азой. Экстракт ксилемы ели (10 мл) смешивали с готовым раствором РНК-азы (RNase A, 17500 units, QIAGEN) в объеме 100 мкл. Смесь выдерживали в течение 120 минут при комнатной температуре и периодическим перемешиванием. После чего

образцы центрифугировали 10 минут. Надосадочную жидкость подвергали дальнейшему анализу.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Фракцию, содержащую лигноуглеводные комплексы, получали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Использовали колонку BioSep-SEC-S4000 с размером пор 50 нм. В качестве элюента использовали 0,1 М ацетатный буфер (рН 5.0) с азидом натрия. Скорость потока составляла 10 мл/мин [9].

Сканирующая электронная микроскопия

Снимки фракции получали с использованием сканирующего электронного микроскопа Sigma VP Zeiss (SEM) (10 кВ ускоряющее напряжение, InLens детектор, апертура 7,5 мкм). Для увеличения контрастности изображений поверхность сухой пробы покрывали слоем Au-Pd сплава 80:20 толщиной до 5 нм с помощью напылительной установки Q150T ES (Quorum).

Пиролиз и ГХ-МС

Анализ проб проводился методом пиролитической газовой хроматомасс-спектрометрии с использованием пиролизера EGA/PY-3030D (Frontier Lab, Япония) и газового хроматомасс-спектрометра QP2010Plus (Shimadzu, Япония). Навеска проб для пиролиза составляла 1,8-2,7 мг. Процедуру пиролиза проводили при температуре 50 – 600 °С со скоростью 50 °С/мин.

Разделение продуктов пиролиза проводили на капиллярной хроматографической колонке, тип HP-5ms с длиной 30 м, внутренним диаметром 0,25 мм и толщиной фазы 0,25 мкм. В качестве газа-носителя использовали гелий со скоростью 1 мл/мин, при постоянном давлении 45,6 кПа. Температурная программа термостата включала начальную температуру 40°C с выдержкой 2 мин. Подъем температуры осуществляли со скоростью 3°C/мин до 320°C и выдерживали 5 мин. Режим работы масс-детектора: электронный удар 70 эВ; сканирование диапазона масс 35-600 Да со скоростью 2000 а.е.м./с.

МАЛДИ

Исследования выполнены с использованием МАЛДИ масс-спектрометра – гибридного (квадрупольная ионная ловушка и времяпролетный масс-анализатор с рефлектроном, QIT-TOF) Axima Resonance (Shimadzu-Biotech, Великобритания). Прибор оснащен азотным УФ-лазером ($\lambda=337$ нм) с продолжительностью импульса 3 нс и энергией вспышки 130 мкДж. Для получения масс-спектров аккумулялировали данные 200 вспышек лазера, с разных точек внутри каждой лунки. Исследования проводили в режиме регистрации положительно заряженных ионов в диапазоне m/z от 850 до 5000.

В случае MSn экспериментов количество вспышек увеличивали до 1 тыс. Для изоляции ионов-прекурсоров в QIT-TOF использовали разрешение 1000 ($M/\Delta M$), соответствующее ширине выделяемого диапазона масс 1 Да при m/z 1000. В качестве буферного газа для охлаждения ионов в ионной ловушке использовали гелий (99,9999 %).

Нитробензольное окисление

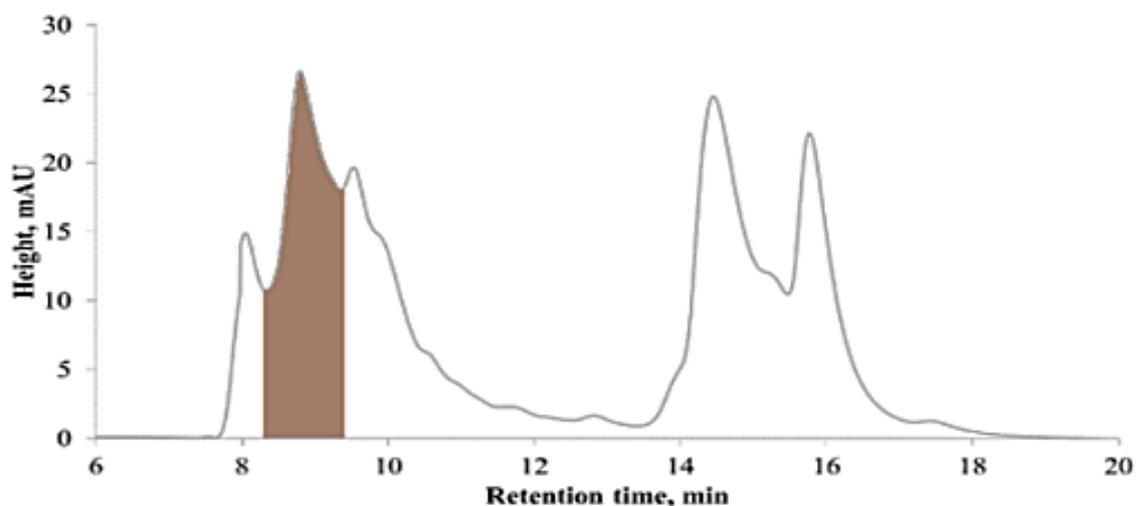
Нитробензольное окисление проводили согласно методике, подробно описанной [10]. Разделение продуктов нитробензольного окисления проводили в изократическом режиме на хроматографической колонке Zorbax Eclipse Plus C18, 3×150 мм, с размером зерна сорбента 3,5 мкм (Agilent, США). Идентификацию целевых продуктов нитробензольного окисления (4-гидроксибензальдегида, ванилина и сиреневого альдегида) осуществляли путем сравнения времен удерживания с временами удерживания их аналитических стандартов, а также путем масс-спектрометрических исследований. Соотношение сиригильных, гваяцильных и

гидроксифенильных единиц определяли путем сравнения площадей соответствующих хроматографических пиков.

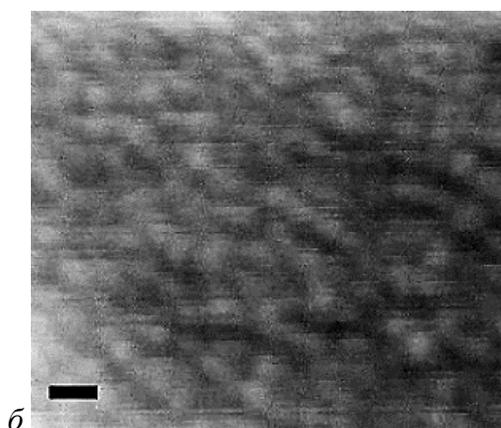
Экспериментальная часть

Фракция, соответствующая второму пику, характеризующему размеры частиц от 20 до 50 нм, была выбрана для исследования как фракция, содержащая ЛУК. Это позволило отсеять крупные частицы с размером более 50 нм (разрешающая способность колонки) и мелкие частицы, диаметр которых менее 20 нм (рисунок 2а). Выделенную фракцию промывали дистиллированной водой в концентраторах Microcon YM-100, пропуская частицы менее 100 кДа. СЭМ-фото промытого образца представлен на рисунке 2б.

Согласно полученным размерам выделенных шарообразных частиц (20 нм) и плотности около 1500 кг/м^3 , масса этих частиц составляет около 4 МДа.



а



б

Рисунок 2 – Хроматограмма эксклюзионной ВЭЖХ экстракта формирующейся ксилемы ели (а). Выделена коричневым цветом фракция, содержащая ЛУК; СЭМ-фото материала выделенной хроматограммы (б) (8,3-9,3 мин), масштабная линейка – 20 нм.

При пиролизе выделенной фракции было обнаружено наличие таких продуктов распада, как фенол, крезол, гваякол и винил гваякол, дает нам основание полагать о присутствии лигнина в выделенной фракции. Также было задетектированы такие продукты, как фуран, фурфурол, ангидрид целлобиозы и др., которые позволяют судить о наличии полисахаридов в образце. В продуктах пиролиза остальных пиков подобные компоненты не были обнаружены.

Таблица 2 – Относительное содержание детектируемых веществ продуктов пиролиза фракции по компонентам

	Компонент	Молекулярная масса, г/моль	Относительное содержание, %
Продукты распада полисахаридов	Фуран	68,07	1,0
	Диметилфуран	96,13	0,3
	Фуранон	128,12	0,4
	Фурандион	116,07	1,6
	Метилфуран	82,10	6,2
	Фурфурол	96,08	1,6
	Фуранметанол	98,10	0,4
	Диметилгидрокси фуранон	121,14	3,5
	Ангидрид целлобиозы	324,29	8,3
	Диангидрид глюкопиранозы	144,15	5,6
	Гидроксиметилфурфурол	126,11	1,6
	Левоглюкозан	162,14	9,9
	Маннофуранозид, метил	276,28	34,4
Продукты распада лигнина	Фенол	94,11	46,1
	Крезолы, суммарно	108,14	3,8
	Гваякол	124,14	10,1
	Винил гваякол	151,18	2,3

При внеклеточном синтезе лигнина и последующим измельчением клеточных стенок должно получиться очень широкое распределение ЛУК по молекулярным массам. В водорастворимой фракции при pH=5 может оказаться только низкомолекулярный компонент. Фактически, по данным пиролитической ГХ-МС, осколки лигнина и полисахаридов обнаружены только в выделенной фракции с диаметром частиц сопоставимым с диаметром секретируемых клеткой везикул Гольджи. В этой фракции могут находиться как лигноуглеводные комплексы, оторвавшиеся от поверхности клеточных стенок, так и внутриклеточные ЛУК в фосфолипидной оболочке. Для поддержки гипотезы внутриклеточного синтеза лигнина и отрицания внеклеточного это не имеет принципиального значения. Сам факт растворимости этих частиц с массой в несколько миллионов Дальтон в ацетатном буфере при pH=5 свидетельствует о том, что на их поверхности может быть только гидрофильные вещества (углеводная часть ЛУК или полярная часть фосфолипидов).

Полученный масс-спектры (рисунок 3а) исследуемой фракции содержит различимые сигналы нескольких заряженных ионов с молекулярными массами до 1 кДа. Среди них доминирует пик иона с $m/z=907,9$. Полученный МС2-спектр показывает, что доминирующий пик разделился на 2 отчетливых пика (621,6 и 903,9). По разности отношений определили ион ($m/z=286,34$), который может соответствовать только лигноуглеводному соединению (рисунок 3б). Результат подтверждает предложенную нами гипотезу о присутствии водорастворимого лигноуглеводного комплекса в выделенной фракции экстракта ксилемы ели.

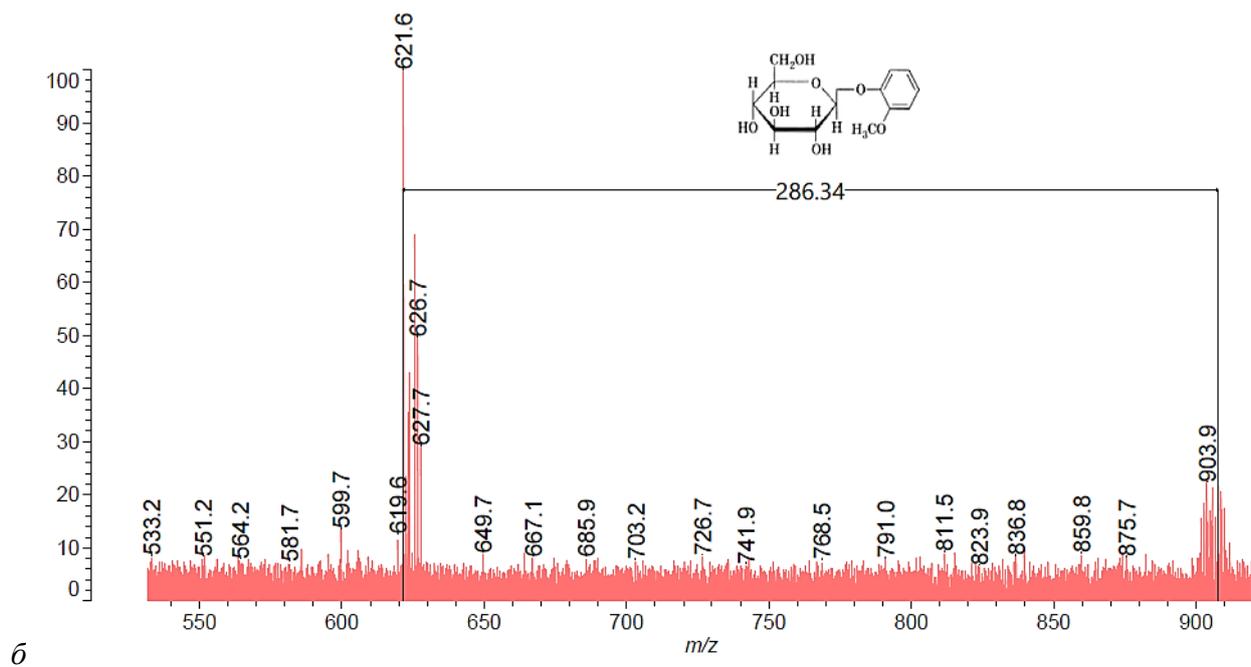
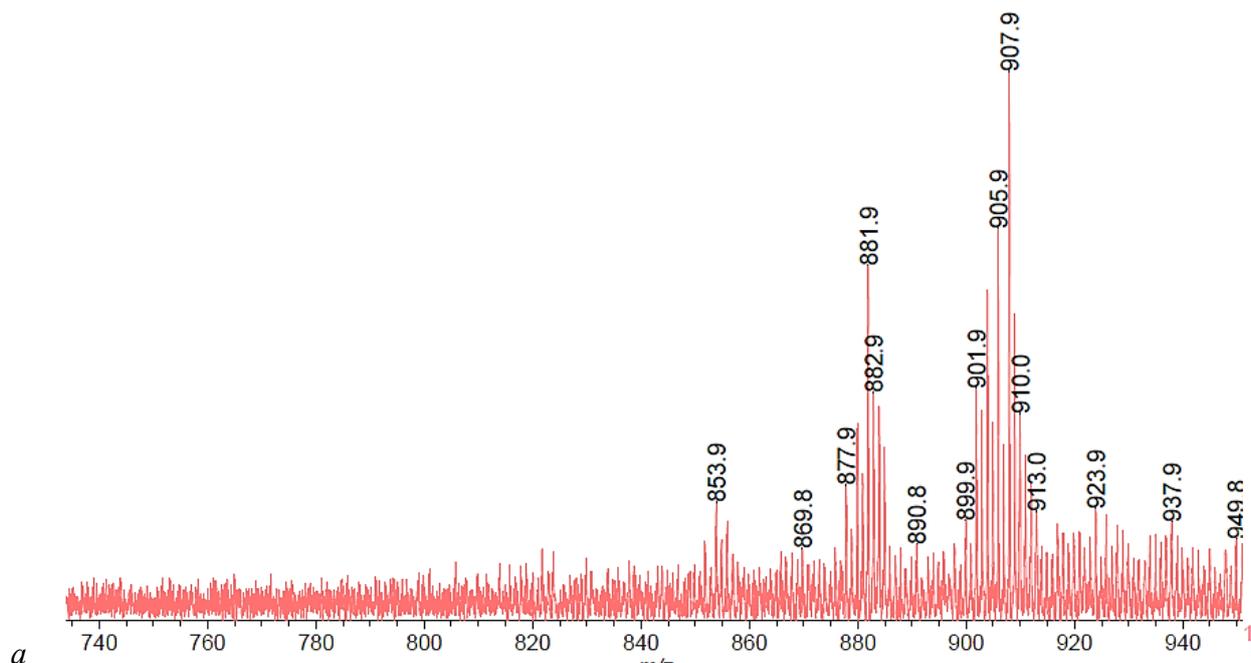


Рисунок 3 – Масс-спектры выделенной фракции экстракта ксилемы ели:
a – MC1; *б* – MC2.

По результатам хроматографического анализа продуктов нитробензольного окисления изучаемой фракции экстракта ксилемы ели были детектированы такие соединения, как 4-гидроксибензальдегид ($m/z=121,0296$; 68%) и ванилин ($m/z=151,0400$; 32%).

Исходя из этого предполагается, что лигнин в виде лигноуглеводного комплекса формируется не в клеточной стенке, а внутри клетки, и формирование ЛУК происходит в везикулах Гольджи, которые «выплескиваются» на внутреннюю поверхность клеточной стенки одновременно с отложением микрофибрилл целлюлозы.

Вследствие полученных результатов нами была разработана модель структуры вторичной клеточной стенки (рисунок 4), состоящей из целлюлозных волокон, окруженных

лигноуглеводными шарообразными комплексами, имеющие углеводную оболочку снаружи и ароматическое ядро внутри.

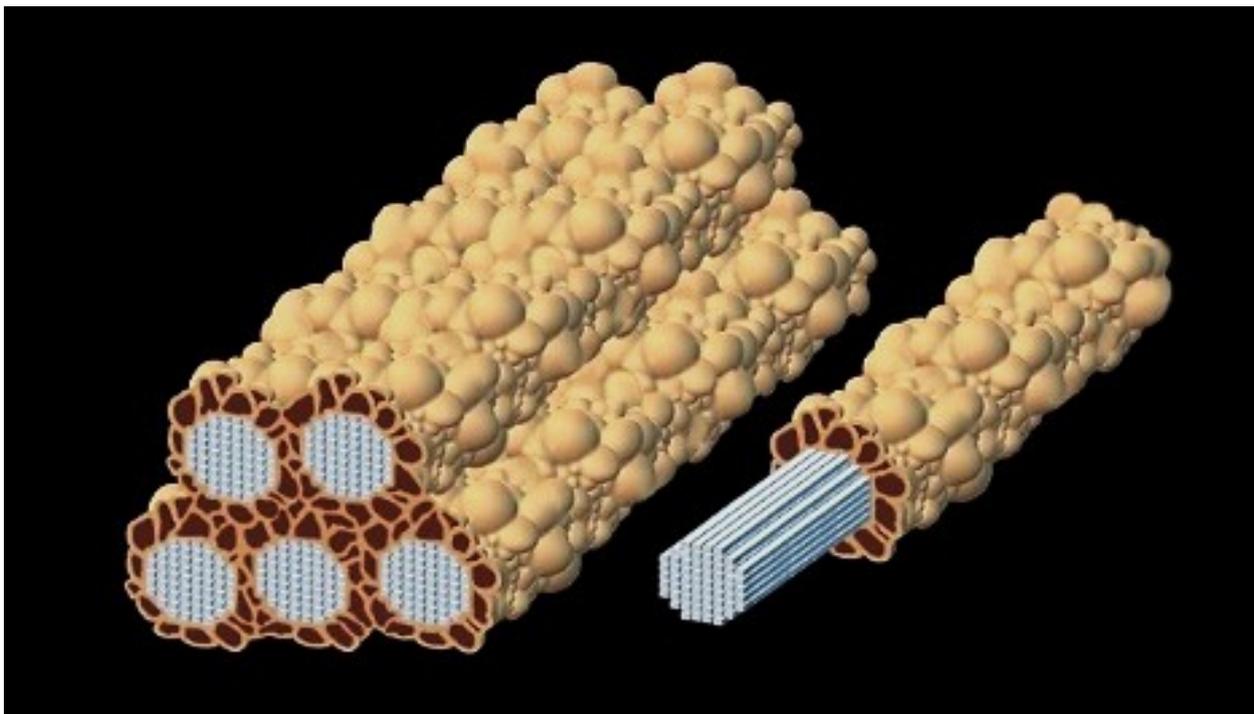


Рисунок 4 – Новая модель структуры вторичной клеточной стенки.

Работа поддержана грантом РФФИ, грант № 20-04-00457. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП НО «Арктика» Северного (Арктического) федерального университета.

Библиографический список

1. Лунин В.В., Карманов А.П., Косяков Д.С., Горбова Н.С., Скребец Т.Э., Попова Н.Р., Шкаев А.Н., Иванченко Н.Л. Пряхин А.Н., Малков А.В., Боголицын К.Г. Физическая химия лигнина // М.: Академкнига. – 2010. – 484 с.
2. Jakes J.E., Zelinka S.L., Hunt C.G., Ciesielski P., Frihart C.R., Yelle D.J., Passarini L., Gleber S., Vine D., Vogt S. Measurement of moisture-dependent ion diffusion constants in wood cell wall layers using time-lapse micro X-ray fluorescence microscopy // Scientific reports. – 2020. – V. 10. №1. – P. 1-11.
3. Erfani J.M., Narayanan G., Aghabozorgi F., Farajidizaji B., Aghaei A., Kamyabi M.A., Mlsna, T.E. Structure, chemistry and physicochemistry of lignin for material functionalization // SN Applied Sciences. – 2019. – V. 1. – №9. – P. 1-19.
4. Brethauer S., Shahab R.L., Studer M.H. Impacts of biofilms on the conversion of cellulose // Applied microbiology and biotechnology. – 2020. – V. 104. – №12. – P. 5201-5212.
5. Чернова Т.Е., Горшкова Т.А. Биогенез растительных волокон // Онтогенез. – 2007. – Т. 38. – №4. – С. 271-284.
6. Morikawa Y., Yoshinaga A., Kamitakahara H., Wada M., Takabe K. Cellular distribution of coniferin in differentiating xylem of *Chamaecyparis obtusa* as revealed by Raman microscopy // Holzforschung. – 2010. – V. 64. №1. – P. 61-67.
7. Samuels A., Rensing K., Douglas C., Mansfield S., Dharmawardhana D., Ellis B. Cellular machinery of wood production: differentiation of secondary xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia* // Planta. – 2002. – V. 216. – №1. – P. 72-82.

8. Tanaka K., Choi J., Cao Y., Stacey G. Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants // *Frontiers in plant science*. – 2014. – V. 5. – P. 446.
9. Chukhchin D., Shutskiy N., Vashukova K. Isolation of Cellulase-Containing Exosomal Vesicles from *Picea Abies* Xylem // *The International Conference on Advances in Emerging Trends and Technologies*. – Springer, Cham. – 2021. – P. 75-80.
10. Pew J.C. Nitrobenzene Oxidation of Lignin Model Compounds, Spruce Wood and Spruce «Native Lignin» // *J. Am. Chem. Soc.* – 1955. – V. 77. – №10. – P. 2831–2833.

НАКОПЛЕНИЕ ГЛИЦИНБЕТАИНА И ПРОЛИНА В НАДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ

Щербёнок С.В., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. Представлены результаты исследований по содержанию глицинбетаина и пролина у некоторых видов растений, произрастающих в условиях техногенного засоления в Пермском Прикамье. Отмечено, что накопление этих соединений в листьях лебеды бескильницы, торичника и ситника, по-видимому, играет значительную роль в адаптации, повышая солеустойчивость этих видов.

Ключевые слова: глицинбетаин, пролин, техногенное засоление, осмопротекторы.

ACCUMULATION OF GLYCINE BETAIN AND PROLINE IN ABOVEGROUND PLANT ORGANS UNDER CONDITIONS OF TECHNOGENIC SALINIZATION

Shcherbenok S.V., Chetina O.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The results of studies on the content of glycine betaine and proline in some plant species growing under conditions of technogenic salinization in the Permian Kama region are presented. It is noted that the accumulation of these compounds in the leaves of quinoa, thoracic and sitnik, apparently, plays a significant role in adaptation, increasing the salt resistance of these species.

Keywords: glycinebetaine, proline, technogenic salinization, osmoprotectors.

С развитием химического производства связано образование техногенно засоленных почв. На территории Пермского края техногенное засоление обусловлено разработкой Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей, которая сопровождается огромным количеством солевых отходов. Солеотвалы и шламохранилища формируют NaCl-техногенные подземные воды, что приводит к хлоридному загрязнению подземных и поверхностных вод, что в конечном итоге перерастает в очаги вторичного засоления [1, 2].

Действие засоляющих ионов на растение имеет комплексный характер, так как происходит нарушение осмотического баланса клетки, что негативно сказывается на водном режиме растений, и также имеет токсическое влияние на физиологические и биохимические процессы в клетке. Поэтому уделяется большое внимание изучению механизмов адаптаций, в том числе антиоксидантных свойств растений к условиям засоления [3]. Адаптация растений к действию негативных факторов среды включает накопление в цитоплазме некоторых органических соединений с низкой молекулярной массой – совместимых осмолитов, в частности, глицинбетаина и пролина.

Целью нашего исследования являлось определение содержания глицинбетаина и пролина в растениях в условиях техногенного засоления.

В качестве объектов исследований были взяты 6 видов растений около г. Березники в долине реки Лёнвы на вторично засоленной аллювиальной почве с изреженной растительностью: марь белая (*Chenopodium album* L.), бескильница расставленная (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), очиток пурпуровый (*Sedum purpureum* (L.) Shult), торичник солончаковый (*Spergularia salina* J.), лебеда раскидистая (*Atriplex patula* L.), ситник сплюснутый (*Juncus compressus* J.). Для каждого вида пробы листьев собирали в пяти местах произрастания. Сопряженно с растительной пробой отбирали почву, в которой расположены корни данного вида растений (с глубины около 0-20 см).

Содержание глицинбетаина определяли в сухой массе листьев по методу Grieve and Grattan [4], количество пролина – по методу Bates et al. [5]. В почвенных пробах из прикорневой части растений определили актуальную кислотность ($pH_{вод}$) и содержание ионов Cl^- в водной вытяжке, подвижных ионов Na^+ и K^+ . Данные по химическим свойствам корнеобитаемого слоя почв опубликованы нами ранее [6]. Почвенные образцы корнеобитаемого слоя из поймы р. Лёнва, подверженные техногенному засолению, характеризуются повышенным содержанием натрия, калия и хлора, уровень pH изменялся от резкокислого до нейтрального [6].

Сравнение растений по содержанию осмопротекторов в листьях провели с применением критерия Ван Дер Вардена; значимыми считали различия между сравниваемыми средними величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P < 0,05$). В гистограммах по содержанию глицинбетаина и пролина приведены средние арифметические биологических повторностей и их стандартные ошибки. Количество осмопротекторов в растительных пробах, а также данные по величине pH и содержанию ионов в сопряженно отобранных почвенных пробах были обработаны методом регрессионного анализа; оценили адекватность полученных уравнений при доверительной вероятности 95% и выше ($P < 0,05$). Данные по содержанию глицинбетаина в исследуемых растениях представлены на рисунке 1.

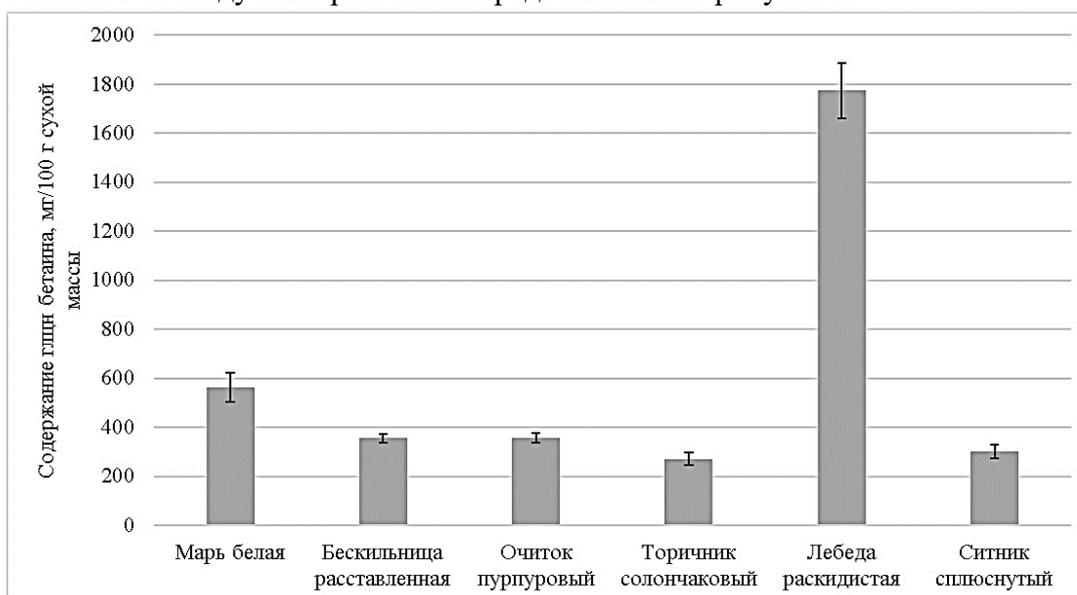


Рисунок 1 – Содержание глицин бетаина в листьях исследуемых растений, мг/100г сухой массы.

Исследуемые растения отличались по содержанию этого осмопротектора. Максимальное накопление глицинбетаина отмечено в растениях лебеды раскидистой и мари белой (1774

мг/100 г сухой массы и 563 мг/100 г соответственно). У торичника солончакового и ситника сплюснутого выявлено меньшее накопление данного соединения (271,5 мг/100 г и 301,8 мг/100 г соответственно).

В растениях бескильницы на фоне невысокого содержания глицинбетаина выявлена прямая сильная связь между его количеством и содержанием подвижного K^+ в почве (рис. 2). Калий выступает в роли засоляющего иона, поскольку он содержится в солевых отходах. На фоне наименьшего содержания K^+ в почве (1240 мг/кг почвы) количество глицинбетаина составляло 305 мг/100 г сухой массы листьев бескильницы, а при наибольшем засолении (2940 мг K^+ / кг почвы) увеличивалось до 417 мг/100 г.

Напротив, у очитка пурпурового обнаружены обратные регрессионные зависимости между содержанием изучаемого осмопротектора в листьях и содержанием засоляющих ионов Na^+ и Cl^- в почве. При увеличении подвижного натрия в почве с 1320 до 3270 мг/ кг уровень глицинбетаина снижался с 415 до 319 мг/100 г сухой массы ($y=453,63-0,040134x$, $R=0,909$; $F=9,461$; $P=0,008$), а при увеличении ионов хлора с 453 до 670 мг/100 г почвы количество данного осмолита изменялось с 416 до 350 мг/100 г ($y=583,18-0,3725x$, $R=0,932$; $F=13,246$; $P=0,004$). Возможно, адаптация очитка к условиям техногенного засоления осуществляется за счет других осмопротекторов.

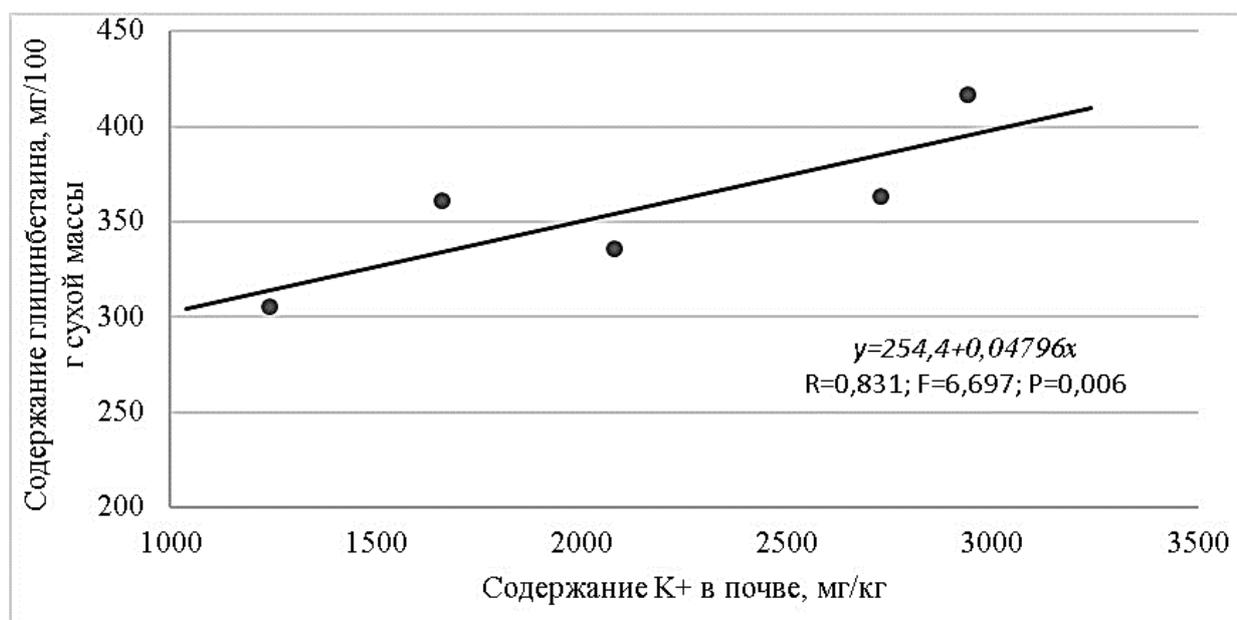


Рисунок 2 – Регрессионная зависимость между содержанием глицинбетаина в листьях бескильницы расставленной и ионов K^+ в почве (R – множественный коэффициент корреляции, F – критерий Фишера, P – уровень значимости).

Глицинбетаин является нетоксичным клеточным осмолитом, который накапливается в большинстве тканей в ответ на экологические стрессы, такие как засуха, засоление и другие, играя важную роль в регулировке осмотического давления внутри растительной клетки, позволяя ей поглощать воду, а также играет важную роль в различных процессах жизнедеятельности растений [7–9].

Глицинбетаин может взаимодействовать с макромолекулами, сохраняя их активность, поддерживает целостность мембран в стрессовых условиях, обезвреживает АФК, поддерживать редокс-статус клетки [10–12]. Виды растений могут различаться по своей способности синтезировать глицинбетаин. Так, в исследованиях Sakamoto и Murata [13]

некоторые растения накапливают относительно высокие уровни ГБ, в то время как другие не синтезируют это соединение.

По накоплению пролина в листьях отличились торичник солончаковый, ситник сплюснутый и лебеда раскидистая (200–270 мг/ 100 г сухой массы) (рис. 3). У бескильницы расставленной и очитка пурпурового пролина было в 2,5–3 раза меньше, чем у растений с максимальным содержанием. Минимальное количество зафиксировано у мари белой (28 мг/100 г сухой массы).

В листьях бескильницы количество пролина обратно пропорционально связано с уровнем калия в корнеобитаемом слое почвы (таблица). Так при увеличении уровня K^+ в почве с 1240 до 2940 мг / кг, содержание пролина снижалось со 133 до 76 мг/ 100 г сухой массы. Напротив, количество пролина в листьях торичника прямопропорционально зависело от уровня подвижных ионов Na^+ и K^+ в почве.

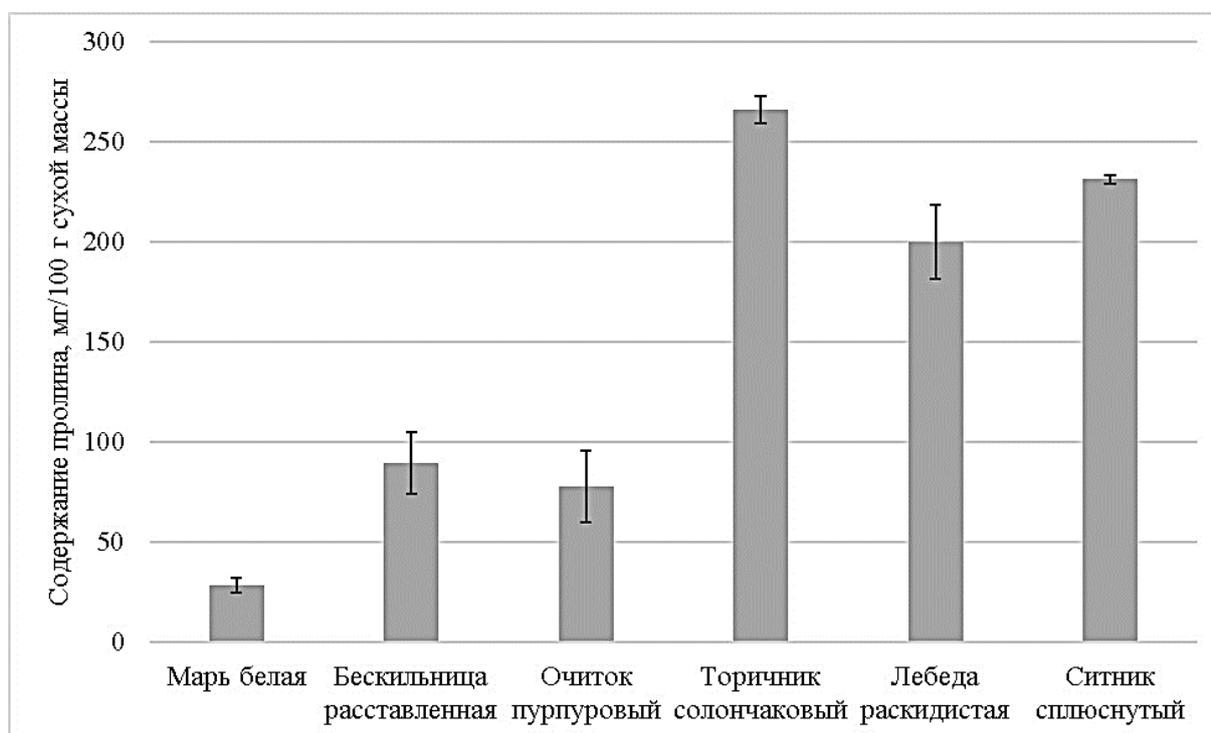


Рисунок 3 – Содержание пролина в листьях исследуемых растений, мг/100г сухой массы.

Уровень пролина считается одним из признанных маркеров устойчивости растения. Свободный пролин при стрессе обладает полифункциональным биологическим эффектом, который проявляется в осморегуляторной, антиоксидантной, энергетической и других функциях, обеспечивающих поддержание клеточного гомеостаза и его переход в новое адаптивное состояние [14]. Однако солевой стресс не всегда индуцирует синтез пролина; у некоторых галофитов пролин не вносит существенный вклад в устойчивость [15].

Таблица – Регрессионные зависимости между содержанием пролина в листьях растений и некоторыми показателями корнеобитаемого слоя почв

Вид	Уравнение регрессии
Бескильница расставленная	$y=172,8-0,037 x_1$, R=0,944; F=22,38; P=0,0002
Торичник солончаковый	$y=255,06+0,0018 x_1$, R=0,818; F=6,08; P=0,008
	$y=251,54+0,00124 x_2$, R=0,786; F=4,85; P=0,015

Примечание: x_1 – содержание K^+ в почве, мг/кг; x_2 – содержание Na^+ в почве, мг/кг; y – содержание пролина в листьях растений, мг/100 г сухой массы; R – множественный коэффициент корреляции, F – критерий Фишера, P – уровень значимости (при $P \leq 0,05$ регрессионная модель адекватна экспериментальным данным).

Таким образом, наши исследования показали, что растения, произрастающие в условиях техногенного засоления, отличались содержанием глицинбетаина и пролина. Накопление глицинбетаина в листьях лебеды и бескильницы, а пролина – в листьях торичника, лебеды и ситника, по-видимому, играет значительную роль в адаптации, повышая солеустойчивость этих видов.

Библиографический список

1. Еремченко О.З., Четина О.А., Кусакина М.Г., Шестаков И.Е. Техногенные поверхностные образования зоны солеотвалов и адаптация к ним растений. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2013. 148 с.
2. Хайруллина Е. А., Новоселова Л. В., Шестаков И. Е., Богуш А. А. Формирование природно-техногенных ландшафтов при разработке месторождения калийных солей // Новые методы и результаты исследований ландшафтов в Европе, центральной Азии и Сибири. М.: ВНИИ агрохим. им. Д. Н. Прянишникова, 2018. Т. II. С. 220–223.
3. Сафина Г. Р. Государственное управление и охрана земельных ресурсов России на современном этапе: курс лекций. Часть 3. Деградация почв и земель. Мелиорация / Г. Р. Сафина, В. А. Федорова. Казань: Казан. ун-т. 2020. 135 с.
4. Grieve, C.M., Grattan, S.R. Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds. Plant Soil, 1983, 70. P. 303–307.
5. Bates L., Waldren P.P., Teare J.D. Rapid determination of proline of water stress studies // Plant Soil. 1973. V. 39 (1). P. 205–207.
6. А.Д. Мальцева, Е.Е. Малышкина, А.Д. Шилова, С.В. Щербёнок, О.А. Четина Некоторые химические свойства корнеобитаемого слоя почв при техногенном засолении // Фундаментальные и прикладные исследования в биологии и экологии: Сборник статей по материалам региональной научной конференции, Пермь, 19–23 апреля 2021 года / Гл. ред. А.А. Елькин, отв. ред. А.Б. Крашенинников. Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2022. С. 83–87.
7. M. Ashraf, M. R. Foolad. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany, 2007. Vol. 59, №2. P. 206-216.
8. Гуцалова, А. А. Механизм толерантности растений к засолению: физиологическая, биохимическая и молекулярная характеристика // Методы и технологии в селекции

растений и растениеводстве: Материалы VII Международной научно-практической конференции, Киров, 04–05 апреля 2021 года / Под общей редакцией И.А. Устюжанина. Киров: Федеральный аграрный научный центр Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого, 2021. С. 65-69.

9. Rania A. Khedr Sobhy Gh. R. Sorour Saad H. Aboukhadrah Neveen M. El Shafey Hassan E. Abd Elsalam Mohamed E. El-Sharnouby Amira M. El-Tahan. Alleviation of salinity stress effects on agro-physiological traits of wheat by auxin, glycine betaine, and soil additives. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2022. Vol. 29, №1. P. 534-540.
10. Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Parvin K., Bhuiyan T.F., Anee T.I., Nahar K., Hossen M.S., Zulfiqar F., Alam M.M., Fujita M. Regulation of ROS Metabolism in Plants under Environmental Stress: A Review of Recent Experimental Evidence// *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. N 22. P. 1-44. <https://doi.org/10.3390/ijms21228695>
11. Weretilnyk E.A., Bednarek S., McCue K.F., Rhodes D., Hanson A.D. Comparative biochemical and immunological studies of the glycine betaine synthesis pathway in diverse families of dicotyledons // *Planta*. 1989. V. 178. P. 342–352. <https://doi.org/10.1007/bf00391862>
12. Annunziata M.G., Ciarmiello L.F., Woodrow P., Dell'Aversana E., Carillo P. Spatial and temporal profile of glycine betaine accumulation in plants under abiotic stresses // *Frontiers in Plant Science*. 2019. V. 10. P. 230. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00230>
13. Sakamoto A., Murata N. The role of glycine betaine in the protection of plants from stress: Clues from transgenic plants // *Plant, Cell and Environment*. 2002. V. 25. N 2. P. 163–171.
14. Четина О.А., Устинова К.И. Некоторые морфометрические параметры *Avena sativa* и содержание в нем пролина при засолении NaCl на фоне кислой и щелочной реакции почвенной среды // *Вестник Пермского университета. Сер. Биология*. 2019. Вып. 3. С. 345–352. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-345-352.
15. Шевякова Н.И. Метаболизм и физиологическая роль пролина в растениях при водном и солевом стрессах / Н.И. Шевякова // *Физиология растений*. 1983. Т.30. №4. С. 768-783.

ДИНАМИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ХВОЙНОГО ДРЕВОСТОЯ ВАЛДАЯ

Юзбеков А.К.

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Аннотация. Исследована сезонная динамика интенсивности фотосинтеза хвои ели европейской (*Picea abies* L.) старовозрастного древостоя на территории Валдайского национального парка в полуденные часы в течение теплых сезонов 2019–2021 гг. Выявлено существенное изменение величины потенциальной фотосинтетической продуктивности ели в течение сезона. Показано, что межсезонное изменение продуктивности хвои зависело от погодных условий и состояния деревьев на экспериментальном полигоне.

Ключевые слова. Ель европейская, сезонная динамика, фотосинтез, продуктивность.

PHOTOSYNTHETIC PRODUCTIVITY DYNAMICS OF THE CONIFEROUS FOREST STAND OF VALDAY

Yuzbekov A. K.

Lomonosov Moscow State University (Moscow, Russian Federation)

Abstract. The present work was aimed at investigating the seasonal dynamics of the photosynthesis in the needles of the common spruce *Picea abies* L. That were sampled in the old-age tree population in the Valday National Park at midday during the warm seasons of 2019–2021. A significant intra-seasonal variability of the potential photosynthetic productivity of the spruce was revealed. It was established that inter-seasonal changes in spruce needles' photosynthetic productivity vary depending on the weather conditions and the physiological state of the tested trees within the experimental area.

Keywords: common spruce, seasonal dynamics, photosynthesis, productivity.

Бореальные леса имеют большое значение в глобальном углеродном цикле и, тем самым, оказывают регулирующее действие на климат планеты. Роль бореальных лесов в регуляции газового состава атмосферы подтверждается сезонными колебаниями концентрации CO₂ в Северном полушарии, которая следует за динамикой фотосинтеза и дыхания наземных экосистем: в вегетационный период концентрация снижается, а в холодное время начинает расти [1]. На территории Валдайского национального парка бореальные леса занимают 86% всей площади. Особую ценность в них представляют высокобонитетные сосняки и ельники в возрасте 100 и более лет. Исследования показали, что в старых лесах углеродный баланс, как правило, положительный, и вероятность их функционирования как источников углерода не увеличивается с возрастом, а определяется изменениями климатических условий [2].

Целью работы является оценка потенциальной фотосинтетической продуктивности хвои ели европейской (*Picea abies* L.), одной из лесобразующих пород старовозрастных лесов Валдая, в полуденные часы в течение теплых сезонов 2019–2021 гг.

Исследования выполняли на экспериментальном полигоне «Таёжный лог» Валдайского филиала Государственного гидрологического института, расположенном на территории национального парка «Валдайский» Новгородской области. Измерения проводили на постоянной пробной площади, заложенной в старовозрастном (110-120 лет) ельнике. Средний диаметр древостоя – 37 см, средняя высота – 29 м, бонитет – 1. Объектами изучения служили интактные побеги нижней части крон модельных деревьев ели европейской (*Picea abies* L.), на высоте 2 м.

Интенсивность фотосинтеза хвои ели регистрировали в тёплый сезон 2019-2021 гг. в течение трех дней третьей декады каждого месяца, в полуденные часы, в трёх повторностях, с интервалом 10 минут. Интенсивность фотосинтеза определяли газометрическим методом, модифицированным применительно к объекту исследования (метод закрытых камер), с использованием комплекта оборудования, сконструированного на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова. Измерения и расчеты выполнялись в последовательности согласно методике авторов [3].

На основании проведенного анализа нами выявлено существенное изменение величины ассимиляции CO₂ у ели европейской в различные по погодным условиям вегетационные сезоны. Изменения интенсивности фотосинтеза и температуры воздуха представлены на рис. 1.

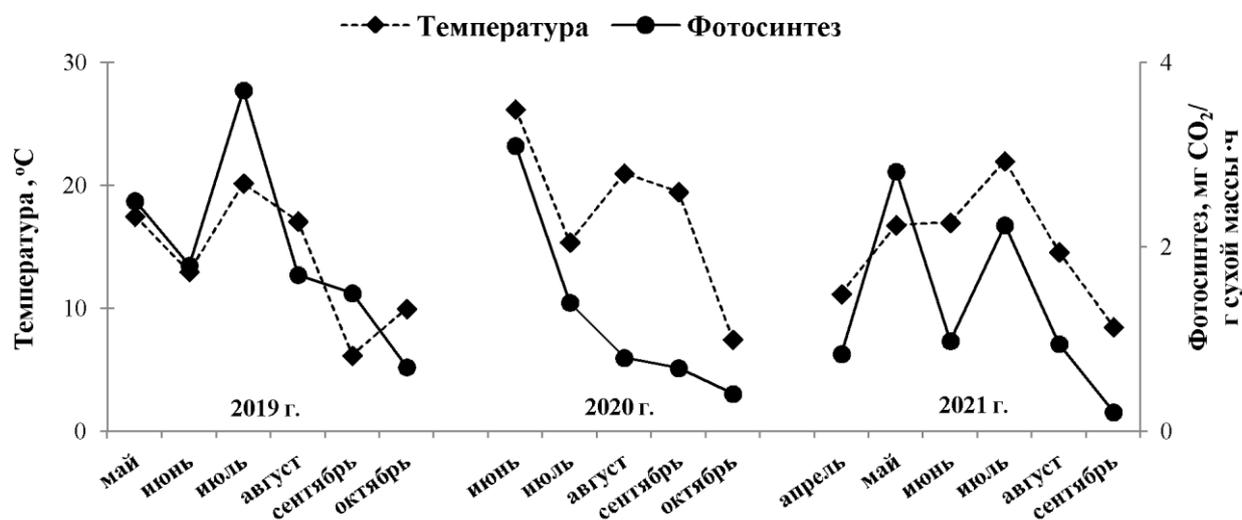


Рисунок 1 – Сезонная динамика интенсивности фотосинтеза хвои ели и температуры воздуха.

Отсутствие заморозков и теплая погода явились предпосылками для начала фотосинтеза хвои в мае 2019 г. Сезонный ход интенсивности фотосинтеза имеет вид одновершинной кривой: максимальное значение ассимиляции CO₂, равное 3.7 мг CO₂ г⁻¹ сухой массы ч⁻¹, отмечено в июле при температуре воздуха в полуденные часы 20.2°C. Наблюдаемое снижение интенсивности фотосинтеза в июне по сравнению с маем в 1,4 раза, очевидно, обусловлено прохладной и дождливой погодой в конце месяца, когда температура воздуха составила 13.0°C, относительная влажность воздуха – 90%. Во вторую половину сезона

наблюдалось снижение фотосинтетической интенсивности ели, что согласуется с динамикой температуры воздуха. Теплые погодные условия в осенний период способствовали продлению фотосинтетической активности хвои до ноября. При этом, несмотря на повышение температуры воздуха в октябре по сравнению с сентябрем, интенсивность фотосинтеза не увеличилась, что, вероятно, обусловлено осенней перестройкой фотосинтетического аппарата, связанной с переходом растений к состоянию покоя. Согласно автору [4], в осенний период фотосинтетический аппарат хвойных растений подвергается глубоким ультраструктурным и биохимическим перестройкам, связанным с состоянием покоя и защитой от фотохимического повреждения. В октябре при температуре 10.0°C зарегистрировано минимальное значение ассимиляции CO₂, равное 0.7 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹. Среднее значение интенсивности фотосинтеза за сезон составило 2.0 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹.

В 2020 г. максимальная интенсивность фотосинтеза (3.1 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹) отмечена в июне при высокой температуре воздуха 26.2°C; минимальное значение показателя, равное 0.41 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹, зарегистрировано в октябре при температуре 7.5°C. Наблюдаемое снижение интенсивности фотосинтеза в июле по сравнению с июнем в 2.2 раза, очевидно, обусловлено прохладной дождливой погодой в конце месяца, когда температура воздуха составила около 15°C, относительная влажность воздуха – 90%.

Несмотря на то, что в конце августа и сентября погодные условия характеризовались достаточно высокими значениями температуры воздуха (около 20°C), наблюдалось дальнейшее снижение ассимиляционной деятельности хвои, обусловленное осенней перестройкой фотосинтетического аппарата, а также влиянием других метеорологических факторов. Среднее значение интенсивности фотосинтеза за сезон составило 1.3 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹.

График изменения интенсивности фотосинтеза хвои в 2021 г. имеет двувёршинный характер – пики отмечены в мае и июле (2.82 и 2.24 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹), обусловленные в июле – оптимальной температурой воздуха, в мае – влиянием на процесс фотосинтеза, наряду с температурой, других метеорологических факторов. Наблюдаемый минимум интенсивности фотосинтеза в июне по сравнению с маем и июлем, свидетельствует о том, что процесс ассимиляции CO₂ в большей степени, зависит от других факторов, чем от температуры. В последнюю декаду августа и в дальнейшем в сентябре наблюдалось снижение ассимиляционной деятельности хвои до 0.21 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹, что, вероятно, связано с дождливой погодой и снижением температуры воздуха, а также осенней перестройкой фотосинтетического аппарата. Среднее значение интенсивности фотосинтеза за сезон составило 1.34 мг CO₂ г⁻¹сухой массы ч⁻¹.

Регрессионный анализ связи интенсивности фотосинтеза хвои с температурой воздуха в 2019-2021 гг. выявил прямую линейную зависимость между показателями (коэффициент корреляции R равен соответственно 0.770 (p<0.001); 0.694 (p<0.005) и 0.756 (p<0.001)).

Линейный характер зависимости скорости дневного поглощения CO₂ от температуры для коренных еловых лесов севера ранее был установлен другими авторами [5].

Фотосинтетическая интенсивность хвои ели также находилась в прямой зависимости от другого метеорологического фактора – освещенности (фотосинтетически активной радиации (ФАР)) (рис.2).

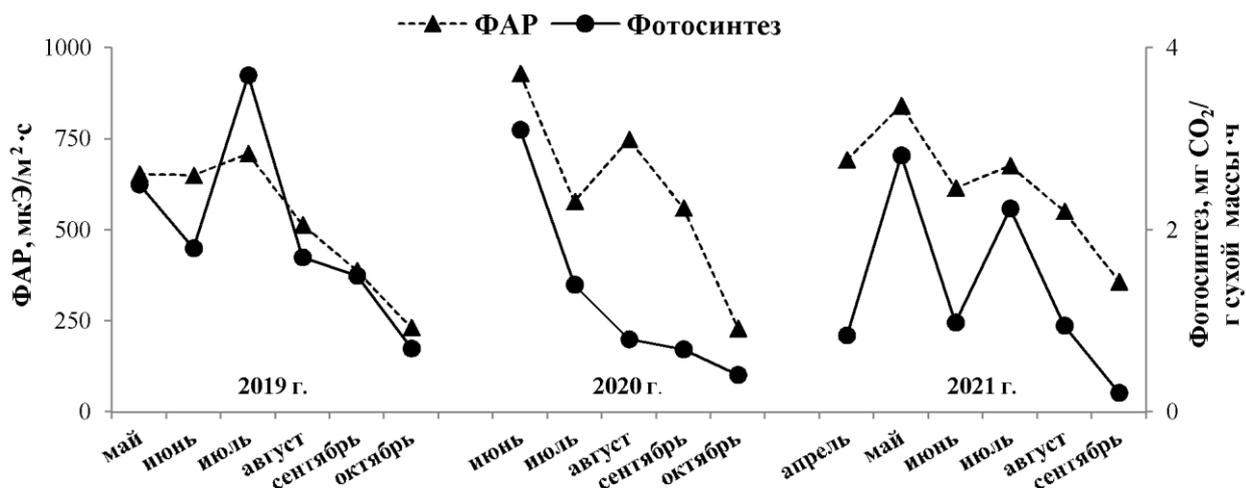


Рисунок 2. Сезонная динамика интенсивности фотосинтеза хвой ели и освещенности (ФАР).

В 2019 г. динамика ФАР определялась потенциальной суммарной солнечной радиацией (максимум – в июле, минимум – в октябре) и общей облачностью (от 6 до 9 баллов). Максимальному и минимальному значениям ФАР, равным 709.6 и 232.8 $\mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$, соответствовали максимум и минимум интенсивности фотосинтеза. В результате регрессионного анализа установили, что зависимость интенсивности фотосинтеза хвой ели от освещенности имеет вид логарифмической кривой; коэффициент детерминации R^2 равен 0.673.

Анализ динамики ФАР в 2020 г. показал, что максимальное значение ($929.2 \mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$) отмечалось в июне; минимальное ($229.5 \mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$) – в октябре, что связано с уменьшением потенциальной суммарной солнечной радиации в осенние месяцы, а также увеличением облачности до 10 баллов. Следует отметить, что наблюдаемое уменьшение интенсивности фотосинтеза в августе при увеличении освещенности (в последнюю декаду августа отмечалась ясная погода), вероятно, обусловлено особенностями процесса ассимиляции CO_2 в осенний период, а также влиянием на процесс фотосинтеза других метеорологических факторов.

В 2021 г. максимальное значение ФАР ($840.9 \mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$), зарегистрировано в мае при облачности 2 балла; минимальное ($358.0 \mu\text{моль м}^{-2} \text{с}^{-1}$) – в сентябре при облачности 10 баллов. Следует отметить, что наблюдаемый максимум интенсивности фотосинтеза в мае, очевидно, обусловлен не только температурой, но и высоким уровнем ФАР.

В результате регрессионного анализа установили, что зависимость интенсивности фотосинтеза хвой ели от освещенности в 2020-2021 г. отличается от классического варианта и имеет линейный характер; коэффициент корреляции R равен соответственно 0.777 ($p < 0.001$) и 0.841 ($p < 0.001$). Аналогичные результаты были получены в других исследованиях [5].

При определении роли фотосинтеза в процессе, обеспечивающем сток углерода в глобальном масштабе, большое значение имеет соотношение максимальных значений фотосинтетической интенсивности CO_2 и образования органической массы, которое осуществляется через продуктивность фотосинтеза – поглощение углерода в течение определенного периода времени. Поскольку в работе определяли интенсивность фотосинтеза хвой только в полуденные часы, при расчете дневной фотосинтетической продуктивности ограничились ее значениями в обозначенные часы.

С нашей точки зрения, величина продуктивности, рассчитанная на основе значений максимальной интенсивности фотосинтеза (в условиях оптимального освещения и температуры), объективно характеризует степень реализации фотосинтетического потенциала ели европейской при данных условиях внешней среды. Фотосинтетическую продуктивность за месяц рассчитывали на основе дневной продуктивности, количества и категории состояния деревьев на площади 1 га. Результаты расчетов представлены в таблице.

Таблица – Потенциальная продуктивность фотосинтеза хвой ели европейской

Год	Продуктивность фотосинтеза (т CO ₂ ·га ⁻¹ ·мес ⁻¹)						
	Апрель	Май	Июнь	Июль	Август	Сентябрь	Октябрь
2019	–	0,45	0,31	0,67	0,31	0,26	0,13
2020	–	–	0,55	0,26	0,15	0,12	0,07
2021	0,15	0,51	0,17	0,41	0,17	0,04	–

Максимально высокая и минимальная продуктивность фотосинтеза наблюдалась в 2019 г. – в июле и октябре, в 2020 г. – в июне и октябре, 2021 г. – в мае и сентябре, что вполне согласуется с сезонным ходом интенсивности ассимиляции CO₂. Среднее значение продуктивности хвой за месяц в 2019-2021 гг. составило 0.35; 0.23 и 0.24 т CO₂ га⁻¹мес⁻¹. Сезонную продуктивность фотосинтеза хвой определяли, как сумму продуктивности за все месяцы наблюдений.

Суммарное поглощение углекислого газа хвоей в полуденные часы в течение теплого сезона 2019-2021 гг. равнялось соответственно 2.13; 1.15 и 1.45 т CO₂ га⁻¹ сезон⁻¹. Наблюдаемая тенденция к снижению сезонной продуктивности, очевидно, обусловлена неблагоприятными погодными условиями и ухудшением общего состояния деревьев на территории Валдайского национального парка.

Полученные расчетные показатели потенциальной фотосинтетической продуктивности хвой в наиболее благоприятных условиях освещения и температуры – в полуденные часы в течение теплых сезонов 2019-2021 гг. свидетельствуют о существенном вкладе старовозрастных ельников в поглощение углекислого газа из атмосферы, и, следовательно, их значении в углеродном балансе лесных сообществ Валдая.

Исследование выполнено в рамках Программы развития Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова «Будущее планеты и глобальные изменения окружающей среды».

Библиографический список

1. Гиляров А.М. Экология биосферы: учебное пособие. М.: Изд-во Московского государственного университета, 2016. 160 с.
2. Luysaert S., Schulze E-D., Borner A., Knohl A., Hessenmoller D., Law B.E., Ciais P., Grace J. Old-growth forests as global carbon sinks // Nature. – 2008. – V. 455. – №7210. – P. 213–215.

3. Юзбеков А.К., Замолодчиков Д.Г., Иващенко А.И. Фотосинтез ели европейской в лесных экосистемах экспериментального полигона «Лог Таежный» // Вестник Московского университета. Сер. 16. Биология. – 2014. – № 4. – С. 32–35.
4. Суворова Г.Г. Фотосинтез хвойных деревьев в условиях Сибири. Новосибирск: Гео, 2009. 192 с.
5. Бобкова К.С., Тужилкина В.В. Углеродный цикл в еловых экосистемах // В кн.: Коренные еловые леса севера: биоразнообразие, структура, функции. СПб: Наука, 2006. С. 265-288.

ЗООЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

doi:10.17072/simbioz-2022-653-657

СЕНСОРНЫЕ ПОЛЯ НА АНТЕННАХ РУЧЕЙНИКОВ ПОДОТРЯДА ANNULIPALPIA (INSECTA: TRICHOPTERA)

Абу Дийак К. Т.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. С помощью сканирующей электронной микроскопии изучены форма и расположение сенсорных полей на антеннах самцов 41 вида ручейников из семи семейств подотряда Annulipalpia. Выявлено 7 типов сенсорных полей, при этом для некоторых представителей подотряда характерна их редукция.

Ключевые слова: сенсиллы, сенсорные поля, Annulipalpia, Trichoptera.

ANTENNAL SENSORY FIELDS OF CADDISFLIES OF THE SUBORDER ANNULIPALPIA

Abu Diiak K. T.

Saint-Petersburg State University, St. Peterburg, Russia

Abstract. Shape and localization of antennal sensory fields in males of 41 caddisfly species from seven families of the suborder Annulipalpia was studied by using scanning electron microscopy. Seven types of sensory fields were revealed in studied species. Some representatives of the suborder show a reduction of antennal sensory fields.

Keywords: sensilla, sensory fields, Annulipalpia, Trichoptera.

Введение. Annulipalpia – один из двух подотрядов ручейников (Insecta: Trichoptera), состоящий из девяти семейств: Philopotamidae Stephens, 1829; Stenopsychidae Martynov, 1924; Hydropsychidae Curtis, 1835; Polycentropodidae Ulmer, 1903; Psychomyiidae Walker, 1852; Xiphocentronidae Ross, 1949; Ecnomidae Ulmer, 1903; Dipseudopsidae Ulmer, 1904; Pseudoneureclipsidae Ulmer, 1951 [1].

Сенсиллы насекомых представляют собой покровные структуры, воспринимающие стимулы различной модальности. Ручейники отличаются сложной и разнообразной феромонной коммуникацией, важную роль в которой играют сенсиллы [2]. Предыдущие исследования выявили наличие на антеннах ручейников сенсорных полей – обособленных групп, изогнутых трихоидных сенсилл, расположенных на вентральной стороне сегментов [2,3]. Сенсорные поля ранее были изучены у трёх из шести семейств подотряда Annulipalpia: Philopotamidae [4], Ecnomidae [5] и Hydropsychidae [6,7]. Цель данной работы – выявить разнообразие антеннальных сенсорных полей в пределах подотряда Annulipalpia.

Материал и методика. Сенсорные поля были исследованы у самцов 41 вида ручейников из 7 семейств подотряда Annulipalpia: *Arctopsyche palpata* Martynov, 1934 (Россия, Дальний Восток); *Parapsyche apicalis* (Banks, 1908) (Канада); *Hydropsyche newae* Kolenati, 1858 (Россия, Ленинградская область); *Hydropsyche orientalis* Martynov, 1934 (Россия, Дальний Восток); *Hydropsyche pellucidula* (Curtis, 1834) (Россия, Ленинградская область); *Cheumatopsyche comorina* (Navas, 1931) (Мадагаскар); *Hydronema persica* Martynov, 1914 (Казахстан, Туркестанская область); *Diplectronea robusta* Martynov, 1934 (Россия, Северный Кавказ); *Diplectronea gombak* Olah, 1993 (Малайзия); *Diplectronea dulitensis* Kimmins, 1955 (Малайзия); *Diplectronea hermione* Malicky et Chantaramongkol, 2002 (Малайзия); *Smicridea murina* McLachlan, 1871 (Панама); *Centromacronema* sp. (Перу); *Leptonema viridianum* Navas, 1916 (Перу); *Aethaloptera evanescens* (McLachlan, 1880) (Россия, Бурятия); *Amphipsyche gratiosa* Navas, 1922 (Таиланд); *Macrostemum fenestratum* (Albarda, 1881) (Малайзия); *Macrostemum radiatum* (McLachlan, 1872) (Россия, Бурятия); *Macrostemum midas* Malicky et Chantaramongkol, 1998 (Малайзия) (Hydropsychidae); *Neureclipsis bimaculata* (Linnaeus, 1758) (Россия, Ленинградская область); *Polycentropus flavomaculatus* (Pictet, 1834) (Швеция); *Plectrocnemia conspersa* (Curtis, 1834) (Швеция); *Cyrrnus fennicus* Klingstedt, 1937 (Россия, Ленинградская область); *Cyrrnus trimaculatus* (Curtis, 1834) (Россия, Ленинградская область); *Cyrrnus flavidus* McLachlan, 1864 (Россия, Ленинградская область); *Holocentropus picicornis* (Stephens, 1836) (Россия, Ленинградская область); *Holocentropus insignis* Martynov, 1924 (Россия, Ленинградская область); *Pahamunaya taleban* Malicky et Chantaramongkol, 1993 (Таиланд) (Polycentropodidae); *Psychomyia minima* (Martynov, 1910) (Монголия); *Psychomyia flavida* Hagen, 1861 (Россия, Дальний Восток); *Psychomyia pusilla* (Fabricius, 1781) (Россия, Северный Кавказ); *Lype phaeora* (Stephens, 1836) (Россия, Ленинградская область); *Tinodes turanicus* Martynov, 1927 (Узбекистан); *Tinodes waeneri* (Linnaeus, 1758) (Россия, Ленинградская область) (Psychomyiidae); *Xiphocentron mnesteus* Schmid, 1982 (Колумбия) (Xiphocentronidae); *Dipseudopsis indica* McLachlan, 1875 (Индия); *Dipseudopsis varians* Ulmer, 1929 (Малайзия); *Hyalopsyche sachalinica* Martynov, 1910 (Россия, Дальний Восток) (Dipseudopsidae); *Pseudoneureclipsis proxima* Martynov, 1934 (Россия, Дальний Восток); *Pseudoneureclipsis chrysippus* Malicky et Sompong, 2000 (Малайзия) (Pseudoneureclipsidae); *Stenopsyche marmorata* McLachlan, 1866 (Россия, Дальний Восток) (Stenopsychidae).
Использован материал, хранившийся в 96% спирте, а также сухой материал.

Изображения сегментов антенн и сенсорных полей были получены при помощи сканирующей электронной микроскопии. Антенны ручейников были отделены и наклеены на столики для электронной микроскопии с помощью токопроводящей ленты. Антенны были расположены вентральной стороной вверх для обеспечения видимости сенсорных полей. Образцы были напылены 20 нм слоем золота с помощью установки Leica EM SCD500. Для получения изображений были использованы сканирующие электронные микроскопы Tescan MIRA3 и JEOL NeoScope JCM-5000.

Результаты и обсуждение. Сенсорные поля у всех изученных видов находятся на вентральной стороне сегментов и состоят из изогнутых трихонидных сенсилл. Это тонкие волосковидные сенсиллы с загнутыми концами и слабой кольчатой или продольной исчерченностью. Количество изогнутых трихонидных сенсилл и площадь сенсорных полей снижаются по направлению к дистальной части антенны.

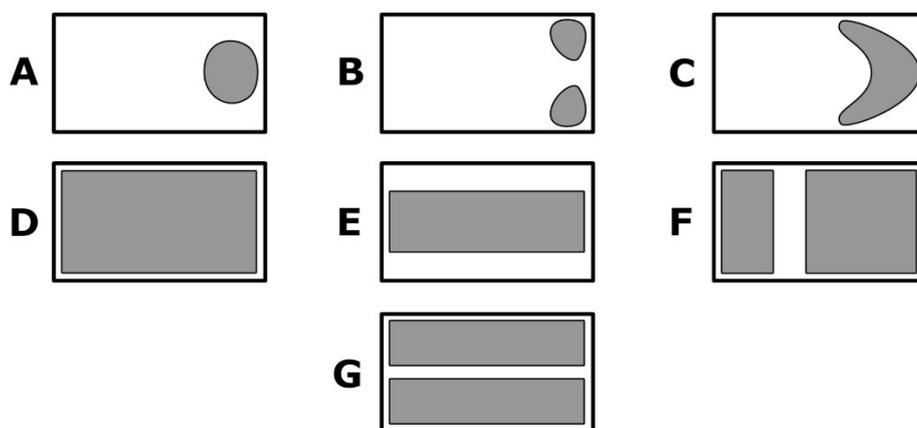


Рисунок 1 – Схемы сенсорных полей на антеннах ручейников подотряда Annulipalpia. (А) Одиночное сенсорное поле; (В) парные сенсорные поля на дистальной части сегмента; (С) U-образное сенсорное поле; (D) сенсорное поле, занимающее всю вентролатеральную сторону сегмента; (Е) суженное сенсорное поле; (F) поперечно разделённые сенсорные поля; (G) продольно разделённые сенсорные поля. Дистальная часть сегмента на схемах справа.

На антеннах видов подотряда Annulipalpia найдено 7 типов сенсорных полей:

Одиночные сенсорные поля на дистальной части сегментов (Рис. 1, А) были найдены только у некоторых представителей семейства Philopotamidae [4].

Парные сенсорные поля на дистальной части члеников антенны (Рис. 1, В; Рис. 2, В) были отмечены у некоторых Philopotamidae (род *Philopotamus*) [4], Hydropsychidae (*A. palpata*, *P. apicalis*, *H. newae*, *H. persica*) и Polycentropodidae (*N. bimaculata*, *P. flavomaculatus*, *C. flavidus*). Эти сенсорные поля могут оставаться отдельными на протяжении всей антенны (*A. palpata*, *P. apicalis*, *H. persica*) или сливаться в одно поле в середине антенны (*H. newae*, *N. bimaculata*, *P. flavomaculatus*, *C. flavidus*).

U-образные сенсорные поля (Рис. 1, С), расположенные на половине части сегмента, обнаружены у двух видов – *H. orientalis* и *H. pellucidula* (Hydropsychidae). Такие сенсорные поля в середине антенны приобретают более округлую форму, а на дистальных члениках редуцируются до 1–3 сенсилл на сегмент.

Сенсорные поля, занимающие всю вентролатеральную сторону членика (Рис. 1, D; Рис. 2, С), найдены только у некоторых представителей семейства Hydropsychidae (род *Diplectrona*, *S. murina*, *C. comorina*, *Centromacronema* sp., *A. gratiosa*). В середине антенны сенсорные поля этого типа могут стать более узкими (*A. gratiosa* и *Centromacronema* sp.), разделиться на проксимальную и дистальную части (*C. comorina*, *D. dulitensis*, *D. gombak*, *D. hermine*) или сохраниться только на дистальной половине сегментов (*D. robusta* и *S. murina*).

Суженные сенсорные поля (Рис. 1, Е) характерны для представителей семейства Psychomyiidae (кроме *T. waeneri*) и Stenopsychidae (*S. marmorata*). Такие сенсорные поля в середине и в конце антенны сохраняются только на дистальной части сегмента в виде небольшой округлой группы сенсилл.

Поперечно разделённые сенсорные поля (Рис. 1, F; Рис. 2, А) имеются у представителей семейств Philopotamidae [4], Hydropsychidae (*L. viridianum*) и Polycentropodidae (*H. picicornis* и *H. insignis*). На каждом сегменте дистально расположенное сенсорное поле больше по площади, чем проксимальное; проксимальное сенсорное поле редуцируется, начиная с середины антенны.

Продольно разделённые сенсорные поля (Рис. 1, G) найдены у видов рода *Macrostemum* (Hydropsychidae). Такие сенсорные поля редуцируются до одиночных изогнутых трихоидных сенсилл после четвёртого сегмента антенны.

У двенадцати изученных видов сенсорные поля отсутствуют. У некоторых Polycentropodidae (*Pl. conspersa*, *C. fennicus*, *C. trimaculatus*, *P. taleban*), Dipseudopsidae (*D. varians*, *D. indica*, *H. sachalinica*) и Psychomyiidae (*T. waeneri*) многочисленные изогнутые трихоидные сенсиллы равномерно распределены по поверхности каждого сегмента (Рис. 2, D). Четыре изученных вида из семейств Hydropsychidae (*A. evanescens*), Pseudoneureclipsidae (*P. proxima*, *P. chrysippus*) и Xiphocentronidae (*X. mnesteus*) имеют очень низкое число изогнутых трихоидных сенсилл, не собранных в сенсорные поля.

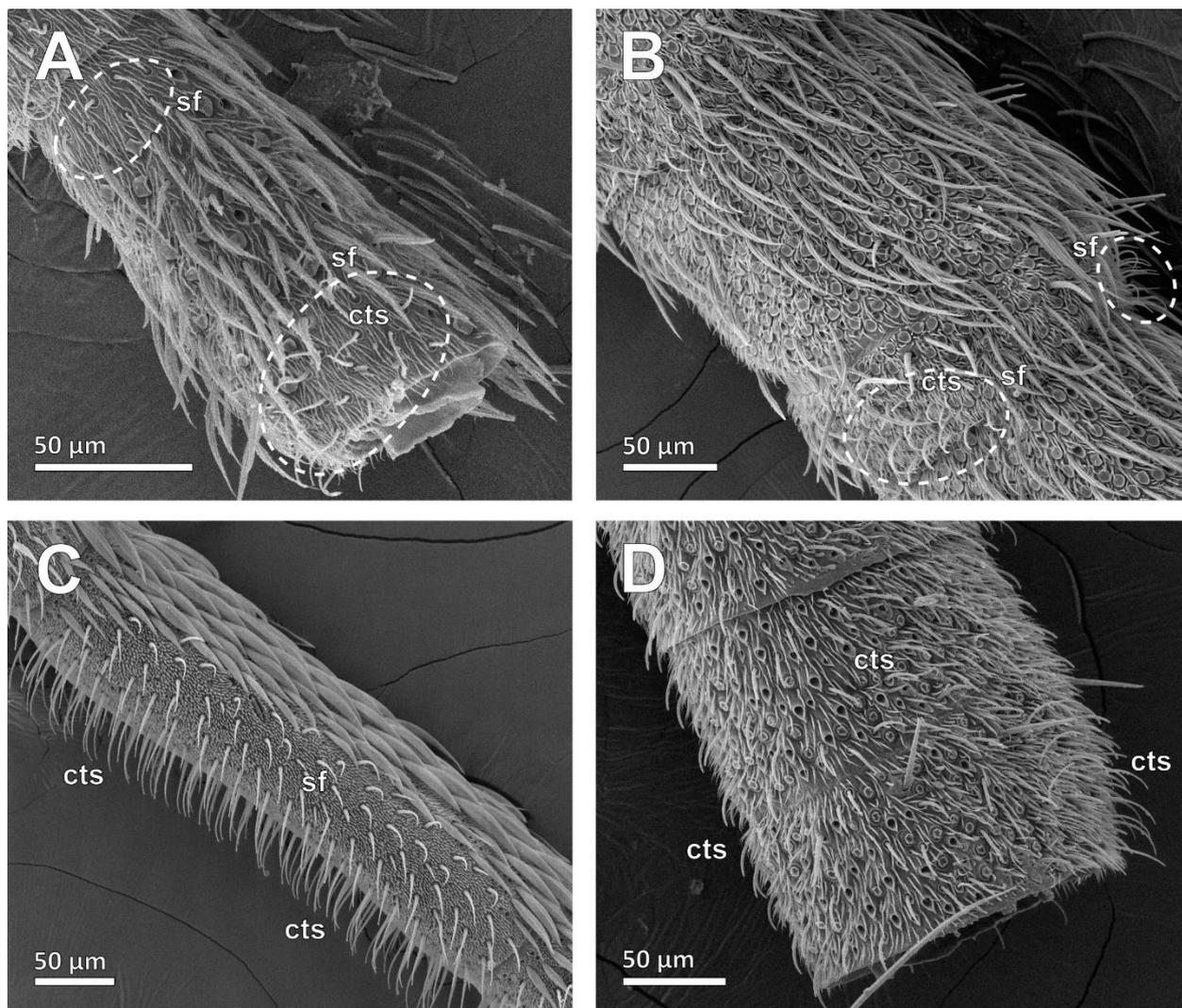


Рисунок 2 – Распределение изогнутых трихоидных сенсилл на сегментах антенн у ручейников подотряда Annulipalpia. (A) 18-ый сегмент антенны *Holocentropus insignis*; (B) 4-ый сегмент антенны *Arctopsyche palpata*; (C) 5-ый сегмент антенны *Centromacronema* sp.; (D) 20-ый сегмент антенны *Dipseudopsis varians*. Обозначения: sf – сенсорные поля; cts – изогнутые трихоидные сенсиллы. Пунктирные линии обозначают примерные границы сенсорных полей.

Скорость эволюции сенсорных полей неравномерна в пределах подотряда Annulipalpia: форма сенсорных полей достигает наибольшего разнообразия в семействе Hydropsychidae (5 типов), в то время как у других изученных семейств найдено не более трёх типов сенсорных

полей. Это может быть связано с многочисленными модификациями феромонной коммуникации у разных групп Hydropsychidae. У некоторых видов сенсорные поля отсутствуют, что тоже может иметь функциональное значение. Низкое количество изогнутых трихонидных сенсилл может говорить о снижении роли феромонной коммуникации в поиске партнёра. Увеличенное число этих сенсилл, не формирующих сенсорных полей и занимающих всю поверхность сегмента, может свидетельствовать о необходимости поиска партнёра на больших расстояниях (восприятие низкой концентрации феромонов в воздухе).

Благодарности. Автор выражает благодарность В. Д. Иванову, С. И. Мельницкому, а также М. Ю. Валуйскому за предоставленный материал и обсуждение результатов.

Исследование выполнено в рамках проектов № 109-16530 и № 109-24431 Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Библиографический список

1. Morse, J.C. (ed.) Trichoptera World Checklist. – 2022 [Электронный ресурс]. URL: <http://entweb.clemson.edu/database/trichopt/index.htm> (дата обращения: 26.09.2022).
2. Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Structure and localization of sensilla on antennae of caddisflies (Insecta: Trichoptera) // Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2011. – V. 47. – №. 6. – P. 593-602.
3. Ivanov V. D., Melnitsky S. I. Diversity of the olfactory sensilla in caddisflies (Trichoptera) // Zoosymposia. – 2016. – V. 10. – №. 1. – P. 224-233.
4. Melnitsky S. I. et al. Comparison of sensory structures on the antenna of different species of Philopotamidae (Insecta: Trichoptera) // Arthropod structure & development. – 2018. – V. 47. – №. 1. – P. 45-55.
5. Valuyskiy M. Yu., Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Comparative Analysis of Antennal Surfaces in Adult Caddisflies of the Genus Ecnomus McLachlan (Trichoptera, Ecnomidae) // Entomological Review. – 2019. – V. 99. – №. 3. – P. 302-309.
6. Абу Дийак К. Т. Сенсорные поля на антеннах ручейников семейства Hydropsychidae (Trichoptera: Annulipalpia) // Сборник статей XII Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов с международным участием «Симбиоз – Россия 2020» / Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Пермь. – 2020. – С. 18-21.
7. Abu Diiak K. T., Valuyskiy M. Yu., Melnitsky S. I., Ivanov V. D. Diversity and distribution of antennal sensilla in Hydropsychidae (Insecta, Trichoptera) // Biological communications. – 2021. – V. 66. – No. 4. – P. 302-315.

**РАЗНООБРАЗИЕ СЕНСИЛЛ НА ЩУПИКАХ РУЧЕЙНИКОВ ИЗ СЕМЕЙСТВ
PHILOPOTAMIDAE И STENOPSYCHIDAE (TRICHOPTERA: ANNULIPALPIA)**

Абу Дийак К. Т.

Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Сенсорная поверхность щупиков у семи видов ручейников из семейств Philopotamidae и Stenopsychidae исследована при помощи сканирующей электронной микроскопии (SEM). В ходе исследования у изученных видов обнаружено 6 типов и 4 подтипа сенсилл, оценено их распределение по поверхности сегментов щупиков.

Ключевые слова: сенсиллы, щупики, Philopotamidae, Stenopsychidae, Trichoptera.

**DIVERSITY OF SENSILLA ON MOUTHPART PALPS IN CADDISFLIES FROM
THE FAMILIES PHILOPOTAMIDAE AND STENOPSYCHIDAE
(TRICHOPTERA: ANNULIPALPIA)**

Abu Diiak K. T.

Saint-Petersburg State University, St. Peterburg, Russia

Abstract. Palpal sensory surface in seven caddisfly species from families Philopotamidae and Stenopsychidae was studied by using scanning electron microscopy (SEM). This study revealed 6 types and 4 subtypes of sensilla in studied species. Additionally, the distribution of sensilla over the palpal surface was described.

Keywords: sensilla, mouthpart palps, Philopotamidae, Stenopsychidae, Trichoptera.

Введение. Philopotamidae и Stenopsychidae – сестринские семейства ручейников из подотряда Annulipalpia (кольчатощупиковые) [1]. Максиллярные и лабиальные щупики являются чувствительными придатками головы насекомых, поверхность которых несёт сенсиллы, воспринимающие различные раздражители [2,3]. Для ручейников характерна сложная коммуникация между самцами и самками, в которой, наряду с антеннальными сенсиллами, могут участвовать сенсиллы на щупиках. Сенсорная поверхность антенн, другой пары придатков головы, была ранее изучена у представителей семейства Philopotamidae и у *Stenopsyche similis* (Stenopsychidae) [4]. Данные по сенсорной поверхности щупиков ограничены: ранее была исследована только форма апикальных сенсорных комплексов на концевых сегментах максиллярных и лабиальных щупиков [5]. Цель данной работы – исследовать разнообразие сенсилл на щупиках и провести сравнение с набором сенсилл на антеннах.

Материал и методика. Сенсорная поверхность щупиков была изучена у *Stenopsyche marmorata* Navas, 1920 (Stenopsychidae) (Россия, Дальний Восток) и шести видов из семейства Philopotamidae: *Philopotamus montanus* (Donovan, 1813) (Россия, Ленинградская область); *Dolophilodes ornata* Ulmer, 1909 (Казахстан); *Wormaldia khourmai* Schmid, 1959 (Россия, Ставропольский Край); *Chimarra marginata* (Linnaeus, 1767) (Россия, Карелия); *Chimarra thienemanni* Ulmer, 1951 (Таиланд); *Chimarra okuihorum* Mey, 1998 (Малайзия).

Исследование проведено с помощью сканирующей электронной микроскопии. Щупики или головы ручейников были помещены на держатели для сканирующей электронной микроскопии и напылены слоем золота толщиной 20 нм с помощью напылительной установки Leica EM SCD500. Снимки поверхности щупиков получены с помощью сканирующих электронных микроскопов Tescan MIRA3, Hitachi TM3000 и FEI Quanta 200 3D. Измерения сенсилл были выполнены с помощью программы ImageJ 1.52r, в статье указаны минимальные и максимальные абсолютные размеры сенсилл.

Результаты и обсуждение. У исследованных видов найдено 6 типов сенсилл:

Длинные трихоидные сенсиллы (Рис. 1, А: lts) представляют собой вытянутые и слегка уплощённые структуры с заострёнными концами. Поверхность этих сенсилл несёт продольные борозды и небольшие зубцы. Сенсиллы этого типа легко выпадают, оставляя пустые сокеты (Рис. 1, А: s). Размер длинных трихоидных сенсилл у изученных видов находится в пределах от 11,7 μm до 118,3 μm . Эти сенсиллы распределены более-менее равномерно по поверхности всех члеников обеих пар щупиков и имеются у всех изученных видов.

Хетоидные сенсиллы имеют волосковидную форму, закруглённые концы, круглое поперечное сечение и полусферическое основание. Поверхность сенсилл этого типа покрыта продольными бороздами. У всех изученных видов хетоидные сенсиллы имеют два подтипа: короткие (Рис. 1, А: chs-s) и длинные (Рис. 1, С: chs-l). Короткие хетоидные сенсиллы расположены на всех сегментах обеих пар щупиков и наиболее многочисленны на медиальной стороне члеников. Длинные хетоидные сенсиллы сильно склеротизованы и формируют группы на медиальной стороне первого и второго члеников максиллярных щупиков. Длина коротких хетоидных сенсилл варьирует от 14,1 μm до 111,6 μm , длинных – от 56,5 μm до 312,4 μm .

Кампаниформные сенсиллы найдены у всех исследованных видов. Они имеют тонкий участок кутикулы, окружённый выпуклым кутикулярным кольцом (Рис. 1, В). Эти сенсиллы расположены группами по 3–5 сенсилл на первом членике лабиальных щупиков и втором членике максиллярных щупиков (обычно около групп длинных хетоидных сенсилл) (Рис. 1, С: cfs). Минимальный диаметр тонкой кутикулярной части кампаниформных сенсилл составляет 2,6 μm , максимальный – 5,4 μm .

Грибовидные псевдоплакоидные сенсиллы имеют круглую и плоскую апикальную пластинку, размещённую на короткой толстой ножке. Апикальная пластинка несёт расходящиеся от центра борозды с порами. Эти сенсиллы многочисленны и равномерно покрывают почти всю поверхность члеников обеих пар щупиков у представителей Philopotamidae (Рис. 1, А, С: mps). Несмотря на это сенсиллы данного типа полностью отсутствуют у *Stenopsyche marmorata*. Диаметр пластинки грибовидных псевдоплакоидных сенсилл находится в пределах от 4,1 μm до 9,5 μm . Лепестковидные сенсиллы найдены у всех изученных видов, кроме *Chimarra marginata* и *Wormaldia khourmai* (Philopotamidae).

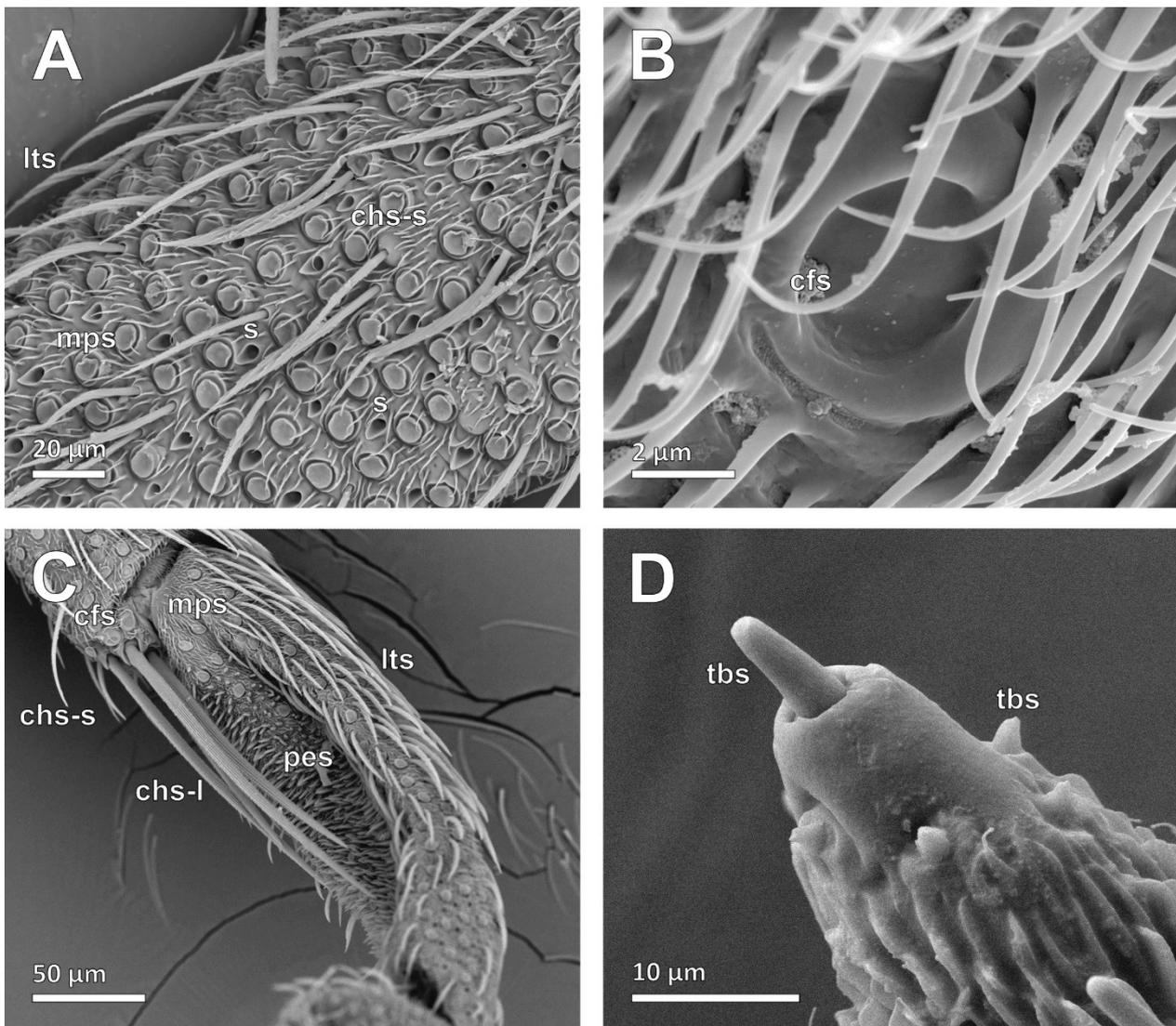


Рисунок 1 – Сенсиллы на щупиках самцов ручейников из семейств Philopotamidae и Stenopsychidae.

(A) Поверхность четвертого сегмента максиллярного щупика *Philopotamus montanus*; (B) кампаниформная сенсилла на первом сегменте лабиального щупика *Chimarra marginata*; (C) третий членик максиллярного щупика *Chimarra thienemanni*; (D) апикальный сенсорный комплекс на пятом сегменте максиллярного щупика *Stenopsyche marmorata*.

Обозначения: lts – длинные трихоидные сенсиллы; s – пустые сокеты длинных трихоидных сенсилл; cfs – кампаниформные сенсиллы; chs-s – короткие хетоидные сенсиллы; chs-l – длинные хетоидные сенсиллы; mps – грибовидные псевдоплакоидные сенсиллы; pes – лепестковидные сенсиллы; tbs – толстые базиконические сенсиллы.

Они формируют сенсорные поля на третьем членике лабиальных щупиков (все изученные виды, кроме *Chimarra marginata*) и на третьем членике максиллярных щупиков (*Chimarra thienemanni* и *Chimarra okuihorum*) (Рис. 1, C: pes). Эти сенсиллы имеют два подтипа: уплощённые и изогнутые. Уплощённые лепестковидные сенсиллы имеют плоскую апикальную часть, расположенную на длинной тонкой ножке под прямым углом к ней. Сенсиллы этого подтипа имеются у всех изученных видов, кроме видов рода *Chimarra*. Изогнутые лепестковидные сенсиллы найдены у *Chimarra thienemanni* и *Chimarra okuihorum* и представляют собой тонкие и слегка искривлённые структуры с заострёнными концами и

слабой спиральной исчерченностью. Длина лепестковидных сенсилл варьирует от 3,1 μm до 10,8 μm

Толстые базиконические сенсиллы – короткие структуры конусовидной формы. Сенсиллы этого типа имеются только на апикальных сенсорных комплексах – структурах с гладкой кутикулой, расположенных на концах апикальных сегментов максиллярных и лабиальных щупиков. Каждый апикальный сенсорный комплекс имеет одну толстую базиконическую сенсиллу на вершине и 1–4 более коротких сенсилл этого типа по бокам (Рис. 1, D). Апикальные сенсорные комплексы, как и толстые базиконические сенсиллы, отсутствуют на обоих парах щупиков у видов рода *Chimarra*. Длина апикальных толстых базиконических сенсилл находится в пределах от 3,1 μm до 7,6 μm . Длина сенсилл данного типа, расположенных по бокам апикального сенсорного комплекса, не превышает 2,3 μm и может быть меньше 1 μm .

Щупики ручейников из семейств Philopotamidae (6 типов сенсилл) и Stenopsychidae (5 типов сенсилл) несут меньшее разнообразие сенсилл, чем антенны (7 типов сенсилл у обоих семейств) [4]. При этом только три типа сенсилл являются общими для щупиков и антенн: длинные трихоидные, хетоидные и грибовидные псевдоплакоидные (не найдены у Stenopsychidae). Кампаниформные, лепестковидные и толстые базиконические сенсиллы, имеющиеся на щупиках, не встречаются на антеннах [4]. В отличие от антенн, несущих однотипные хетоидные сенсиллы, щупики имеют два структурных подтипа этих сенсилл. Несмотря на многочисленность грибовидных псевдоплакоидных сенсилл на обоих парах щупиков у Philopotamidae, эти сенсиллы полностью редуцированы на щупиках Stenopsychidae. Распределение длинных трихоидных и грибовидных псевдоплакоидных сенсилл одинаково на щупиках и антеннах: они равномерно покрывают всю поверхность сегментов. Изогнутые трихоидные сенсиллы, формирующие сенсорные поля на сегментах антенн у Philopotamidae и Stenopsychidae [4], полностью отсутствуют на щупиках. Щупики также имеют сенсорные поля, но они состоят из лепестковидных сенсилл.

Philopotamidae и Stenopsychidae считаются одними из самых базальных семейств Trichoptera [1]. Будущие исследования щупиков других базальных семейств ручейников позволят реконструировать исходный план строения сенсорной поверхности щупиков у этих насекомых.

Благодарности. Автор выражает благодарность В. Д. Иванову, С. И. Мельницкому, а также М. Ю. Валуйскому за предоставленный материал и обсуждение результатов.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-24-00259. Исследование выполнено в рамках проектов № 109-24431 и № 112-28656 ресурсных центров СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» и «Ресурсный центр микроскопии и микроанализа».

Библиографический список

1. Holzenthal R. W., Blahnik R. J., Kjer K. M., Prather A. P. An update on the phylogeny of caddisflies (Trichoptera) // Proceedings of the 12th International Symposium on Trichoptera. The Caddis Press, Columbus, Ohio. – 2007. – P. 143-153.
2. Chapman, R. F. The insects. Structure and function. – London: Hodder and Stoughton, 1969.
3. Иванов, В. П. Органы чувств насекомых и других членистоногих. – Москва: Наука, 2000.

4. Melnitsky S. I., Ivanov V. D., Valuyskiy M. Yu., Zueva L.V., Zhukovskaya M. I. Comparison of sensory structures on the antenna of different species of Philopotamidae (Insecta: Trichoptera) // *Arthropod structure & development*. – 2018. – V. 47. – №. 1. – P. 45-55.
5. Ivanov V. D., Melnitsky S. I., Razvodovskaya I. V. The Structure and evolution of the apical sensory zone structures in the maxillary and labial palps of caddisflies (Trichoptera) // *Entomological Review*. – 2018. – V. 98. – No. 2. – P. 138-151.

ЛЕТНЕЕ НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ Г. ЧЕХОВА (ЮЖНОЕ ПОДМОСКОВЬЕ)

Баркова М.А., Железнова Т.К.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

Аннотация: в работе проанализированы данные по летнему населению птиц в одном из городов на юге Московской области; обсуждаются показатели суммарного обилия птиц, видовое богатство и состав доминирующих видов.

Ключевые слова: южное Подмосковье, плотность населения птиц, доминанты.

SUMMER BIRD POPULATION OF CHEKHOV (SOUTHERN MOSCOW REGION)

Barkova M.A., Zheleznova T.K.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract. the paper analyzes data on the summer bird population in one of the cities in the south of the Moscow region; discusses the total abundance of birds, species richness and composition of the dominant species.

Keywords: southern Moscow region, bird population density, dominants.

Материалом для статьи послужили данные, полученные 16 мая-31 августа 2022 г. в ходе маршрутных учетов птиц в городе Чехове, находящемся в 55 км от Москвы, на реке Лопасне. Площадь города 23,4 км², население составляет 69 843 человек [1].

Учеты проводились по методике Ю.С. Равкина [2] с двухнедельной повторностью. Норма учета составила 5 км, общая протяженность маршрутов за лето – 35 км. В городе заложено два маршрута для наибольшего охвата разнообразия топических и экологических условий. В работе рассматриваются усредненные за летний период количественные показатели, рассчитанные на один км². Расчеты проведены отдельно для первой половины лета (репродуктивный период: 16 мая-15июля) и второй его половины (пострепродуктивный период: 16 июля-31 августа). Фоновыми видами считали виды, обилие которых выражается целыми числами (от одной особи/км² и выше), доминантами – виды, доля которых от суммарного обилия птиц составляет не ниже 10% [3]. Названия птиц приводятся по Е.А. Коблику и др. [4].

Летом в г. Чехове зарегистрировано 44 вида птиц, принадлежащих к 7 отрядам (табл.). Доминантные виды для первой половины лета: сизый голубь (27,4%), полевой воробей (24,8), черный стриж (10,2). В составе фоновых находятся 30 видов птиц.

Таблица – Летнее население птиц г. Чехова, 16 мая – 31 августа 2022 г., особей/км²

№ п/п	Виды птиц	1 половина лета	2 половина лета
1.	Кряква <i>Anas platyrhynchos</i>	25	75
2.	Канюк <i>Buteo buteo</i>	0.2	0
3.	Обыкновенная пустельга <i>Falco tinnunculus</i>	0.2	0.2
4.	Сизая чайка <i>Larus canus</i>	6	2
5.	Озёрная чайка <i>Larus ridibundus</i>	7	0.2
6.	Речная крачка <i>Sterna hirundo</i>	2	2
7.	Сизый голубь <i>Columba livia</i>	222	340
8.	Чёрный стриж <i>Apus apus</i>	83	79
9.	Большой пёстрый дятел <i>Dendrocopos major</i>	0.5	4
10.	Малый пёстрый дятел <i>Dendrocopos minor</i>	2	0
11.	Деревенская ласточка <i>Hirundo rustica</i>	4	5
12.	Воронок <i>Delichon urbica</i>	0.5	3
13.	Белая трясогузка <i>Motacilla alba</i>	50	52
14.	Обыкновенный скворец <i>Sturnus vulgaris</i>	12	0
15.	Серая ворона <i>Corvus cornix</i>	51	38
16.	Галка <i>Corvus monedula</i>	37	111
17.	Грач <i>Corvus frugilegus</i>	0.2	0
18.	Ворон <i>Corvus corax</i>	0.2	0.7
19.	Сорока <i>Pica pica</i>	0.2	0
20.	Садовая камышевка <i>Acrocephalus dumetorum</i>	0.7	0
21.	Болотная камышевка <i>Acrocephalus palustris</i>	0.8	0
22.	Пеночка-теньковка <i>Phylloscopus collybita</i>	2	0.7
23.	Зелёная пеночка <i>Phylloscopus trochiloides</i>	0.3	0.7
24.	Серая славка <i>Sylvia communis</i>	4	0
25.	Славка-черноголовка <i>Sylvia atricapilla</i>	1	0
26.	Садовая славка <i>Sylvia borin</i>	0	3
27.	Мухоловка-пеструшка <i>Ficedula hypoleuca</i>	4	0
28.	Серая мухоловка <i>Muscicapa striata</i>	0	4
29.	Зарянка <i>Erithacus rubecula</i>	5	0.9
30.	Варакушка <i>Luscinia svecica</i>	4	0
31.	Обыкновенный соловей <i>Luscinia luscinia</i>	1	0
32.	Луговой чекан <i>Saxicola rubetra</i>	0	1
33.	Рябинник <i>Turdus pilaris</i>	2	0.3
34.	Лазоревка <i>Parus caeruleus</i>	7	5
35.	Большая синица <i>Parus major</i>	21	15
36.	Обыкновенный поползень <i>Sitta europaea</i>	3	0.2
37.	Полевой воробей <i>Passer montanus</i>	201	230
38.	Домовый воробей <i>Passer domesticus</i>	9	51
39.	Зяблик <i>Fringilla coelebs</i>	15	12
40.	Обыкновенная зеленушка <i>Chloris chloris</i>	5	3
41.	Щегол <i>Carduelis carduelis</i>	14	5
42.	Чиж <i>Spinus spinus</i>	6	0
43.	Обыкновенная чечевица <i>Carpodacus erythrinus</i>	0.3	0
44.	Тростниковая овсянка <i>Emberiza schoeniclus</i>	2	0
	Всего	811	1044

Во второй половине лета состав доминантов видов изменился несущественно: это по-прежнему сизый голубь (32,6) и полевой воробей (22), но место чёрного стрижа начинает

занимать галка (10,6). В пострепродуктивный период число фоновых видов заметно снижается – до 21 вида.

По сравнению с первой половиной лета после размножения и вылета выводков увеличилась плотность населения таких видов, как кряква, сизый голубь, галка, полевой и домовый воробьи. Вместе с тем, орнитокомплекс заметно обедняется из-за откочевки ряда видов после окончания репродуктивного периода [5]: обыкновенного скворца, садовой и болотной камышевок, серой славки и славки-черноголовки, варакушки, обыкновенного соловья, чижа, обыкновенной чечевицы и тростниковой овсянки. В связи с этим видовое богатство птиц от первой половины лета ко второй снижается с 41 вида до 29.

Библиографический список

1. Сайт: Росстат [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://rosstat.gov.ru/compendium/document/13282>, свободный. – Загл. с экрана.
2. Кузякин А.П. 1962. Зоогеография СССР // Учён. Зап. Моск. обл. пед. ин-та им. Крупской 109, 1: 3–182.
3. Равкин Ю.С. К методике учета птиц в лесных ландшафтах // Природа очагов клещевого энцефалита на Алтае. Новосибирск 1967. с. 66–75.
4. Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.Ю. Список птиц Российской Федерации // М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 256 с.
5. Михеев А.В. Послегнездовые кочевки птиц и их причины // Русский орнитологический журнал, Том 22, 2013 – с. 1267–1271.

ЛЕТНЕЕ НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ ПОСЕЛКОВ ЮЖНОГО ПОДМОСКОВЬЯ

Безверхая Е.С., Железнова Т.К.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

Аннотация. Сравняется летнее население птиц двух типологически различающихся поселков южного Подмосковья – крупного рабочего посёлка с разнотипной застройкой и небольшого поселка дачно-сельского типа. Анализируются суммарное обилие птиц, видовое богатство, состав доминантов и степень фаунистического сходства орнитокомплексов.

Ключевые слова: южное Подмосковье, население птиц, доминанты, индекс Жаккара.

SUMMER BIRD POPULATION OF THE VILLAGES OF THE SOUTHERN MOSCOW REGION

Bezverchaia E.S., Zheleznova T.K.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract. The summer bird population of two typologically different settlements of the southern Moscow region is compared – a large working settlement with different types of buildings and a small country-rural type settlement. The total abundance of birds, species richness, the composition of dominants and the degree of faunal similarity of ornithocomplexes are analyzed.

Keywords: southern Moscow region, bird population, dominants, Jacquard index.

Материалом для статьи послужили данные, полученные в ходе маршрутных учётов птиц в двух посёлках южного Подмосковья – Шарапова Охота и Столбовая, проведённых 1 июня – 31 августа 2022 г.

Посёлок дачно-сельского типа Шарапова Охота основан в начале 19 в. В нём преобладает одноэтажная застройка; часть территории занята садоводческими товариществами. Улицы и усадьбы значительно озеленены. Площадь посёлка ориентировочно составляет 6 км², население 711 человек [6]. Рабочий посёлок Столбовая основан в 1863 г., в 1968 г. получил статус посёлка городского типа. На его территории находится Чеховский завод мостовых конструкций, предприятия железнодорожного транспорта. Население Столбовой на 2021 г. составляет 5403 человека [6]. Характеризуется посёлок незначительным озеленением улиц, застройкой смешанного типа (частные одноэтажные и пятиэтажные дома).

Птиц учитывали на маршрутах по методике Ю.С. Равкина (1967) [1]. Норма учёта составила 5 км, с двухнедельной повторностью. Всего проведено 12 учётов, общей

протяжённостью 60 км. В работе рассматриваются усредненные за летний период количественные показатели, рассчитанные на один км².

Расчеты проведены раздельно для первой половины лета (репродуктивный период: 16 мая-15июля) и второй его половины (пострепродуктивный период: 16 июля-31 августа). Фоновыми видами считали виды, обилие которых выражается целыми числами (от одной особи/км² и выше), доминантами – виды, доля которых от суммарного обилия птиц составляет не ниже 10% [3]. Доминантными считались виды, составляющие не менее 10% от общего обилия. Рассчитан индекс Жаккара [2], используемый для определения сходства орнитофаун. Названия птиц приводятся по Е.А. Коблику и др. [7].

В первой половине лета в обоих посёлках суммарное обилие практически не различалось (таблица). В Шараповой Охоте всего отмечено 55 видов, принадлежащих к 11 отрядам, в Столбовой на 16 видов меньше (39; 10 отрядов). В этот период в посёлке дачно-сельского типа доминирует только 1 вид: полевой воробей (30%). В посёлке городского типа состав доминантов разнообразнее: сизый голубь (24%) обыкновенный скворец (20%), полевой воробей (16%).

Таблица – Летнее население птиц посёлков Шарапова Охота и Столбовая, особей/км²

№ п/п	Виды птиц	п. Шарапова Охота		п. Столбовая	
		1 п/л	2 п/л	1 п/л	2 п/л
1.	Серая цапля, <i>Ardea cinerea</i>	0	0.1	0,05	0
2.	Кряква, <i>Anas platyrhynchos</i>	29	46	1	0
3.	Канюк, <i>Buteo buteo</i>	0.2	0	0,08	0,3
4.	Полевой лунь, <i>Circus cyaneus</i>	0.2	0	0	0
5.	Черный коршун, <i>Milvus migrans</i>	0	0	0,1	0,7
6.	Обыкновенная пустельга, <i>Falco tinnunculus</i>	0.7	0.9	2	0,2
7.	Камышница, <i>Gallinula chloropus</i>	6	7	0	0
8.	Коростель, <i>Crex crex</i>	0,6	0,2	0,8	0
9.	Чибис, <i>Vanellus vanellus</i>	3	0	0	0
10.	Сизая чайка, <i>Larus canus</i>	0.4	0.2	2	0
11.	Озёрная чайка, <i>Larus ridibundus</i>	5	0	2	0
12.	Серебристая чайка, <i>Larus argentatus</i>	0.3	0	0,2	0
13.	Речная крачка, <i>Sterna hirundo</i>	0	0	2	0
14.	Сизый голубь, <i>Columba livia</i>	6	14	129	127
15.	Вяхирь, <i>Columba palumbus</i>	5	6	0	0,7
16.	Обыкновенная кукушка, <i>Cuculus canorus</i>	0.3	0	0	0
17.	Чёрный стриж, <i>Apus apus</i>	24	3	55	9
18.	Большой пёстрый дятел, <i>Dendrocopos major</i>	1	0.2	3	4
19.	Малый пёстрый дятел, <i>Dendrocopos minor</i>	0.4	0	0	0
20.	Средний пёстрый дятел, <i>Dendrocopos medius</i>	0	0.7	0	0
21.	Седой дятел, <i>Picus canus</i>	0	0	0,5	0
22.	Деревенская ласточка, <i>Hirundo rustica</i>	17	9	4	0
23.	Воронок, <i>Delichon urbica</i>	0	0	0	1
24.	Белая трясогузка, <i>Motacilla alba</i>	24	12	19	66
25.	Желтоголовая трясогузка, <i>Motacilla citreola</i>	1	0	0	0
26.	Жёлтая трясогузка, <i>Motacilla flava</i>	2	1	0	0
27.	Обыкновенный жулан, <i>Lanius collurio</i>	4	0	0	0
28.	Серая ворона, <i>Corvus cornix</i>	24	13	19	10

Таблица (окончание)

№ п/п	Виды птиц	п. Шарапова Охота		п. Столбовая	
		1 п/л	2 п/л	1 п/л	2 п/л
29.	Сорока, <i>Pica pica</i>	8	11	10	16
30.	Галка, <i>Corvus monedula</i>	11	12	36	86
31.	Обыкновенный скворец, <i>Sturnus vulgaris</i>	45	0	108	0
32.	Садовая камышевка, <i>Acrocephalus dumetorum</i>	0.2	0	0,6	8
33.	Болотная камышевка, <i>Acrocephalus palustris</i>	4	5	0,2	0
35.	Камышевка-барсучок, <i>Acrocephalus schoenobaenus</i>	0.4	0	0	0
35.	Зелёная пересмешка, <i>Hippolais icterina</i>	1	0	0	0
36.	Пеночка-весничка, <i>Phylloscopus trochilus</i>	12	9	0	0
37.	Пеночка-теньковка, <i>Phylloscopus collybita</i>	3	2	0,2	0
38.	Славка-черноголовка, <i>Sylvia atricapilla</i>	10	3	0,6	0
39.	Славка-мельничек, <i>Sylvia curruca</i>	0.5	0	0	0
40.	Серая славка, <i>Sylvia communis</i>	6	5	5	0
41.	Мухоловка-пеструшка, <i>Ficedula hypoleuca</i>	0.4	6	0	0
42.	Обыкновенный соловей, <i>Luscinia luscinia</i>	1	0	0,3	0
43.	Горихвостка-чернушка, <i>Phoenicurus ochruros</i>	3	0	1	0,7
44.	Обыкновенная горихвостка, <i>Phoenicurus phoenicurus</i>	2	0	0	3
45.	Луговой чекан, <i>Saxicola rubetra</i>	2	0	0	0
46.	Рябинник, <i>Turdus pilaris</i>	23	160	3	31
47.	Чёрный дрозд, <i>Turdus merula</i>	2	0	0	0
48.	Зарянка, <i>Erithacus rubecula</i>	5	11	0	0,7
49.	Варакушка, <i>Luscinia svecica</i>	7	3	0,2	0
50.	Большая синица, <i>Parus major</i>	27	58	39	31
51.	Пухляк, <i>Parus montanus</i>	4	3	3	0
52.	Лазоревка, <i>Parus caeruleus</i>	2	34	6	27
53.	Обыкновенный поползень, <i>Sitta europaea</i>	2	3	0	0
54.	Полевой воробей, <i>Passer montanus</i>	165	257	93	193
55.	Домовый воробей, <i>Passer domesticus</i>	8	3	37	84
56.	Зяблик, <i>Fringilla coelebs</i>	4	10	5	0
57.	Обыкновенная зеленушка, <i>Chloris chloris</i>	15	2	3	0
58.	Щегол, <i>Carduelis carduelis</i>	7	5	5	12
59.	Обыкновенная чечевица, <i>Carpodacus erythrinus</i>	1	0	0	0
60.	Коноплянка, <i>Acanthis cannabina</i>	2	0	0	0
61.	Чиж, <i>Spinus spinus</i>	0	10	0	0
62.	Обыкновенный снегирь, <i>Pyrrhula pyrrhula</i>	0	0.3	0	0,2
63.	Обыкновенный дубонос, <i>Coccothraustes coccothraustes</i>	2	0.9	0	5
	Всего	539	738	536	717

Во второй половине лета суммарное обилие птиц в обоих посёлках возросло, но показатели по-прежнему, как и в первой половине лета, различаются мало. В этот период в посёлке дачно-сельского типа появляется новый доминант, помимо полевого воробья – дрозд рябинник (22%). В посёлке городского типа доминантный состав существенно меняется: полевой воробей (27%), сизый голубь (18%), домовый воробей (18%), галка (12%), Общее видовое богатство снижается в пострепродуктивный период в обоих посёлках: 36 и 24 вида, соответственно.

На долю доминантных особей в рабочем посёлке приходится большая часть суммарного обилия птиц: 61% для первой половины лета и 69% – для второй. В дачно-сельском посёлке доминирующие виды вносят меньший вклад в плотность населения орнитокомплекса – всего 30 и 57 %, соответственно в разные половины лета.

Суммарное обилие птиц существенно повышается ко второй половине лета, как отмечено выше, что связано с прикочёвкой дрозда рябинника в посёлок дачно-сельского типа, а также со значительным увеличением численности полевого воробья в результате размножения в обоих посёлках.

Фаунистический индекс Жаккара рассчитан нами и для сравнения посёлков между собой (по временным периодам), и для сравнения орнитофауны по половинам лета для каждого посёлка отдельно. Наиболее высокий индекс фаунистического сходства Жаккара характерен для половин лета в дачно-сельском посёлке – 58 %, для рабочего посёлка значения индекса ниже – 44 %. Между собой эти два посёлка весьма различаются по составу птиц во второй половине лета, но в репродуктивный период значение индекса относительно высокое: 35 и 56 %, соответственно.

Библиографический список

1. Равкин Ю.С. К методике учета птиц в лесных ландшафтах//Природа очагов клещевого энцефалита на Алтае. Новосибирск 1967. с. 66–75.
2. Jaccard, P. Distribution de la flore alpine dans le Bassin des Dranses et dans quelques regions voisines / P. Jaccard //Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles. – 1901. – Vol. 37. – P. 241-272.
3. Краснобаев Д.А. Константинов В.М. Сезонная и многолетняя динамика фауны и населения птиц урбанизированных ландшафтов Центрального района Европейской России за 40-летний период//Русский орнитологический журнал. – 2008. – №17. – С. 879-907.
4. Сайт: Всемирный список птиц Международного союза орнитологов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.worldbirdnames.org/new/>, свободный. – Загл. с экрана.
5. Статья пространственно-типологическая структура и организация населения птиц [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://geography-ege.ru/prostranstvenno-tipologicheskaya-struktura-i-organizaciya-naseleniya-ptic>, свободный. – Загл. с экрана.
6. Сайт: Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://rosstat.gov.ru/vpn_popul, свободный. – Загл. с экрана.
7. Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.Ю. Список птиц Российской Федерации. – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2006

ПОЛИХЛОРИРОВАННЫЕ БИФЕНИЛЫ В МОЛЛЮСКАХ СЕМЕЙСТВА MYTILIDAE ЗАЛ. ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ)

Боровкова А. Д., Боярова М. Д., Цыганков В. Ю.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Аннотация: Среди органических соединений наиболее малоизученными и губительными для живых организмов считаются стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ), к которым относятся хлорорганические пестициды (ХОП) и полихлорированные бифенилы (ПХБ). Большинство этих веществ негативно воздействуют на живые организмы и здоровье людей. В статье представлены современные данные о содержании ПХБ в мягких тканях двустворчатых моллюсков семейства Mytilidae зал. Петра Великого (Японское море).

Ключевые слова: стойкие органические загрязняющие вещества, полихлорированные бифенилы, двустворчатые моллюски, Японское море.

POLYCHLORINATED BIPHENYLS IN MOLLUSKS OF FAMILY MYTILIDAE FROM PETER THE GREAT BAY (THE SEA OF JAPAN)

Borovkova A. D., Boyarova M. D., Tsygankov V. Yu.

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract: Among organic compounds, persistent organic pollutants (POPs) are considered to be one of the most unstudied and hazardous class, which includes organochlorine pesticides (OCPs) and polychlorinated biphenyls (PCBs). Most of these substances negatively impact on pond life and human health. The article presents current data on the content of PCBs in Mytilidae bivalves' soft tissues from Peter the Great Bay (Sea of Japan).

Keywords: persistent organic pollutants, polychlorinated biphenyls, bivalves, the Sea of Japan.

Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) – класс наиболее опасных токсикантов с точки зрения воздействия на окружающую среду и здоровье человека. К СОЗ относятся производимые человеком химические вещества, используемые в сельском хозяйстве, санитарно-эпидемиологическом контроле, производстве или технологических процессах (ДДТ и ГХЦГ), и выделяющиеся в ходе некоторых производственных процессов и при сгорании (ПХБ (полихлорированные бифенилы), диоксины, фураны) [1].

ПХБ – группа хлорированных углеводородов, включающая все хлорзамещенные производные бифенила. Индивидуальные ПХБ различаются количеством и положением атомов хлора в молекуле. Теоретически возможно существование 209 изомеров ПХБ. Однако, до настоящего времени в объектах окружающей среды были идентифицированы только 130 конгенов. С увеличением числа атомов хлора уменьшается их растворимость в воде и давление пара, при этом растворимость в липидах повышается [2].

В окружающей среде полихлорированные бифенилы распространены повсеместно. Их стабильность зависит от количества и расположения атомов хлора в молекуле. К тому же ПХБ устойчивы к гидролизу и биотрансформации в воде, но при фотолизе на солнечном свете могут в процессе ряда последовательных реакций образовывать диоксины, гораздо более токсичные вещества по сравнению с ПХБ [2].

Известно, что основная опасность этих токсикантов для человека представлена их мутагенным воздействием, что в том числе негативно сказывается на здоровье будущих поколений. С воздействием ПХБ на организм человека связывают изменение ферментов печени, гематомегалию, появление сыпи, акне и др. [3].

Проблема загрязнения прибрежных акваторий Дальнего Востока полихлорированными бифенилами мало изучена, и потому является актуальной.

В связи с этим цель исследования заключается в определении уровней содержания ПХБ в мягких тканях двустворчатых моллюсков семейства Mytilidae зал. Петра Великого (Японское море).

Индикаторами загрязнения акватории служили моллюски семейства Mytilidae (*Crenomytilus grayanus*, *Modiolus modiolus* и *Mytilus trossulus*), отобранные в разных частях залива в период с лета 2017 по лето 2018 гг. (рис. 1).

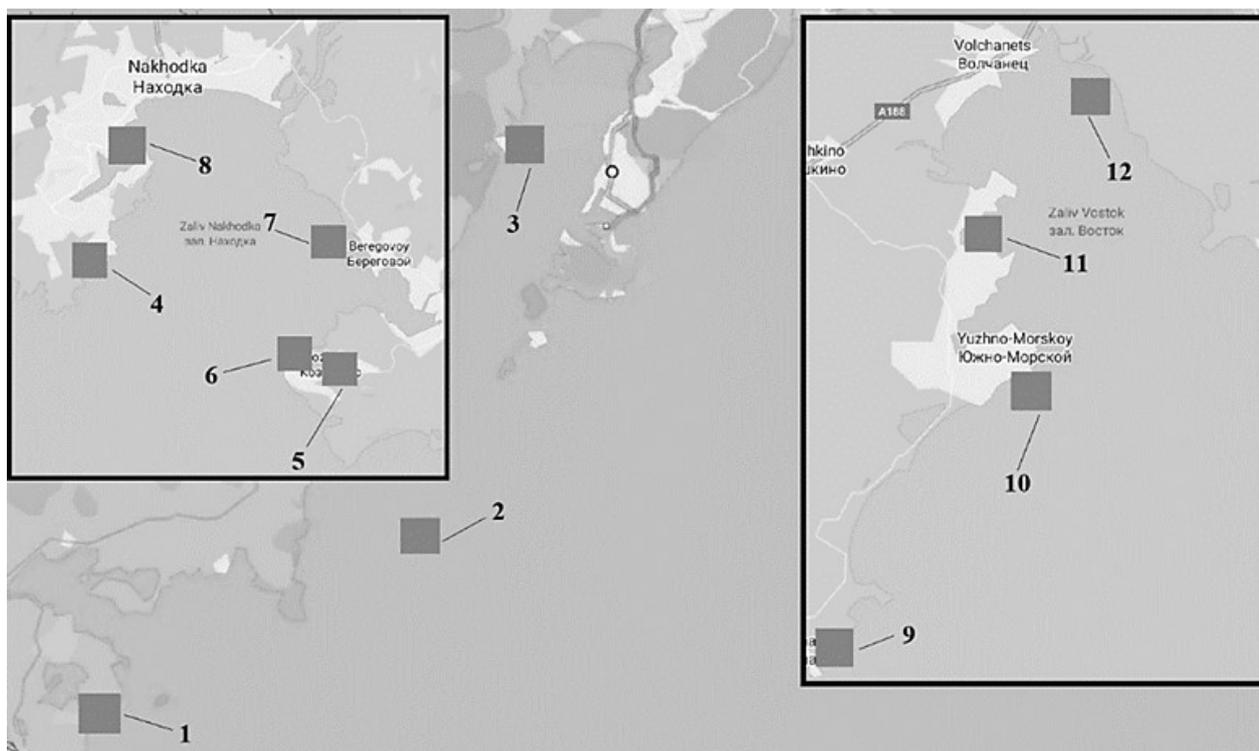


Рисунок 1 – Карта отбора проб: 1 – м. Веры; 2 – о. Большой Пелис; 3 – м. Чихачева; 4 – б. Мусатова; 5 – б. Козьмино; 6 – м. Козьмина; 7 – м. Красный; 8 – зал. Находка; 9 – б. Стрельбище; 10 – м. Чайковского; 11 – б. Средняя; 12 – б. Литовка.

Массовое содержание хлорорганических соединений в биологических образцах определяли методом газовой хроматографии.

Липиды экстрагировали из гомогенатов мягких тканей индивидуальных особей, используя смесь *n*-гексана и ацетона, с последующим разрушением жировых компонентов концентрированной серной кислотой [4]. Полученный экстракт разделяли на колонке через

полярный и неполярный растворитель. Среди ПХБ в исследованных образцах определяли 28, 52, 101, 118, 153 и 138 конгенеры.

В 100 исследуемых особях моллюсков ПХБ обнаружены в диапазоне концентраций от 0,6 нг/г липидов до 610,5 нг/г (ср. $42,14 \pm 67,97$ нг/г). На всех станциях, кроме б. Литовка и б. Стрельбище, преобладал 28 ПХБ, что свидетельствует о недавнем поступлении токсикантов в окружающую среду.

Высокие показатели концентраций ПХБ зафиксированы в пробах, отобранных в б. Козьмина: во всех особях обнаружен только 28 ПХБ в пределах от 68,0 нг/г липидов до 151,2 нг/г, сумма концентраций составляла 673,2 нг/г (ср. $112,2 \pm 36,17$ нг/г). На территории бухты с 2009 года функционирует нефтеналивной терминал, что может служить причиной загрязнения акватории ПХБ. Кроме того, ранее бухта использовалась как аэродром для гидросамолетов, а в 90-х гг. как пункт разбора морских судов. Наиболее низкие показатели концентраций ПХБ имеет район о. Большой Пелис, расположенный в пределах Дальневосточного морского заповедника (рис. 2).

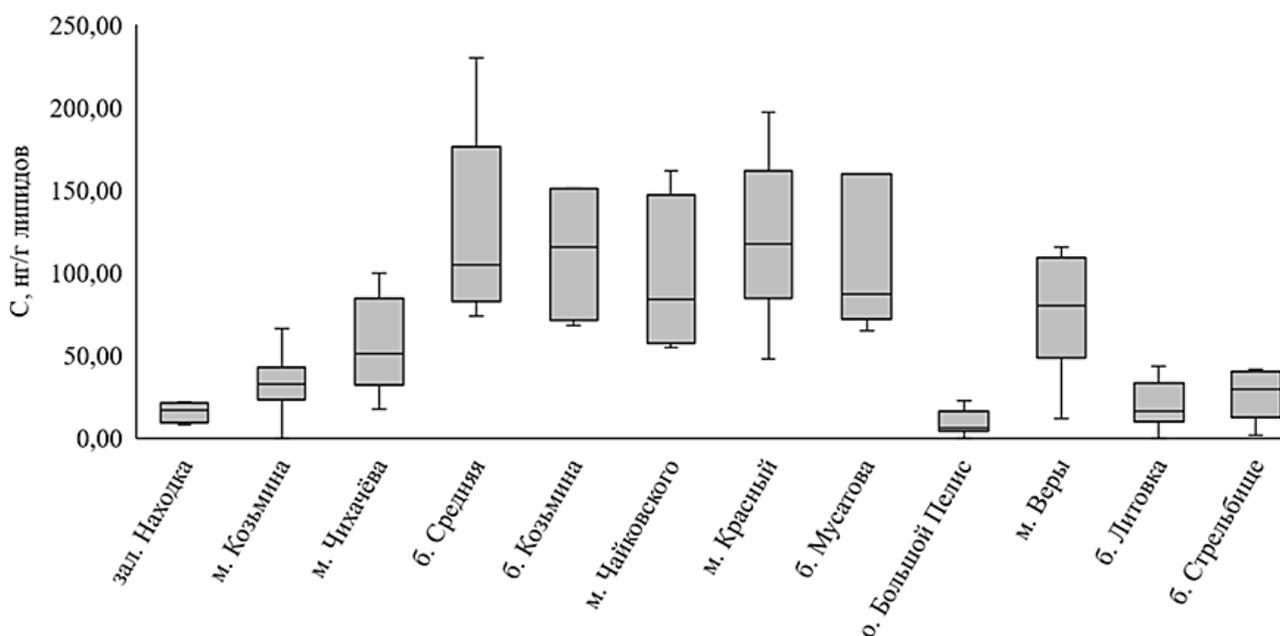


Рисунок 2 – Средние уровни ΣПХБ в исследованных районах.

Несмотря на то, что проблема загрязнения естественных экосистем СОЗ является актуальной и глобальной, изучению поступления хлорированных углеводородов в окружающую среду посвящено не много работ. В таблице 1 представлены данные некоторых зарубежных исследований, направленных на определение уровней концентраций ПХБ в мягких тканях двустворчатых моллюсков.

Результаты сравнительного анализа свидетельствуют о том, что среди исследованных регионов наиболее низкие уровни загрязнения ПХБ отмечаются в акватории зал. Петра Великого. Такие показатели связаны с отсутствием развитого промышленного комплекса на территории залива. Наиболее высокие концентрации полихлорированными бифенилами зафиксированы в районе о. Хатсушима, где функционируют промышленные предприятия различной специализации и характерно активное судоходство.

Таблица 1 – Данные мировых исследований содержания ПХБ (нг/г липидов) в мягких тканях двустворчатых моллюсков.

Вид	Район	Год	ΣПХБ	Источник
<i>Bathymodiolus japonicus</i>	о. Хатсушима	2019	106	Tetsuro Ikuta et al. [6]
<i>Bathymodiolus septemdiernum</i>	гидротермальные источники на холме Мёджин, Япония		38	
<i>Mya truncata</i>	Архипелаг Шпицберген	2011	78.14 ± 50.7	Ireen Vieweg et al. [7]
<i>Serripes groenlandicus</i>			58.55 ± 35.4	
<i>Hiatella arctica</i>			55.36 ± 27.73	
<i>Chlamys islandica</i>			59.47 ± 25.93	
<i>Crenomytilus grayanus</i>	зал. Петра Великого	2017-2018	49,38 ± 85,31	Эта работа
<i>Modiolus modiolus</i>			40,52 ± 58,15	
<i>Mytilus trossulus</i>			30,73 ± 15,55	

Таким образом, согласно полученным данным, наблюдается продолжающееся загрязнение акватории зал. Петра Великого полихлорированными бифенилами. ПХБ включены в список «грязной дюжины» веществ Стокгольмской конвенции, однако, они относятся к категории непреднамеренно производимых соединений, что в значительной степени усложняет процесс утилизации токсикантов. В связи с этим, на территории Приморского края наблюдается поступление низкохлорированных конгенов в окружающую среду. Кроме того, присутствие форм, свидетельствующих о кратковременном пребывании поллютантов в акватории, может быть обусловлено трансграничным переносом водными и воздушными массами с территорий, подверженных более высокой техногенной нагрузке.

Библиографический список

1. El-Shahawi, M.S. A. Hamzaa, A.S. Bashammakh, W.T. Al-Saggaf. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants // *Talanta*, 2009. – P. 1587–1597.
2. Цыганков, В. Ю., Донец М. М., Христофорова Н. К. [и др.]. Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) в Дальневосточном регионе: моря, организмы, человек: монография // науч. ред. В.Ю. Цыганков. – Владивосток: Изд-во Дальневост. федерал. ун-та, 2020. – 344 с.
3. Carson, R. *Silent spring*/ R. Carson. – Houghton Mifflin Harcourt, 1962. – 216 p.
4. Tsygankov, V.Yu., Boyarova M.D. Sample Preparation Method for the Determination of Organochlorine Pesticides in Aquatic Organisms by Gas Chromatography // *Achievements in the Life Sciences*. – 2015. – V. 9. – P. 65–68.
5. Донец, М. М., Цыганков В. Ю. Современные уровни загрязняющих веществ в промышленных объектах дальневосточных морей России // *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. – 2019. – № 4. – С. 90-103.

6. Tetsuro Ikuta, Ryota Nakajima, Masashi Tsuchiya, Sanae Chiba, Katsunori Fujikura. Interdecadal Distribution of Persistent Organic Pollutants in Deep-Sea Chemosynthetic Bivalves // *Front. Marine Sci.* – 2021.
7. Ireen Vieweg, Haakon Hop, Thomas Brey, Sandra Huber, William G. Ambrose Jr., William L. Locke V, Geir W. Gabrielsen. Persistent organic pollutants in four bivalve species from Svalbard waters // *Environmental Pollution.* – 2011. – P. 134-142.

НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ ДОЛИНЫ РЕКИ ИВЫ

Варушкина Т.С., Матвеева Г.К.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В работе рассмотрены особенности населения птиц в долине малой реки Ивы, протекающей по территории г. Перми. На основе маршрутных учетов выявлены состав и структура орнитофауны, которые в значительной степени характеризуют современное состояние речной долины и её роль в поддержании орнитологического разнообразия города. Также определена сезонная динамика видового богатства, обилия и стандартных показателей биоразнообразия.

Ключевые слова: население птиц, малые реки, сезонная динамика, биоразнообразие.

BIRD COMMUNITY IN THE VALLEY OF IVA RIVER

Varushkina T.S., Matveeva G.K.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The article considers the features of the bird community in the valley of Iva river flowing through the territory of the city of Perm. Based on the line transect method we revealed composition and structure of avifauna which significantly characterize the current state of the river valley and its role in maintaining the ornithological diversity of the city. Seasonal dynamics of species richness, abundance and standard indicators of biodiversity were calculated for bird community.

Keywords: bird community, small rivers, seasonal dynamic, biodiversity.

Для города Перми характерна развитая гидрографическая сеть, важное значение в которой имеют малые реки. В городской среде их долины и русла выступают в качестве элементов «экологического каркаса», обеспечивающих связь между различными местообитаниями; коридоров проникновения орнитофауны на антропогенную территорию; миграционных путей; резерватов для редких видов; а также, гнездовых и кормовых станций [1].

Река Ива, образованная слиянием Большой Ивы и Малой Ивы, которые начинаются в лесном массиве, протекает по территории города с юга на север и является левым притоком р. Камы (рис. 1). Общая протяженность р. Ивы составляет 10,5 км, в верхнем течении имеется спущенный пруд, в районе которого пойма заболочена, кроме того, в долине имеются многочисленные родники, в местах впадения которых образуются участки с развитой прибрежной растительностью. Часть русла вблизи впадения в Каму заключена в коллектор. Склоны долины заняты садовыми участками, хозяйственными и жилыми постройками, растительность представлена в основном ивняками и сероольховниками, в верхнем течении сохраняется развитый древостой [2].

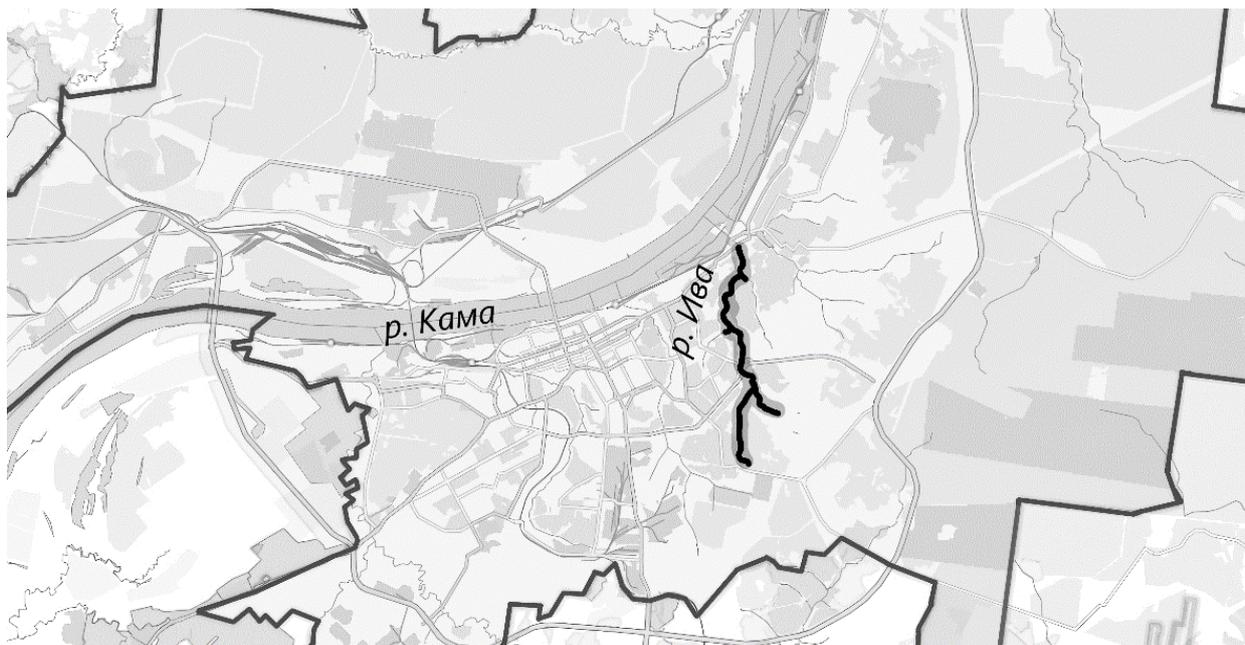


Рисунок 1 – долина р. Ивы на карте города Перми.

Особенности географического положения позволяют долине р. Ивы участвовать в перемещении орнитофауны между пригородными территориями, центральными районами города и крупной рекой Камой, и вместе с этим – осуществлять необходимый для функционирования городских экосистем перенос вещества и энергии [1]. Кроме того, ряд особенностей речной долины создает в ее пределах многообразие экологических ниш, что дает возможность для формирования сложной таксономической и экологической структуры населения птиц.

Материалы и методы

Сбор материала проходил с октября 2020г по май 2022г по методике Ю.С. Равкина [3]. В долине р. Ивы было заложено 2 постоянных маршрута, суммарная протяженность которых составила 7,4 км. Регистрация встреченных особей (отдельно сидящие и летящие) производилась с учетом дальности полосы обнаружения. Количественным показателем при маршрутных учетах являлось обилие каждого вида в пересчете на площадь (особ. / км²) с учетом экстраполяционных коэффициентов.

В дальнейшем сравнение параметров проводилось в 6 сезонных аспектов населения птиц (зимний, предвесенний, весенний, гнездовой, постгнездовой и осенний). Характер пребывания вида (гнездящиеся перелетные, оседлые, кочующие, зимующие, пролетные) определялся на основе собственных наблюдений и литературных данных [4], экологические группы птиц (дендрофилы, лимнофилы, эвритофы, кампофилы, склерофилы, синантропы) даны в соответствии с классификацией С.В. Сазонова [5]. Для оценки количественных характеристик использовалась шкала доминирования А.П. Кузьякина [6]. Также для сравнения количественных характеристик населения птиц по сезонам были рассчитаны стандартные показатели биологического разнообразия: информационный индекс Шеннона и мера доминирования Симпсона [7]. Таксономический состав приведен по Е.А. Коблику, В.Ю. Архипову [8].

За период исследования в долине р. Ивы было зарегистрировано 73 вида птиц (69 из которых встречены во время маршрутных учетов), что составляет 28% от разнообразия птиц

г. Перми и его окрестностей [4]. Также во время весеннего пролета в долине отмечен один вид, занесенный в Красную книгу Пермского края (II категория редкости) – овсянка-ремез.

Орнитофауна р. Ивы включает представителей 10 отрядов из 27 семейств. Наибольшую долю в видовом составе имеет отряд Воробьеобразные (53 вида), далее следуют отряды Дятлообразные (5 видов), Соколообразные, Ржанкообразные (по 3 вида) и Голубеобразные (2 вида). В отрядах Кукушкообразные, Журавлеобразные, Стрижеобразные, Гусеобразные, СOVOобразные, выявлено по 1 виду птиц.

Среди Воробьеобразных наибольшую долю в видовом составе имеют семейства Вьюрковые (12 видов), Дроздовые (10 видов) и Славковые (9 видов).

По характеру пребывания среди видов, зарегистрированных в долине, преобладают гнездящиеся виды, в том числе: перелетные (28 видов) и оседло-кочующие (21 вид); также значительна доля видов, посещающих долину только во время сезонных кочевок (рис.2А).

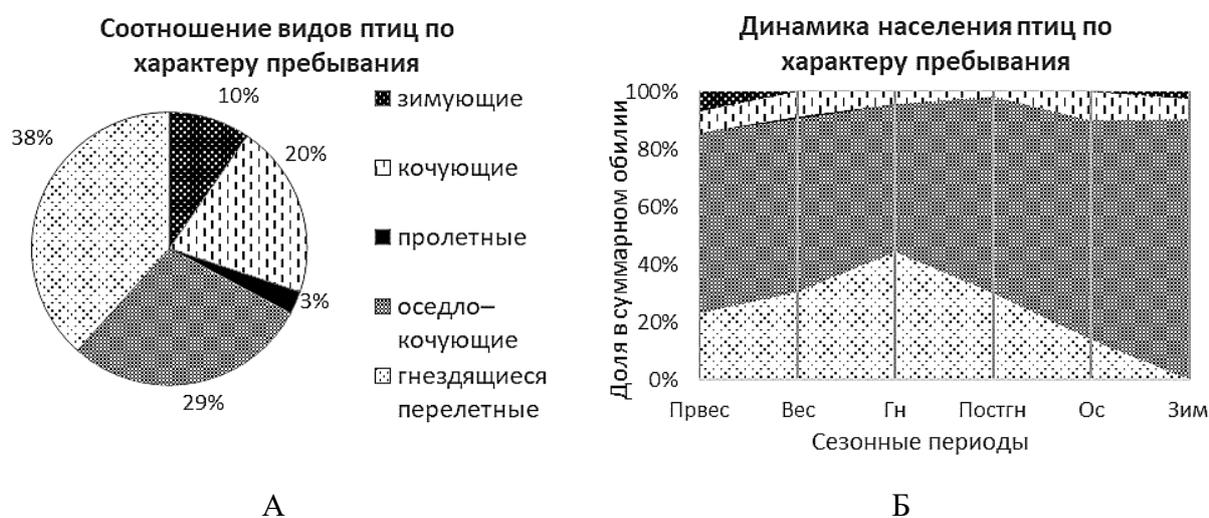


Рисунок 2 – Характер пребывания птиц в долине р. Ивы: А – соотношение групп по количеству видов; Б – динамика пребывания птиц (по доле в суммарном обилии). Сезонные периоды: Првес – предвесенний, Вес – весенний, ГН – гнездовой, Постгн – постгнездовой, Ос – осенний, Зим – зимний.

Вклад отдельных групп в суммарное обилие населения птиц носит выраженную сезонность (рис.2Б). Так в зимний период 90% всех особей относятся к группе оседло-кочующих, также присутствуют кочующие и зимующие особи. В начале весны начинается прилет отдельных видов, при этом по-прежнему сохраняется доля зимующих видов. В гнездовой период (1 половина лета) вклад гнездящихся перелетных принимает максимальные значения – 44 % от суммарного обилия. Небольшая доля (менее 1%) пролетных особей (обыкновенная каменка) присутствует во время весенних и осенних миграций.

В экологической структуре орнитофауны (рис. 3А) преобладают дендрофилы (42 вида), что согласуется с предыдущими исследованиями [2]. Большое количество видов этой группы связано с наличием участков естественной древесно-кустарниковой растительности, сохранившейся в пойме, а также искусственных плодово-ягодных насаждений, в пределах которых имеются подходящие гнездовые, кормовые и укрывные участки. Также велика доля кампофилов (10 видов), предпочитающих открытые пространства, и лимнофилов (9 видов).

Высокая доля дендрофильной группы в населении птиц (56–70% от суммарного обилия) сохраняется на протяжении всего года (рис 3Б). Доля лимнофилов и кампофилов достаточно

постоянна, тогда как обилие синантропных видов имеет сезонные различия: оно значительно повышается в зимний и предвесенний сезоны, когда особи этой группы используют долину в качестве кормовой станции и снижается в гнездовое и постгнездовое время.

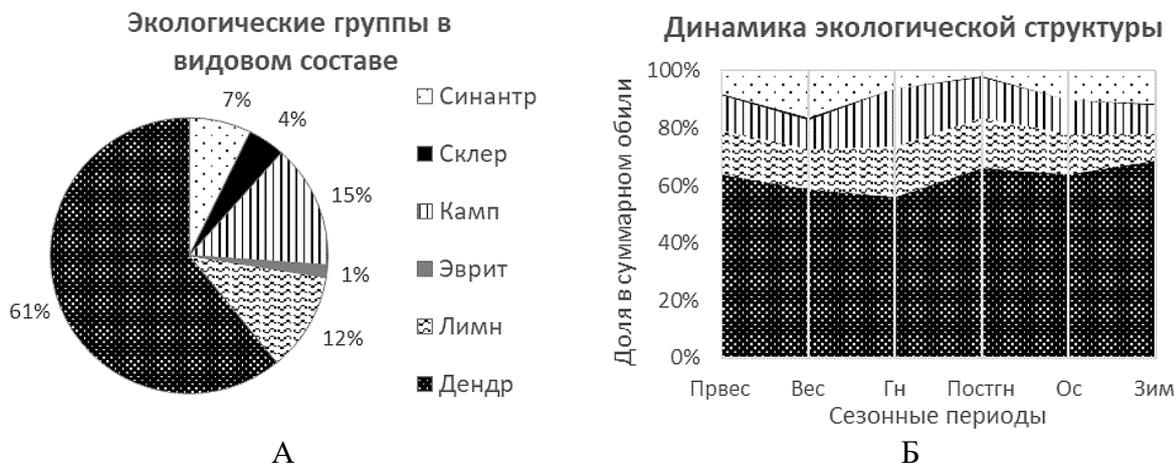


Рисунок 3 – Экологическая структура населения птиц: А – соотношение групп по количеству видов; Б – динамика экологических групп птиц (по доле в суммарном обилии): Дендр – дендрофилы, Лмн – лимнофилы, Эврит – эвритопы, Камп – кампофилы, Склер – склерофилы, Синантр – синантропы.

Состав и количество видов, вносящих наибольший вклад в плотность населения птиц, имеет как сезонные, так межгодовые различия. Наиболее часто в состав доминантов попадают 3 вида: рябинник, большая синица, в отдельные периоды – кряква. В гнездовой период к доминантам и субдоминантам относятся: рябинник, белобровик, большая синица, белая трясогузка и кряква.

Межгодовые различия проявляются при сравнении зимнего, предвесеннего и весеннего периодов, для которых показатели определены за 2 года. Так для 2021 – 2022гг характерно большее количество доминантных видов, по сравнению с 2020 – 2021гг, а также присутствие в зимний период многочисленных стай рябинника, тогда как в предыдущий год были отмечены только единичные зимующие особи этого вида.

Также внутригодовая изменчивость населения птиц выражается в флуктуациях видового состава и суммарного обилия особей (рис. 4А, Б). В среднем, динамика обилия (особ. /км²) носит характер, обратный динамике видового богатства: значительное повышение количества видов происходит в весенний, гнездовой и постгнездовой периоды, тогда как максимальная плотность наблюдается в негнездовое время.

Это связано с тем, что долины представляют собой благоприятные места для зимовки многих видов птиц благодаря сохранению кормовых (участки открытой воды, остатки сухой травянистой растительности, плодово-ягодные деревья и кустарники, искусственная подкормка) и укрывных условий (особенности рельефа, древесно-кустарниковая растительность).

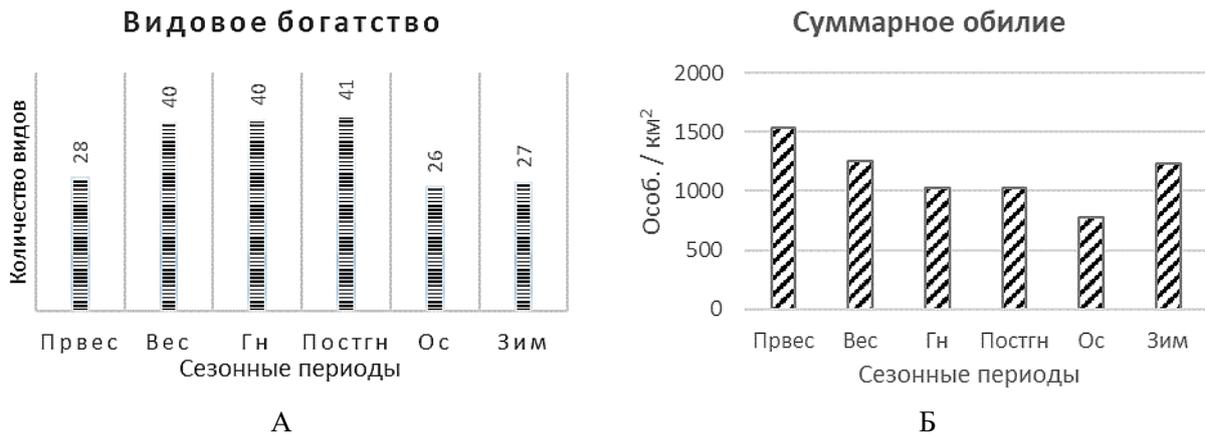


Рисунок 4 – динамика количественных параметров населения птиц: А – видового богатства; Б – суммарного обилия особей в пересчете на площадь.

Мера доминирования, выраженная индексом Симпсона (рис. 5А), принимает максимальные значения в зимний период в связи с присутствием небольшого количества многочисленных видов. Наибольший вклад при этом вносят синантропные виды (полевой воробей, серая ворона), зимующая популяция кряквы, а также лесные виды, в негнездовые сезоны формирующие стаи и совершают местные кочевки (большая синица, рябинник). Для остальных сезонных периодов этот показатель остается на невысоком уровне, его минимальное значение, связанное с более равномерным распределением обилия среди видов, наблюдается в первой половине лета, когда происходит распределение особей по гнездовым участкам.

Максимальное биологическое разнообразие, выраженное индексом Шеннона-Уивера (рис. 5Б), в долине р. Ивы характерно для весеннего и гнездового сезона. Это обусловлено наличием достаточного количества мест, пригодных для гнездования, и связано с повышением видового богатства, более равномерным распределением особей и снижением степени доминирования.

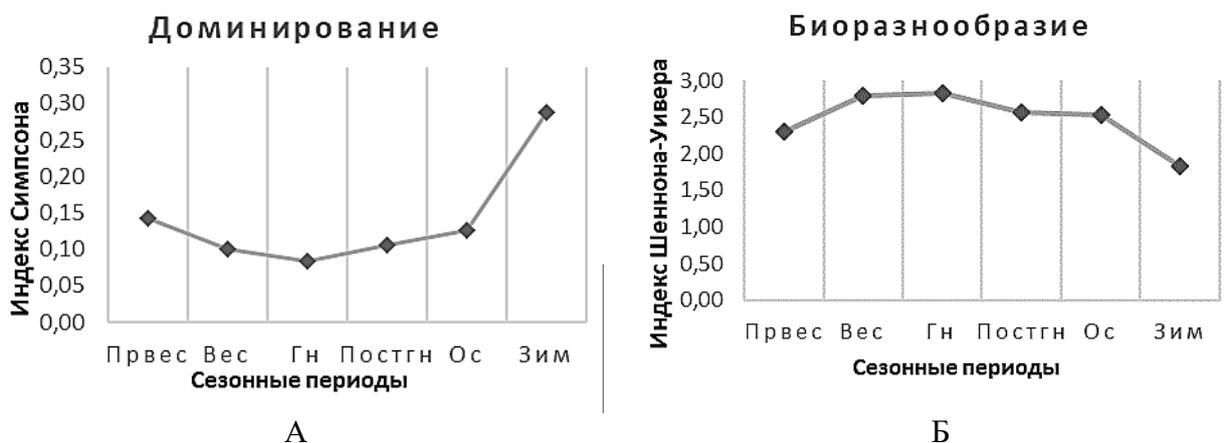


Рисунок 5 – Динамика индексов доминирования и биоразнообразия в долине р. Ивы: А – индекс доминирования Симпсона; Б – информационный индекс Шеннона-Уивера.

Выводы

1. Орнитофауна долины малой реки Ивы представлена 73 видами, относящихся к 27 семействам и 10 отрядам, что составляет 28% от общего разнообразия птиц г. Перми.
2. Наибольшую долю в видовом составе имеют гнездящиеся (перелетные и оседло-кочующие) виды. Характер пребывания птиц в долине носит выраженную сезонность, что выражается в неравномерном распределении обилия между группами птиц в течении года.
3. Население птиц долины имеет сложную экологическую структуру, что связано с близостью городских лесов, крупной реки Камы, а также – многообразием условий в пределах самой долины. Среди экологических групп, как по количеству видов, так и по вкладу в суммарное обилие, преобладают дендрофильные виды, что обусловлено сохранением в долине участков древесно-кустарниковой растительности.
4. Состав и количество доминантных видов имеет как сезонные, так и межгодовые различия. К доминантам и субдоминантам гнездового населения относятся: рябинник, белобровик, большая синица, белая трясогузка и кряква.
5. В гнездовой период, когда происходит стабилизация населения птиц, долина р. Ива обладает значительным видовым богатством и максимальным орнитологическим разнообразием, тогда как плотность населения и степень доминирования значительно понижаются в связи с распределением особей по гнездовым участкам.
6. В зимний период биоразнообразие снижается, однако долина, сохраняя кормовые и укрывные условия, служит местом концентрации городской орнитофауны. Это выражается в повышении суммарного обилия особей и доли доминантных видов в общем населении.

Библиографический список

1. Лобачев Ю. Ю. Эколого-фаунистическая структура сообществ птиц экосистем долин малых рек севера Нижнего Поволжья: специальность 03.02.08 "Экология": автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук. Саратов. –2004. –18 с.
2. Кулакова С.А., Зайцев А.А., Мишланова Ю.Л., Гатина Е.Л., Харин Р.В., Колодкин М.В. Бюллетень долины малой реки Ивы. Пермь, 2019. –12с.
3. Равкин Е.С., Челинцев Н.Г. Методические рекомендации по комплексному маршрутному учету птиц. М. –1990. –33 с.
4. Шепель А. И., Матвеева Г. К. Птицы города Перми. Пермь: Книжный мир. –2014. –344 с.
5. Сазонов С.В. Обновлённая классификация типов фауны и фаунистических групп птиц для запада евразийской тайги // Труды Карельского научного центра РАН. –2012. –Вып.1. –С. 70-85.
6. Кузякин А.П. Зоогеография СССР // Уч. зап. Моск. обл. пед. ин-та им. Н.К. Крупской. М.–1962. –Т. 109. –Вып. 1. –С. 3-182.
7. Городничев Р.М. Методы экологических исследований. Основы статистической обработки данных: учебно-методическое пособие. Якутск: Издательский дом СВФУ. –2019. – 94 с.
8. Коблик Е.А., Архипов В.Ю. Фауна птиц стран Северной Евразии в границах бывшего СССР: списки видов. М.: ООО Товарищество научных изданий КМК. –2014. –171 с.

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ ПО ФАУНЕ И БИОТОПИЧЕСКОМУ РАСПРЕДЕЛЕНИЮ ПАУКОВ ПРЕДУРАЛЬСКОЙ СТЕПИ

Власов С.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. Коллекция пауков, собранная на участке Предуральская степь Оренбургского государственного природного заповедника в мае 2022 года, содержит 62 вида из 12 семейств. Впервые для Приуралья указываются 3 вида пауков: *Haplodrassus alexeevi* Ponomarev & Shmatko, 2017, *Trichoncus villius* Tanasevitch & Piterkina, 2007 и *Walckenaeria corniculans* (O. Pickard-Cambridge, 1875).

Ключевые слова: пауки, фауна, Оренбургский заповедник, новые находки.

THE FIRST DATA ON THE FAUNA AND BIOTOPIC DISTRIBUTION OF SPIDERS FROM THE «PREDURALSKAYA STEPPE» CLUSTER IN THE ORENBURG STATE NATURE RESERVE

Vlasov S. V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The collection of spiders assembled at the «Preduralskaya steppe» cluster in the Orenburg State Nature Reserve in May 2022 contains 62 species from 12 families. Three species of spiders are indicated for the first time in the Cisurals: *Haplodrassus alexeevi* Ponomarev & Shmatko, 2017, *Trichoncus villius* Tanasevitch & Piterkina, 2007 и *Walckenaeria corniculans* (O. Pickard-Cambridge, 1875).

Keywords: spider, fauna, Orenburg State Nature Reserve, new records.

Последние несколько лет сотрудниками кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии ведутся работы по инвентаризации фауны пауков Оренбургского заповедника. На данный момент опубликованы некоторые интересные результаты [1,2,3,4,5,6,7,8,9]. Данная публикация содержит первые сведения по паукам участка Предуральская степь Оренбургского заповедника.

Небольшой по объему материал был собран в филиале заповедника – Предуральская степь, в первой декаде мая 2022 г. При сборе материала использовались стандартные методы почвенных ловушек, укусов по травостой и кустарникам и ручной сбор. Материал хранится в коллекции кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии Пермского государственного национального исследовательского университета.

Всего на данный момент на территории филиала выявлено 62 вида, аннотированный список которых приведен ниже. Видовую принадлежность таксонов из родов *Agelena*, *Larinioides*, *Oxyopes*, *Philodromus*, *Chalcoscirtus*, *Heliophanus*, *Attulus*, *Heriaeus*, *Synema*

определить не удалось, т.к. они представлены неполовозрелыми особями. Три вида из семейств Dictynidae и Linyphiidae потенциально могут являться новыми для науки.

Преобладали пауки сем. Gnaphosidae (14 видов, 23% локальной фауны), Lycosidae (13 видов, 21%), Linyphiidae (10 видов, 16%). Остальные семейства насчитывали от 1 до 5 видов.

Araneidae

Aculepeira ceropegia (Walckenaer, 1802): 1 ♀, разнотравная степь, укусы.

Agalenatea redii (Scopoli, 1763): 1 ♀, степь кустарниковая, укусы.

Gibbaranea bituberculata (Walckenaer, 1802): 1 ♀, ковыльно-типчаковая степь, укусы; 1 ♀, разнотравный луг, укусы; 1 ♂, каменистая степь, укусы.

Hypsosinga sanguinea (C. L. Koch, 1844): 1 ♂, каменистая степь, укусы.

Singa nitidula C. L. Koch, 1844: 1 ♂, разнотравный луг, укусы; 5 ♀, 1 ♂, степь кустарниковая, укусы.

Cheiracanthidae

Cheiracanthium virescens (Sundevall, 1833): 1 ♂, разнотравная степь, укусы.

Dictynidae

Archaeodictyna minutissima (Miller, 1958): 1 ♂, солончак темный, почвенные ловушки.

Lathys stigmatisata (Menge, 1869): 9 ♂, различные степи, почвенные ловушки; 1 ♂, осиновый колок, почвенные ловушки; 1 ♂, антропогенная степь, ручной сбор.

Gnaphosidae

Berlandina cinerea (Menge, 1872): 21 неполовозрелая особь, различные степи, почвенные ловушки.

Drassodes lapidosus (Walckenaer, 1802): 1 ♂, полынная степь, почвенные ловушки; 1 ♂, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 3 ♂, солончак темный, почвенные ловушки, 2 ♂, разнотравная степь, почвенные ловушки.

Drassodes rostratus Esyunin & Tuneva, 2002: 2 ♂, собственно солончак, почвенные ловушки.

Gnaphosa leporina (L. Koch, 1866): 3 ♀, осиновый колок, почвенные ловушки.

Gnaphosa lugubris (C. L. Koch, 1839): 1 ♀, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки.

Gnaphosa opaca Herman, 1879: 1 ♂, собственно солончак, почвенные ловушки; 1 ♂, участок степи с зоогенной эрозией, почвенные ловушки.

Gnaphosa saurica Ovtsharenko, Platnick & Song, 1992: 2 ♂, солончак темный, почвенные ловушки.

Haplodrassus alexeevi Ponomarev & Shmatko, 2017: 1 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки, 1 ♂, участок степи с зоогенной эрозией. Вид новый для Урала.

Haplodrassus kulczynskii Lohmander, 1942: 1 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки; 3 ♂, 1 ♀, различные степи, почвенные ловушки; 1 ♂, степь кустарниковая, укусы.

Haplodrassus signifer (C. L. Koch, 1839): 2 ♂, собственно солончак, почвенные ловушки; 1 ♂, 1 ♀, каменистая степь, почвенные ловушки.

Micaria rossica Thorell, 1875: 1 ♂, собственно солончак, почвенные ловушки.

Zelotes electus (C. L. Koch, 1839): 8 ♂, различные степи, почвенные ловушки; 1 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки; 1 ♂, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 2 ♂, осиновый колок, почвенные ловушки.

Zelotes longipes (L. Koch, 1866): 3 ♀, разнотравный луг, почвенные ловушки; 5 ♀, различные степи, почвенные ловушки; 1 ♀, солончак темный, почвенные ловушки.

Zelotes orenburgensis Tuneva et Esyunin, 2003: 1 ♀, собственно солончак, почвенные ловушки; 1 ♀, полынная степь, почвенные ловушки; 1 ♀, антропогенная степь, ручной сбор.

Linyphiidae

Agyneta (?) *affinis* (Kulczyński, 1898): 2 ♀, участок степи с зоогенной эрозией; 1 ♀, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 1 ♀, типчаковая песчаная степь, почвенные ловушки; 1 ♀, ковыльно-типчаковая степь, укусы; 1 ♀, степь кустарниковая, укусы. Достоверная идентификация видов из этого рода возможна только при наличии самцов.

Agyneta saaristoi Tanasevitch, 2000: 1 ♂, каменистая степь, укусы.

Ceratinella brevis (Wider, 1834): 1 ♂, типчаковая песчаная степь, почвенные ловушки.

Silometopus crassipedis Tanasevitch & Piterkina, 2007: 1 ♂, 1 ♀, полынная степь, почвенные ловушки; 1 ♂, типчаковая песчаная степь, почвенные ловушки.

Styloctetor compar (Westring, 1861): 1 ♂, типчаковая песчаная степь, почвенные ловушки.

Thyreosthenius parasiticus (Westring, 1851): 1 ♀, ковыльно-типчаковая степь, укусы.

Tibiaster djanybekensis Tanasevitch, 1987: 2 ♂, 4 ♀, собственно солончак, почвенные ловушки; 2 ♀, участок степи с зоогенной эрозией, почвенные ловушки.

Trichoncus villius Tanasevitch & Piterkina, 2007: 1 ♂, ковыльно-типчаковая степь, почвенные ловушки; 1 ♂, солончак темный, почвенные ловушки. Вид новый для Урала.

Trichopterna cito (O. Pickard-Cambridge, 1873): 3 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 1 ♀, осиновый колок, почвенные ловушки.

Walckenaeria corniculans (O. Pickard-Cambridge, 1875): 1 ♂, антропогенная степь, ручной сбор. Вид новый для Урала.

Liocranidae

Agroeca maculata L. Koch, 1878: 1 ♀, ковыльно-типчаковая степь, почвенные ловушки.

Lycosidae

Alopecosa cursor (Hahn, 1831): 103 ♂, 7 ♀, различные степи, почвенные ловушки; 2 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки; 3 ♂, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 1 ♂, осиновый колок, почвенные ловушки; 1 ♀, солончак темный, почвенные ловушки; 1 ♀ антропогенная степь, ручной сбор.

Alopecosa kasakhstanica Savelyeva, 1972: 1 ♀, участок степи с зоогенной эрозией, почвенные ловушки.

Alopecosa pulverulenta (Clerck, 1758): 3 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 32 ♂, берег пруда, почвенные ловушки; 17 ♂, 5 ♀, разнотравный луг, почвенные ловушки; 16 ♂, 6 ♀, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 8 ♂, осиновый колок, почвенные ловушки.

Alopecosa schmidti (Hahn, 1835): 12 ♂, 2 ♀, различные степи, почвенные ловушки; 1 ♂, солончак темный, почвенные ловушки.

Arctosa leopardus (Sundevall, 1833): 1 ♀ антропогенная степь, ручной сбор.

Arctosa stigmosa (Thorell, 1875): 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки.

Evippa eltonica Dunin, 1994: 2 ♂, 7 неполовозрелых особей, собственно солончак, почвенные ловушки; 2 неполовозрелые особи, солончак темный, почвенные ловушки.

Pardosa lugubris (Walckenaer, 1802): 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки.

Pardosa paludicola (Clerck, 1757): 3 ♀, антропогенная степь, ручной сбор.

Pirata tenuitarsis Simon, 1876: 2 ♀, берег пруда, почвенные ловушки.

Trochosa robusta (Simon, 1876): 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки; 1 ♂, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки.

Trochosa ruricola (DeGeer, 1778): 1 ♂, 6 ♀, берег пруда, почвенные ловушки.

Trochosa terricola Thorell, 1856: 1 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 7 ♂, 1 ♀, берег пруда, почвенные ловушки; 3 ♂, 1 ♀, разнотравный луг, почвенные ловушки; 5 ♂, 2 ♀, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 4 ♂, 2 ♀, осиновый колос, почвенные ловушки.

Miturgidae

Zora pardalis Simon, 1878: 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки; 1 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки.

Philodromidae

Rhysodromus histrio (Latreille, 1819): 1 ♂, 1 ♀, разнотравный луг, почвенные ловушки, укусы; 3 ♀, различные степи, укусы.

Thanatus arenarius L. Koch, 1872: 2 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 1 ♂, берег пруда, почвенные ловушки.

Thanatus pictus L. Koch, 1881: 1 ♂, 1 ♀, собственно солончак, почвенные ловушки.

Tibellus oblongus (Walckenaer, 1802): 1 ♀, берег пруда, почвенные ловушки.

Salticidae

Aelurillus m-nigrum Kulczyński, 1891: 1 ♀, собственно солончак, почвенные ловушки.

Aelurillus v-insignitus (Clerck, 1758): 1 ♂, собственно солончак, почвенные ловушки; 2 ♂, участок степи с зоогенной эрозией, почвенные ловушки; 6 ♂, различные степи, почвенные ловушки.

Euophrys uralensis Logunov, Cutler & Marusik, 1993: 1 ♂, разнотравная степь, почвенные ловушки.

Evarcha michailovi Logunov, 1992: 1 ♂, разнотравная степь, укусы; 1 ♀, каменистая степь, укусы.

Pellenes epularis (O. Pickard-Cambridge, 1872): 1 ♂, полынная степь, почвенные ловушки; 1 ♂, каменистая степь, почвенные ловушки.

Theridiidae

Euryopis spp.: 18 неполовозрелых особей, различные степи, укусы; 1 неполовозрелая особь, разнотравный луг, укусы. Подобную окраску тела в Приуральской фауне имеет вид *E. saukea* Levi, 1951, к которому, по-видимому, и относятся наши экземпляры.

Steatoda albomaculata (DeGeer, 1778): 1 ♂, миндаль в степи, почвенные ловушки.

Theridion cinereum Thorell, 1875: 1 ♂, участок степи с зоогенной эрозией, почвенные ловушки.

Thomisidae

Ozyptila scabricula (Westring, 1851): 5 ♂, степь кустарниковая, почвенные ловушки; 2 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки; 3 ♂, разнотравно-злаковый луг на дне балки, почвенные ловушки; 2 ♂, осиновый колок, почвенные ловушки.

Thomisus onustus Walckenaer, 1805: 2 ♀, 14 неполовозрелых особей, различные степи, укусы; 2 неполовозрелых особи, разнотравный луг, укусы.

Xysticus cristatus (Clerck, 1757): 4 ♂, разнотравный луг, почвенные ловушки; 6 ♂, 3 ♀, различные степи, почвенные ловушки, укусы.

Количество видов, отловленных в конкретных биотопах, невелико. Наибольшим видовым богатством характеризуется разнотравный луг, где отмечен 21 вид. Самое низкое видовое богатство отмечено на участке степи с зоогенной эрозией – 7 видов.

Доминантный комплекс изученных группировок герпетобионтных пауков весной включал шесть видов. В степных биотопах многочисленны *Alopecosa cursor*, *Alopecosa schmidtii*, неполовозрелые *Berlandina cinerea* и представители рода *Gnaphosa*. В луговых и лесных биоценозах обильны *Alopecosa pulverulenta* и представители рода *Trochosa*. В травостое степных и луговых растительных сообществ преобладали неполовозрелые *Thomisus onustus*, *Euryopis* spp. и *Aculepeira* spp.

Не смотря на скудость материала в нем присутствует ряд интересных видов. Во-первых, в фауне имеется как минимум один не известный науке вид, нуждающийся в описании. Во-вторых, в фауне участка обнаружены 3 новых для Приуралья вида – *Haplodrassus alexeevi*, *Trichoncus villius* и *Walckenaeria corniculans*. В-третьих, *Drassodes rostratus* [2,6], *Evipa eltonica* [6], *Zelotes orenburgensis* [2, 8] ранее в Оренбургской области были обнаружены только в подзоне южных степей. Находки в филиале наиболее северные находки этих видов в степном Приуралье.

Пользуясь случаем, автор выражает признательность С.Л. Есюнину (Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь) за проверку правильности определения некоторых видов.

Библиографический список

1. Есюнин С.Л., Власов С.В. Замечания к фауне и биотопическому распределению пауков Таловской степи // Степи Северной Евразии: материалы IX международного симпозиума. Оренбург, 2021. С. 300-305.
2. Есюнин С.Л., Тунева Т.К., Соколова С.С. 2019. Фауна и биотопическое распределение пауков сем. Gnaphosidae (Aranei) участка «Ащисайская степь» / Fauna and biotopical distribution of the gnaphosid spiders (Aranei) in Aschisayskaya Steppe // Труды ФГБУ «Заповедники Оренбуржья». Вып. II. Заповедники Оренбуржья в природоохранном каркасе России. Саратов: 000 «Амирит». С.143-149
3. Azarkina G.N., Esyunin S.L., Kuz'min E.A., Marusik Yu.M. On the synonymy of two wolf spider species of the genus *Alopecosa* (Araneae, Lycosidae) from the steppe zone of Russia // Zootaxa. 2016. Vol. 4205, No.4. P. 339-348.
4. Esyunin S.L., Ponomarev A.V. Taxonomic remarks on the genus *Bogdocosa* Ponomarev et Belosludtsev, 2008 (Aranei: Lycosidae) // Arthropoda Selecta. 2018. Vol. 27, No. 1. P. 61–68.

5. Esyunin S.L., Sozontov A.N. On a new Eurasian species of *Dictyna* Sundevall 1833 (Aranei, Dictynidae) with taxonomic notes on poorly known Palaearctic *Dictyna* species // *Arthropoda Selecta*. 2016. Vol. 25, No. 2. P. 199-206.
6. Esyunin S.L., Tuneva T.K., Farzalieva G. Sh. 2007. Remarks on the Ural spider fauna (Arachnida, Aranei), 12. Spiders of the steppe zone of Orenburg Region // *Arthropoda Selecta*. Vol.16, No.1. P.43-63
7. Esyunin S.L., Vlasov S.V., Ponomarev A.V. Taxonomic remarks on the genus *Caspicosa* Ponomarev, 2007 (Aranei: Lycosidae) // *Arthropoda Selecta*. Русский артроподологический журнал. – 2020. – Т. 29. № 2. – С. 273-282.
8. Tuneva T.K., Esyunin S.L., 2003. A review of the family Gnaphosidae on the fauna of the Urals (Aranei), 3. New species and new records, chiefly from the South Urals // *Arthropoda Selecta*. (2002). Vol.11, No.3. P.223-234
9. Vlasov S.V. The first data on spiders from the «Burtinskaya steppe» Kordon in the Orenburg Reserve // Материалы IV Международного арахнологического совещания «AracnoMeeting», посвященного 50-летию «Определителя пауков Европейской части СССР» В.П. Тыщенко. Екатеринбург, 2021. С. 49.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ТИПИЧНЫХ БИОТОПОВ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РЕПТИЛИЙ В КАМСКОМ ПРЕДУРАЛЬЕ

Галиулин Д.М.¹, Печенкина К.О.¹, Четанов Н.А.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия

Аннотация. В работе описаны типичные местообитания некоторых представителей герпетофауны в Камском Предуралье, в которых на протяжении многих лет фиксируются находки пресмыкающихся. Приведены результаты геоботанических исследований, данные о синтопии. Выдвинуто предположение об отсутствии прямой связи между распространением пресмыкающихся и характером растительности в местах их обитания.

Ключевые слова: биотопы, герпетофауна, Камское Предуралье.

BRIEF DESCRIPTION OF SOME TYPICAL BIOTOPES OCCUPIED BY THE COMMON VIPER (*VIPERA BERUS* LINNAEUS, 1758) IN THE KAMSKOE PREDURAL'E

Galiulin D. M.¹, Pechenkina K. O.¹, Chetanov N. A.^{1,2}

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

² State Budget Educational Institution of Higher Education «Perm State Humanitarian Pedagogical University» Perm, Russia

Abstract: The article provides geobotanical descriptions of two typical habitats of the common European viper in the Kamskoe Predural'e and information on syntopy. Studied species have been noted in these habitats for many years. It is concluded that the diversity of the flora should not be considered as a key factor in choosing a habitat for the common viper.

Keywords: biotopes, common European viper, *Vipera berus*, Kamskoe Predural'e.

Традиционно на территории Камского Предуралья отмечается шесть видов пресмыкающихся: колхидская веретеница *Anguis colchica* (Nordmann, 1840), прыткая ящерица *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758, живородящая ящерица *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823), обыкновенный уж *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758), обыкновенная медянка *Coronella austriaca* Laurenti, 1768 и обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Linnaeus, 1758) [7, 8, 11]. Стоит отметить, что ранее для территории региона указывалась не колхидская, а ломкая веретеница *Anguis fragilis* (Linnaeus, 1758), однако последние исследования в данной области [12] указывают на ошибочность таких утверждений.

Несмотря на то, что герпетофауна Камского Предуралья изучается довольно давно [2], многие работы по данной теме не только оперируют устаревшими данными, но и концентрируют своё внимание, в основном, на морфо-анатомических описаниях или

термобиологических исследованиях [5, 9, 10]. Вплоть до недавнего времени, практически не встречалось публикаций по биотопической приуроченности отдельных видов или биогеоценотическим описаниям мест обитания рептилий не только касательно Камского Предуралья, но и в целом [5].

Так, даже атласы-определители, говоря о распространении тех или иных представителей герпетофауны, ограничиваются лишь перечислением регионов, в которых описанные виды обитают, иногда, правда, указывая на наиболее типичный характер рельефа [1, 6]. Однако, проблема приуроченности конкретного вида к тому или иному биоценозу обычно опускается, что наталкивает нас на закономерный вопрос: «Существует ли взаимосвязь распространения отдельных видов, пресмыкающихся с разнообразием флоры в пределах их ареала?»

Для ответа на данный вопрос, мы постарались описать типичные биотопы некоторых видов рептилий Камского Предуралья.

Исследование проводилось в окрестностях посёлка Ергач, Кунгурского района, Пермского края в конце мая – начале июня 2022 года.

На данной территории достоверно, на протяжении многих лет, фиксируются находки четырёх видов рептилий: прыткая ящерица *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758, живородящая ящерица *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823), обыкновенный уж *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758) и обыкновенная гадюка *Vipera berus* (Linnaeus, 1758). Все перечисленные виды представлены устойчивыми, многочисленными группами, обитающими на весьма ограниченной территории, зачастую синтопически.

Геоботанические описания проводились по стандартной методике [4]. В местах, где наиболее часто происходили встречи с рептилиями закладывалась площадка 10×10 м, на которой описывались состав, диапазон высот, численность и происхождение древостоя, возобновленного древостоя – подроста и подлеска. Отдельно, внутри основной площадки, закладывались учётные площадки площадью 1 м², для которых фиксировались флористический состав и проективное покрытие травяно-кустарничкового яруса по шкале Браун-Бланке.

В качестве первого биотопа мы выбрали сосняк на склоне юго-западной экспозиции со всхолмленным микрорельефом, выходами известняка и гипса, которые, предположительно, используются рептилиями в качестве зимовального убежища (57.496232° с.ш., 56.726454° в.д., 134 м над ур. м.). Здесь регулярно отмечаются находки обыкновенного ужа, а в весенний период массово встречаются его клубки.

Лесная подстилка мощностью 1,5 см представлена хвоей и листьями.

Древостой включает лишь *Pinus sylvestris* L. (17 стволов, средняя высота 17 м, диаметр 8-21 см).

Возобновляемый древостой – подрост, сложен из *Betula pendula* Roth (31 шт., высота 0,2-5 м), *Pinus sylvestris* L. (8 шт., высота 5-12 м), *Acer negundo* L. (1 шт., высота 2 м), *Ulmus laevis* Pall. (1 шт., высота 1,5 м) – семенного и *Populus tremula* L. (3 шт., высота 0,4-6 м) и *Salix sp.* (6 шт., высота 1,2-6 м) вегетативного происхождения.

Подлесок состоит из *Padus avium* Mill. (1 шт., высота 5 м), *Chamaecytisus ruthenicus* (Fisch. ex Woloszcz.) Kláskova (9 шт., высота 0,5 м) и *Juniperus communis* L. (2 шт., высота 1 м).

Флористический состав травяного яруса представлен характерным лесостепным разнотравьем с преобладанием *Astragalus danicus* Retz., *Hieracium sp.*, *Plantago lanceolata* L., *Pimpinella saxifraga* L., *Gallium mollugo* L., *Viola collina* Bess. Реже встречаются *Trifolium arvense* L., *Trifolium pratense* L., *Vicia sylvatica* L., *Fragaria vesca* L., *Origanum vulgare* L. Единичны находки *Ranunculus sp.*, *Potentilla argentea* L., *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv,

Taraxacum officinale F.H. Wigg., *Echinops ruthenicus* M. Bieb, *Galega orientalis* Lam., *Achillea millefolium* L., *Centaurea scabiosa* L., *Lathyrus vernus* (L.) Bernh., *Dactylis glomerata* L., *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort., *Polygala comosa* Schkuhr и *Lathyrus pisiformis* L. Большинство растений представлено в вегетативной фазе.

Общее проективное покрытие составило приблизительно 68%.

Второй биотоп – небольшой березняк на склоне южной экспозиции со всхолмленным микрорельефом, выходами известняка и гипса (57.495719° с.ш., 56.727520° в.д., 135 м над ур. м.). На данном участке периодически встречаются обыкновенная гадюка, обыкновенный уж, живородящая ящерица.

Лесная подстилка мощностью 0,5 см представлена листьями.

Древостой включает лишь *Betula pendula* Roth (3 ствола, средняя высота 10 м, диаметр 11-18 см).

Возобновляемый древостой – подрост, сложен из *Betula pendula* Roth (27 шт., высота 0,15-0,7 м), и *Pinus sylvestris* L. (4 шт., высота 0,4-3 м) – семенного происхождения.

Подлесок состоит из *Padus avium* Mill. (1 шт., высота 5 м), *Rosa acicularis* Lindl. (3 шт., высота 0,5 м), *Juniperus communis* L. (23 шт., высота 0,4 м) и *Salix* sp. (1 шт., высота 6 м).

Флористический состав травяного яруса представлен разнотравьем с преобладанием *Gallium mollugo* L., *Pimpinella saxifraga* L., *Viola collina* Bess., *Dactylis glomerata* L. и *Fragaria vesca* L. Реже встречаются *Achillea millefolium* L., *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort., *Potentilla anserina* L., *Scutellaria galericulata* L., *Aster alpinus* L., *Veronica chamaedrys* L., *Plantago lanceolata* L., *Trifolium pratense* L. Единичны находки *Astragalus danicus* Retz., *Potentilla* sp., *Viola collina* Bess., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser, *Ranunculus polyanthemos* L., *Polygala comosa* Schkuhr, *Origanum vulgare* L., *Pastinaca sylvestris* Mill., *Centaurea scabiosa* L., *Potentilla argentea* L., *Lathyrus pratensis* L. Большинство растений представлено в вегетативной фазе.

Общее проективное покрытие составило приблизительно 75%.

Третий биотоп – щучково-разнотравный луг на склоне восточной экспозиции, микрорельеф характеризуется отдельными возвышениями (57.497187° с.ш., 56.733344° в.д., 133 м над ур. м.). В этом месте регулярно встречаются особи прыткой ящерицы и обыкновенной гадюки.

На площадке отмечено несколько проростков *Pinus sylvestris* L. Травяной ярус сложен характерными луговыми растениями с сильным преобладанием *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv. Также в флористическом составе широко представлены *Gallium mollugo* L. и *Fragaria vesca* L.. Реже, но в значительном объёме, встречаются *Veronica chamaedrys* L., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser, *Pimpinella saxifraga* L., *Trifolium pratense* L. и *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort. Малочисленны находки *Artemisia absinthium* L., *Scutellaria galericulata* L., *Origanum vulgare* L., *Stipa pennata* L., *Achillea millefolium* L., *Myosotis arvensis* (L.) Hill. Единично встречаются *Hypericum perforatum* L., *Centaurea scabiosa* L., *Vicia sylvatica* L., *Vicia sepium* L., *Ranunculus polyanthemos* L., *Solidago virgaurea* L., *Senecio vulgaris* L. и *Luzula pilosa* (L.) Willd. Большинство растений представлено в вегетативной фазе.

Общее проективное покрытие составило приблизительно 80%.

Стоит отметить, что некоторые растения встречаются во всех описанных биотопах: *Pinus sylvestris* L., *Achillea millefolium* L., *Centaurea scabiosa* L., *Deschampsia caespitosa* (L.) Beauv, *Gallium mollugo* L., *Lappula squarrosa* (Retz.) Dumort., *Origanum vulgare* L., *Pimpinella saxifraga* L., *Plantago lanceolata* L., *Potentilla argentea* L., *Scutellaria galericulata* L., и *Trifolium pratense* L.

Однако говорить о приуроченности герпетофауны к определённому флористическому составу достаточно спорно, так как рептилии не связаны с растительным покровом трофическими связями. К тому же, описано всего три биотопа и населены они разными видами пресмыкающихся, что не даёт нам оснований рассуждать о намеренном выборе рептилиями того или иного места обитания в зависимости от характера растительности.

Тем не менее, можно предположить, что распространение пресмыкающихся связано с наличием кормовой базы: насекомых, земноводных, небольших млекопитающих, питание которых, в свою очередь напрямую зависит от характера растительности. Ещё одним фактором, влияющим на выбор места обитания, может являться наличие укрытий или удобных мест для прогрева эктотермных животных и, следовательно, определённого микрорельефа – всхолмленного, с отдельными возвышениями или выходами осадочных пород, с неполным проективное покрытие и открытыми участками грунта.

Библиографический список

1. Ананьева Н.Б., Орлов Н.Л., Халиков Р.Г., Даревский И.С., Рябов С.А., Барабанов А.В. Атлас пресмыкающихся Северной Евразии (таксономическое разнообразие, географическое распространение и природоохранный статус). – СПб., 2004. – 232 с.
2. Бакиев А.Г., Четанов Н.А. Об истории изучения герпетофауны Пермского края // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2011. – №2. – с. 31-43.
3. Белоусова Н.В., Галиулин Д.М., Четанов Н.А. Краткая характеристика некоторых типичных биотопов, занимаемых прыткой ящерицей *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 в Камском Предуралье// Вестник Пермского государственного гуманитарно-педагогического университета: Сер. № 2. Физико-математические и естественные науки. – 2020. – Вып. №1. – С. 4-8.
4. Борисова М.А., Богачев В.В. Геоботаника: учеб. пособие. – Ярославль: ЯрГУ, 2009. – 160 с.
5. Галиулин Д.М. Влияние уровня освещённости на поведение у рептилий Камского Предуралья при температурном воздействии // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2019. – № 2 (26). – с. 198-203.
6. Дунаев Е.А., Орлова В.Ф. Змеи. Виды фауны России. Атлас-определитель. – М.: Фитон XXI, 2014. – 120 с.
7. Животные Прикамья: Кн. 2. Позвоночные / ред. А.И. Шепель. – Пермь: Книжный мир, 2001. – 166 с.
8. Литвинов Н.А. Пресмыкающиеся, или рептилии // Животный мир Прикамья. – Пермь: Пермское кн. изд-во, 1989. – С. 34-36.
9. Литвинов Н.А., Ганцук С.В. Микроклиматические условия обитания ломкой веретеницы (*Anguis fragilis*, Reptilia, Saugia) в Камском Предуралье // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2009. – Т. 18, № 1. – С. 86–90.
10. Четанов Н.А., Литвинов Н.А., Ганцук С.В., Галиулин Д.М. Изучение терморегуляционного поведения рептилий при подкожной имплантации терморегистраторов // Вестник Пермского университета. Серия Биология – 2022. – Вып. №2. – с. 119–124.
11. Юшков Р.А., Воронов Г.А. Амфибии и рептилии Пермской области: Предварительный кадастр. – Пермь: Изд-во Пермского ун-та, 1994. – 158 с.

12. Jablonski, D., N. Sillero, O. Oskyrko, A. Bellati, A. Čeirāns, M. Cheylan, D. Cogălniceanu, J. Crnobrnja-Isailović, P.-A. Crochet, A. Crottini, I. Doronin, G. Džukić, P. Geniez, Ç. Ilgaz, R. Iosif, D. Jandzik, D. Jelić, S. Litvinchuk, K. Ljubisavljević, P. Lymberakis, P. Mikulíček, E. Mizsei, J. Moravec, B. Najbar, M. Pabijan, M. Pupins, P. Sourrouille, I. Strachinis, M. Szabolcs, E. Thanou, E. Tzoras, V. Vergilov, J. Vörös & V. Gvoždík. The distribution and biogeography of slow worms (*Anguis*, Squamata) across the Western Palearctic, with an emphasis on secondary contact zones // *Amphibia-Reptilia*. – 2021. – Vol. 42. – P. 519–530. – doi:10.1163/15685381-bja10069

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В УНБ «ПРЕДУРАЛЬЕ»

Ефимик В.Е.¹, Соловьева Е.Е.¹, Славнова Е.А.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае, Пермь, Россия

Аннотация. Проведена оценка степени зараженности иксодовых клещей на территории учебно-научной базы «Предуралье» ПГНИУ, расположенной в Кисерстком районе Пермского края. Представлены результаты ПЦР-анализов, клещей на определение возбудителей пяти трансмиссивных заболеваний: вирусного клещевого энцефалита, инфекционного клещевого боррелиоза, моноцитарного эрлихиоза человека, гранулоцитарного анаплазмоза человека и лихорадки Западного Нила. Дана сравнительная оценка уровня зараженности иксодовых клещей с данными по всему Пермскому краю.

Ключевые слова: иксодовые клещи, инфекционные заболевания, передающиеся клещами, Пермский край, ПЦР-анализ.

ASSESSMENT OF THE DEGREE OF INFECTION OF IXODIC TICKS IN THE EDUCATIONAL AND SCIENTIFIC BASE «PREDURALIE»

Efimik V.E.¹, Solovieva E.E.¹, Slavnova E.A.²

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

² Center of Hygiene and Epidemiology in Perm Krai, Perm, Russia

Abstract. The assessment of the degree of infection of ixodic ticks on the territory of the educational and scientific base "Preduralie" of the Perm University, located in the Kisherstky district of the Perm Krai, was carried out. The results of PCR – analyses of ticks to determine the causative agents of five vector-borne diseases are presented: viral tick-borne encephalitis, infectious tick-borne borreliosis, human monocytic ehrlichiosis, human granulocytic anaplasmosis and West Nile fever. A comparative assessment of the level of infection of ixodic ticks with data for the entire Perm Region is given.

Keywords: ixodic ticks, infectious diseases transmitted by ticks, Perm Krai, PCR analysis.

Пермский край отличается высоким уровнем инфекционных заболеваний, передающихся клещами [1, 2]. Ежегодно в медицинские учреждения края обращается несколько тысяч людей с укусами клещей. Счет зараженных клещей идет на сотни и даже тысячи (таблица 1).

Клещи семейства *Ixodidae* являются переносчиками многих микроорганизмов. В настоящее время на территории Пермского края известны очаги трансмиссивных природно-очаговых инфекций таких заболеваний человека, как клещевой энцефалит, иксодовый

клещевой боррелиоз, моноцитарный эрлихиоз и гранулоцитарный анаплазмоз [1]. Инфицированность клещей боррелиями в природных очагах может составлять от 10 до 70% и более, вирусом клещевого энцефалита составляет от 0,1 до 12%. В разных очагах клещи от 5-10 до 25-50% инфицированы одновременно вирусами клещевого энцефалита и боррелиями, инфицированность вирусами гранулоцитарного анаплазмоза и моноцитарного эрлихиоза достигает 5-15% [3].

Учебно-научная база (далее УНБ) «Предуралье» ПГНИУ, расположенная в Кишерстком районе Пермского края, ежегодно является местом для проведения полевых учебных и производственных практик для студентов геологического, географического и биологического факультетов, а также для научных исследований в различных областях. В растительном покрове данной территории наблюдается сочетание бореально-таежных, неморальных элементов широколиственных лесов, степных, лугово-степных, горностепных, водных и прибрежно-водных комплексов [4]. Район исследования относится к природным очагам вирусных и бактериальных инфекций, переносимых иксодовыми клещами. Несмотря на это, научных исследований на степень зараженности иксодовых клещей бактериальными и вирусными инфекциями здесь никогда не проводилось.

Таблица 1 – Уровень зараженности иксодовых клещей, исследованных методом ПЦР по данным Роспотребнадзора по Пермскому краю за 2021 год

Клещевые инфекции	Вирусный клещевой энцефалит (КЭ)	Инфекционный клещевой боррелиоз (ИКБ)	Моноцитарный эрлихиоз человека (МЭЧ)	Гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ)
Исследовано клещей	7928	7884	7333	7333
Из них с положительным результатом	104	3315	262	148
Процент зараженности	1,3	42,0	3,6	2,0

Сбор клещей на территории УНБ «Предуралье» осуществлялся в мае 2021 г. на маршрутах, которые проходили в типичных для данной местности типах растительных сообществ: в смешанном, широколиственном, темнохвойном лесах и на лугах (таблица 2).

При сборе иксодовых клещей мы использовали «флаг» – стандартный способ, применяемый для учета клещей с пастбищным типом питания [5, 6, 7]. Орудие сбора велось по траве параллельно ходу и осматривалось через каждые 20 метров. Собирались клещи в пробирки с дифференцированной влажностью, при этом, самцы и самки помещались в разные пробирки, чтобы исключить их спаривание и возможность передачи возбудителей друг другу [Сбор, учет, 2011].

Живых клещей сдавали в лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае», где с помощью ПЦР-анализов определялась их зараженность.

Таксономический анализ собранного материала выявил, что все собранные иксодовые клещи относились к виду таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (*Acarina*, *Ixodidae*).

В результате было собрано и отправлено в лабораторию ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае» 285 особей *I. persulcatus* (таблица 2).

Таблица 2 – Результаты лабораторных исследований клещей *I. persulcatus*, собранных в УНБ «Предуралье»

Дата	Место сбора (станция)	Доставлено в лабораторию			Исследовано/Обнаружена инфекция			
		всего	из них		Вирусный клещевой энцефалит	Инфекционный клещевой боррелиоз	Моноцитарный эрлихиоз человека	Гранулоцитарный анаплазмоз человека
			самцов	самок				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
12.05.21	Смешанный лес	14	6	8	14/1	14/3	14/0	14/0
12.05.21	Широколиственный лес	3	1	2	3/0	3/1	3/0	3/0
12.05.21	Зарастающая поляна с елово – сосновым лесом	4		4	4/0	4/1	4/0	4/0
12.05.21	Темно-хвойный лес	20	13	7	20/0	20/4	20/0	20/0
12.05.21	Смешанный елово-березовый лес	10	6	4	10/0	10/2	10/0	10/0
20.05.21	Темно-хвойный лес	2	2		4/0	4/1	4/0	4/0
20.05.21	Смешанный лес	17	9	8	17/0	17/3	17/2	17/0
20.05.21	Дорога через суходольный луг	20	10	10	20/0	20/5	20/0	20/1
20.05.21	Смешанный лес по зарастающему склону	1		1	1/0	1/0	1/0	1/0
20.05.21	Смешанный лес	7		7	7/0	7/0	7/0	10/1
30.05.21	Темно-хвойный лес	21	21		21/0	21/4	21/0	21/0
30.05.21	Смешанный лес	24		24	24/0	24/4	24/0	24/0
30.05.21	Тропа через смешанный лес	10	10		10/0	10/0	10/0	10/1
30.05.21	Тропа через смешанный лес	61		61	61/0	61/20	61/1	61/0
30.05.21	Смешанный лес	44	44		44/0	44/13	44/2	44/0
30.05.21	Смешанный лес	19		19	19/0	19/6	19/1	19/0
30.05.21	Дорога вдоль зарастающей поляны	8		8	8/0	8/2	8/0	8/0
Всего		285	122	163	285/1	285/69	285/6	285/3

Лабораторный анализ проводился на определение возбудителей пяти трансмиссивных заболеваний: вирусного клещевого энцефалита (ВКЭ), инфекционного клещевого боррелиоза или болезни Лайма (ИКБ), моноцитарного эрлихиоза человека (МЭЧ), гранулоцитарного анаплазмоза человека (ГАЧ) и лихорадки Западного Нила.

Из 285 исследуемых клещей, взятых на территории УНБ «Предуралье» лишь одна особь (0,35%) была переносчиком возбудителя вирусного клещевого энцефалита, 69 особей (24,21%) были заражены возбудителями болезни Лайма (боррелиоза), 6 особей (2,1%) были переносчиками моноцитарного эрлихиоза человека, 3 особи (1,05%) содержали возбудителя гранулоцитарного анаплазмоза человека. Ни одного случая обнаружения возбудителя лихорадки Западного Нила не было (таблица 2).

Таким образом, зараженность таежного клеща на территории УНБ «Предуралье» колеблется от 0,35% до 24,21%, из них больше всего клещей, зараженных боррелиями (возбудителями болезни Лайма).

Сравнивая эпидемиологическую ситуацию (по клещевым инфекциям) в УНБ «Предуралье» и в Пермском крае (таблица 2) мы обнаружили, что уровень зараженности клещей на территории учебной базы в целом ниже, чем на территории края. В 1,7 раз меньше зараженных клещей возбудителями боррелиоза и эрлихиоза, в 2 раза меньше – возбудителями анаплазмоза и более чем в 3 раза меньше – возбудителями энцефалита (рисунок 1). При этом, сохраняется общая пропорция между заболеваниями. Всегда наименьшие показатели у энцефалита, самые высокие – у болезни Лайма, а эрлихиоз и анаплазмоз имеют долю в несколько процентов.

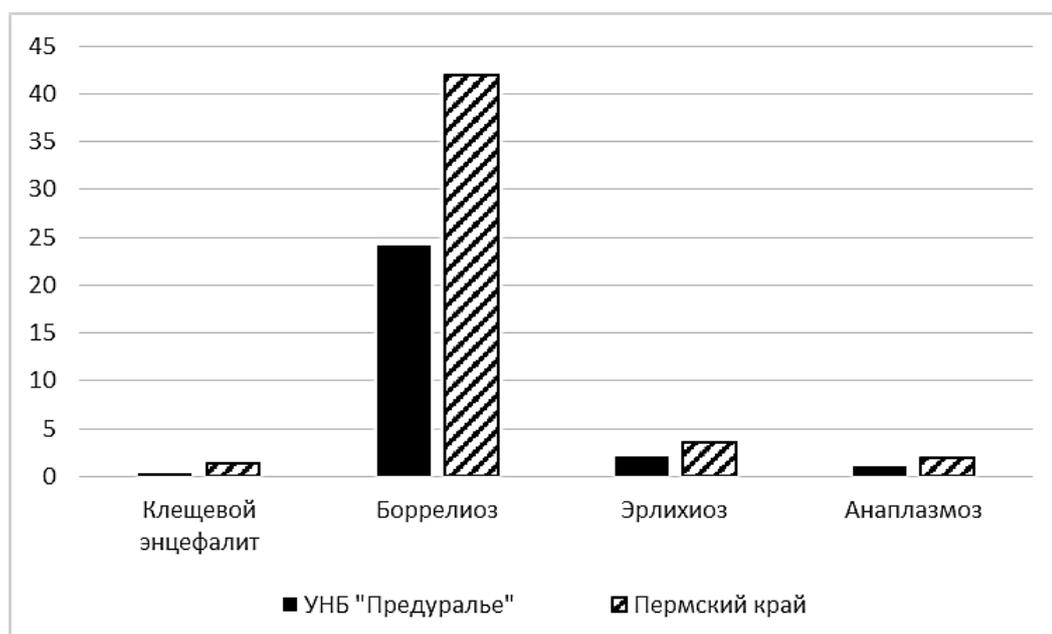


Рисунок 1 – Степень заражения таежного клеща возбудителями трансмиссивных заболеваний на территории УНБ «Предуралье» в сравнении с данными Роспотребнадзора по Пермскому краю за 2021 год.

Чтобы понять причину такой разницы, необходимо продолжать подобные исследования в УНБ «Предуралье». Но, несомненно, радует общая низкая степень зараженности клещей на исследованной нами территории, где ежегодно проходят практику порядка трех сот человек.

Далее, мы попытались проанализировать в каких типах растительных сообществ, по которым проходили наши маршруты, оказалось больше зараженных клещей. На рисунке 2 изображено процентное соотношение зараженных и незараженных клещей на территории научной базы. На маршрутах, проходивших в смешанных лесах было взято для ПЦР-анализа 207 особей, из них переносчиками возбудителей являлись 60, что составило 29%. На маршрутах, проходивших в темнохвойных лесах было взято для анализа 47 таежных клещей, который показал, что 10 из них были переносчиками возбудителей, что равняется 24%. На луговых маршрутах зараженными оказались 8 особей из 28 взятых для изучения, это 29%.

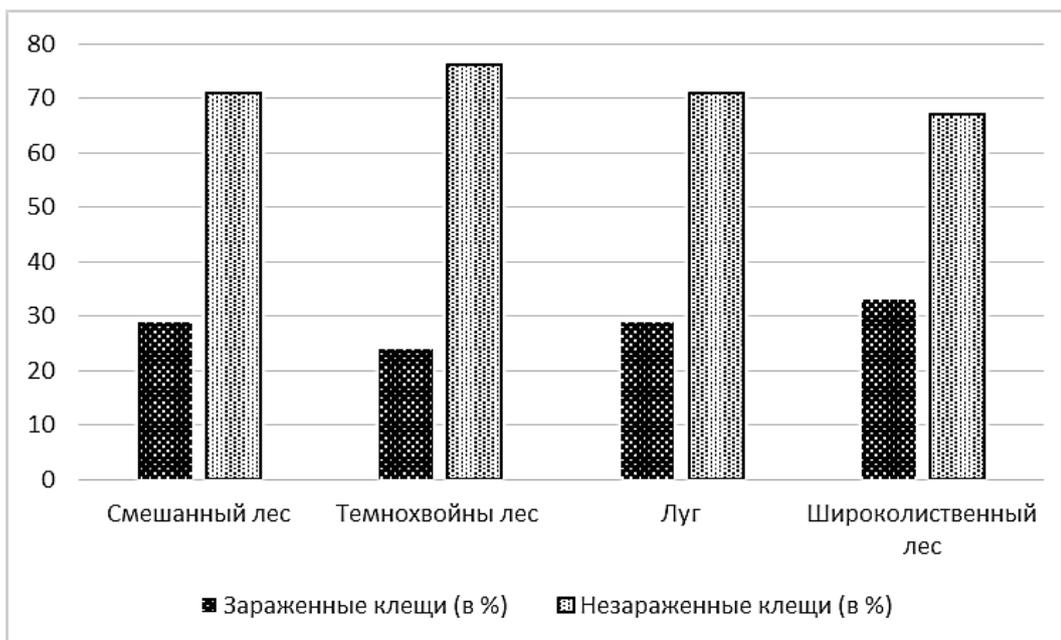


Рисунок 2 – Процентное соотношение зараженных и незараженных клещей, собранных в изученных биотопах.

В материалах, полученных на маршрутах, проходивших в широколиственных лесах переносчиком возбудителей был один из 3 клещей, то есть 33% из них.

Таким образом, зараженность особей таежного клеща на территории УНБ «Предуралье» в исследованных биотопах не сильно отличается и колеблется от 21% до 33%, что свидетельствует об отсутствии какой-либо зависимости степени зараженности клещей от их места обитания.

Заключение

По результатам ПЦР-анализов, собранных нами клещей, были получены данные о том, что на территории УНБ «Предуралье» есть реальная возможность заразиться всеми четырьмя, распространенными в Прикамье клещевыми инфекциями – вирусный клещевой энцефалит, инфекционный клещевой баррелиоз, моноцитарный эрлихиоз человека, гранулоцитарный анаплазмоз человека.

Наибольший риск заражения приходится на инфекционный клещевой баррелиоз (болезнь Лайма). По нашим данным каждый четвертый клещ может быть носителем борреллий. Возможность заразиться вирусным клещевым энцефалитом на территории УНБ «Предуралье» наименьшая. По нашим данным 1 из 285 клещей был носителем этого опасного вируса.

Что касается уровня зараженности клещей, обитающих в различных биотопах, то его колебания оказались незначительными – от 21% до 33%. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии какой-либо зависимости степени зараженности клещей от их места обитания.

В целом уровень зараженности клещей на территории УНБ «Предуралье» заметно меньше, чем на территории Пермского края.

Библиографический список

1. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Помелова В.Г., Кузнецова Т.И. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2013. №4. С. 11-15
2. Воробьева Н. Н., Меркурьева Е. В., Николенко А. В., Суслина О. А. Иксодовый клещевой боррелиоз: клинико-эпидемиологические особенности течения на территории крупного промышленного центра. // Пермский медицинский журнал 2020 том XXXVII № 4. С. 46-54.
3. Валишин Д. А., Мурзабаева Р. Т., Мамон А. П., Мамон М. А., Арсланова Л. В. // Инфекции, передающиеся иксодовыми клещами: учебное пособие – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава РФ, 2016 – 68 с.
4. Овеснов, С. А., Ефимик Е. Г. Биоразнообразие и экология высших растений: учеб. пособие по учебной практике // Перм. гос. ун-т. – Пермь, 2009. С. 9 – 10.
5. Филиппова Н.А. Таежный клещ *Ixodes persulcatus* Schulze (Acarina, Ixodidae): Морфология, систематика, экология, медицинское значение. – Л.: Наука, 1985. – 416 с.
6. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. 55 с.
7. Беспятова Л. А., Бугмырин С.В. Иксодовые клещи Карелии (распространение, экология, клещевые инфекции) // Учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Карельский научный институт РАН, 2012, 100 с.

ВОЗМОЖНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИСТОЧНИКИ ГОЛОЖАБЕРНОГО МОЛЛЮСКА *CADLINA LAEVIS* (LINNAEUS, 1767) В БУХТЕ РУДНОЙ, ЯПОНСКОГО МОРЯ

Индриксон Я.В.¹, Комисаренко А.А.²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

² Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

Аннотация. Впервые был описан общий состав жирных кислот для голожаберного моллюска *Cadlina laevis* (Linnaeus, 1767), а также исследованы жирнокислотные пищевые маркеры. Проведено сравнение разных экземпляров моллюска, собранного из одной бухты в разное время и в несколько отличающихся условиях.

Ключевые слова: пищевые маркеры, жирные кислоты, Nudibranchia.

POSSIBLE NUTRITIONAL SOURCES OF *CADLINA LAEVIS* (LINNAEUS, 1767) IN RUDNAYA BAY OF THE JAPAN SEA

Indriksone J. V.¹, Komisarenko A. A.²

¹ Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

² Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. Total fatty acids composition of a nudibranch *Cadlina laevis* (Linnaeus, 1767) is described for the first time. The fatty acid trophic markers are investigated. Specimens that were collected from one Bay in different years and in slightly different conditions are compared.

Keywords: fatty acids, fatty acid trophic markers, Nudibranchia.

Голожаберный моллюск *Cadlina laevis* распространён в Северо-Восточной Пацифике на не больших глубинах (до 30 метров) [1]. Ранее было показано, что представители этого вида питаются *Halisarca dujardini* Johnston, 1842 [2] и другими губками [1,3]. Несмотря на это, исследования пищевых комков животных может являться неточным, так как в желудках животных остаются только твердые не перевариваемые частички пищи, а в экспериментальных условиях или в условиях наблюдения мелкие животные, в том числе голожаберные моллюски, часто, хоть и физически находятся на поверхности потенциальной жертвы, питаются её обрастателями. В таком случае анализ жирнокислотных пищевых маркеров может являться отличным дополнением в исследованиях, так как в составе простых липидов будет обнаруживаться именно то, что усваивает хищник при получении питательных веществ. Моллюски, использованные нами для исследования, были собраны в бухте Рудная (Приморский край) в 2021 и в 2022 годах. Для исследования жирнокислотных пищевых маркеров использовалось по 5 экземпляров за каждый год.

Общий состав жирных кислот моллюсков был получен методом газовой хроматографии и масспектрометрией. Всего была получена 41 жирная кислота, из них в наибольшем количестве из насыщенных кислот была представлена 16:0 кислота, а именно $9.06 \pm 4.32\%$ от общего количества кислот за 2021 год и $6.84 \pm 0.89\%$ за 2022 год, из мононенасыщенных преобладала 18:1(n-7) кислота, а именно $8.00 \pm 0.91\%$ и $11.14 \pm 3.10\%$ (за 2021 и 2022 год соответственно), из полиненасыщенных преобладала 20:4(n-6) кислота, а именно $14.07 \pm 3.21\%$ и $12.07 \pm 3.05\%$, из метилен неразделённых преобладала $\Delta 7, 15 22:2$, а именно $5.08 \pm 1.16\%$ и $5.92 \pm 0.59\%$.

Всего насыщенных кислот было $17.67 \pm 3.77\%$ и $13.77 \pm 1.66\%$ (за 2021 и 2022 год соответственно), мононенасыщенных – $25.11 \pm 7.53\%$ и $26.34 \pm 2.30\%$, полиненасыщенных – $30.44 \pm 6.06\%$ и $31.70 \pm 2.84\%$, метилен неразделённых – $12.31 \pm 2.58\%$ и $12.81 \pm 0.76\%$. Сумма бактериальных (сумма 15-изо, 15-антеизо, 15:0, 16-изо, 16-антеизо, 17-изо, 17-антеизо, 17:0, 19-изо, 19-антеизо, 19:0 и 18:1(n-7)) кислот составляла $18.32 \pm 2.53\%$ и $22.90 \pm 2.84\%$, что явно указывает на возможные симбиотические отношения с бактериями [4].

Процент длинных кислот с метилен неразделенной цепью, а именно C₂₄-C₄₄, составлял 33% и 24% от всех метилен неразделённых кислот, что может указывать на некоторый вклад Губок (Porifera) в питание *C. laevis* [5].

По результатам статистического анализа (PERMANOVA) состав жирных кислот у моллюсков, собранных в разные года, отличался друг от друга (p-value = 0,011, p-adjusted = 0,011), что можно увидеть на кластерной дендрограмме, отображенной на Рисунке 1. Дендрограмма была получена с использованием пакета QFASA в R Studio с использованием языка программирования R.

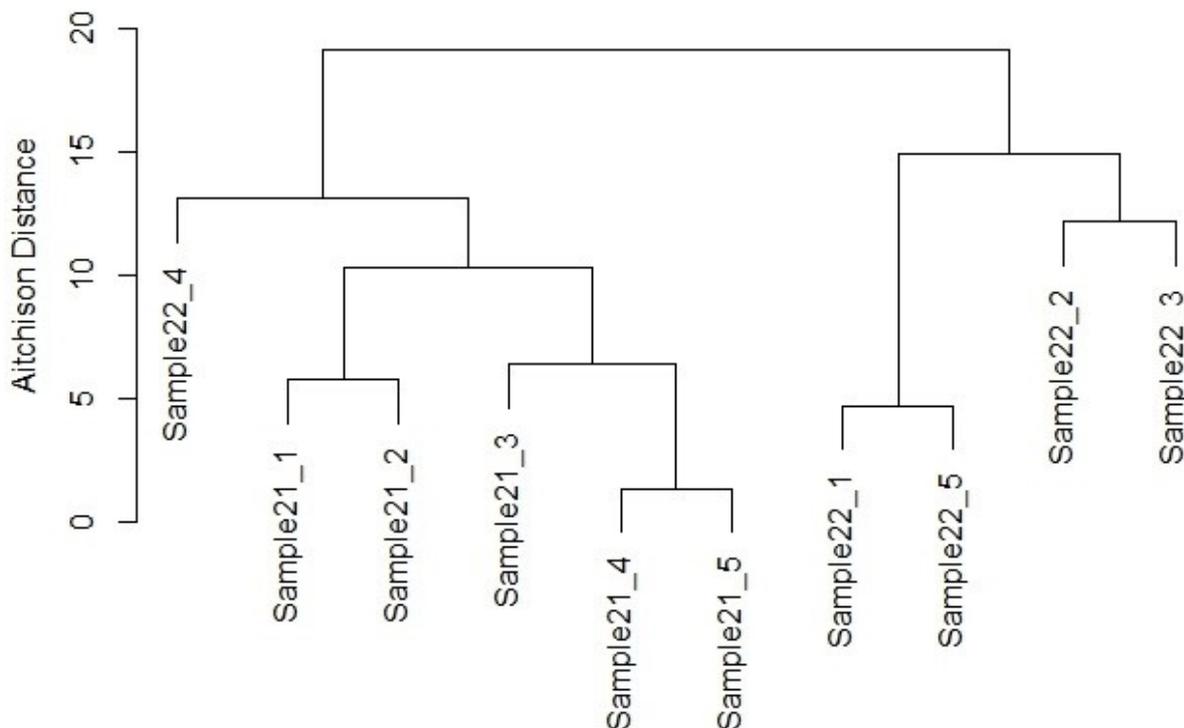


Рисунок 1 – Кластерная дендрограмма, основанная на составе жирных кислот. Sample21 – образцы, собранные в 2021 году, Sample22 – образцы, собранные в 2022 году.

Дальнейшая статистическая обработка показала, что образцы отличаются по следующим кислотам: 20:1(n-13), 22:4(n-6), $\Delta 5, 9, 19 26:3$, $\Delta 5, 9 31:2$, $\Delta 5, 9 44:2$ (для всех p-value <0.05).

Такие отличия могут быть связаны в первую очередь с аномально высокой температурой воды летом-осенью 2021 года для всего региона, а также с тем, что животные в 2022 году некоторое время голодали перед фиксацией.

Анализ пищевых маркеров подтвердил ранее полученные результаты о том, что *C. laevis* предпочитает питаться демоспонгиевыми губками (класс Demospongiae), при этом мы обнаружили явную взаимосвязь с бактериями, которые могут являться симбионтами моллюска или губок, при этом тоже будут использоваться как источник пищи и энергии.

Библиографический список

1. Korshunova T., Fletcher K., Picton B., Lundin K., Kashio S., Sanamyan N., Sanamyan K., Padula V., Schrödl M., Martynov A. The Emperor's *Cadlina*, hidden diversity and gill cavity evolution: new insights for the taxonomy and phylogeny of dorid nudibranchs (Mollusca: Gastropoda) // Zoological Journal of the Linnean Society. –2020. –189. –3. –762-827.
2. McDonald G. R., Nybakken J. W. A worldwide review of the food of nudibranch mollusks. I. Introduction and the suborder Arminacea // 1997. –Veliger. –40(2). –157-159.
3. Picton B.E., Morrow C. A field guide to the nudibranchs of the British Isles // 1994.
4. Zhukova N.V., Eliseikina M.G., Balakirev E.S., Ayala F.J. Multiple bacterial partners in symbiosis with the nudibranch mollusk *Rostanga alisae* // Sci Rep.–2022. –12. –169.
5. Barnathan G. Non-methylene-interrupted fatty acids from marine invertebrates: Occurrence, characterization and biological properties // Biochimie. –2009. –91. –671-678.

**МИГРАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПРЭСНОВОДНОЙ ПЕЛАГИЧЕСКОЙ
АМФИПОДЫ *MACROHECTOPUS BRANICKII* (DYBOWSKY, 1874)
В ПЕЛАГИАЛИ ОЗЕРА БАЙКАЛ**

Карнаухов Д.Ю., Ермолаева Я.К., Долинская Е.М., Бирицкая С.А., Масленникова М.А.,
Пушница В.А., Бухаева Л.Б., Лавникова А.В., Щукова Е.А., Голубец Д.И., Зилов Е.А.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

Аннотация. Пресноводная пелагическая амфипода *Macrohectopus branickii* является уникальным представителем фауны озера Байкал и важным элементом трофической сети озера. В данной работе было проанализировано присутствие особей данного вида на стационарной станции в южной части оз. Байкал. Анализ результатов долговременного мониторинга показал, что особи данного вида могут продолжительное время отсутствовать в пелагиали отдельных районов озера.

Ключевые слова: амфиподы, *Macrohectopus branickii*, миграции, озеро Байкал, эндемики.

**MIGRATION BEHAVIOR OF THE FRESHWATER PELAGIC AMPHIPOD
MACROHECTOPUS BRANICKII (DYBOWSKY, 1874) IN THE PELAGIAL OF LAKE
BAIKAL**

Karnaukhov D.Yu., Ermolaeva Y.K., Dolinskaya E.M., Biritskaya S.A., Maslennikova M.A.,
Pushnitsa V.A., Bukhaeva L.B., Lavnikova A.V., Schukova E.A., Golubets D.I., Silow E.A.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. The freshwater pelagic amphipod *Macrohectopus branickii* is a unique representative of the fauna of Lake Baikal and an important element of the lake's food web. In this work, the presence of individuals of this species at a stationary station in the southern part of Lake Baikal was analyzed. An analysis of the results of long-term monitoring showed that individuals of this species may be absent from the pelagial of certain areas of the lake for a long time.

Keywords: amphipods, *Macrohectopus branickii*, migrations, Lake Baikal, endemics.

Macrohectopus branickii (Dybowsky, 1874) является на данный момент единственным известным представителем пресноводных пелагических амфипод и единственным видом в своем семействе [1, 6]. Данный вид занимает одно из ключевых мест в экосистеме озера Байкал и экологическую нишу сходную с антарктическим крилем и мизидами [1, 5]. У представителей данного вида отмечаются как суточные вертикальные миграции, так и горизонтальные

миграции в ночное время в сторону уреза озера [3]. При этом, несмотря на достаточно длинный период изучения, многие особенности экологии данного вида [4] и его места в трофических взаимодействиях [2, 7] становятся известны только сейчас.

В настоящий момент не до конца понятно миграционное поведение особей данного вида в пелагиали озера Байкал. В виду этого, целью настоящей работы было проанализировать и оценить миграционную активность отдельных размерно-возрастных групп особей макрогектопуса в пелагиали озера Байкал, основываясь на данных экологического мониторинга с 1945 по 1984 гг.

Для работы были использованы данные мониторинга, собранные в рамках проекта «Точка №1». Отбор проб в рамках данного проекта производится с февраля 1945 года по настоящее время с периодичностью один раз в 7-10 дней. Одним из анализируемых параметров является численность различных представителей зоопланктона (в том числе особей макрогектопуса). Отбор проб производится с использованием сети Джели с диаметром входного отверстия 37,5 см. После чего пробы фиксируются и обрабатываются в камеральных условиях по стандартной методике. Все данные вносятся в базу данных, которая использовалась нами для анализа миграционной активности. Непосредственно анализ и визуализацию производили с использованием языка программирования R.

В результате обсчета и посредством визуализации имеющихся данных по многолетнему мониторингу на рисунке 1 наглядно продемонстрированы периоды полного отсутствия особей макрогектопуса в пелагиали оз. Байкал напротив пос. Большие Коты. Обнаруженные периоды отсутствия особей макрогектопуса прослеживаются и соответствуют друг другу сразу по обоим анализируемым слоям (0-250 м и 250-500 м) и по обоим анализируемым размерно-возрастным группам (1-6 мм и 7-14 мм), тем самым подтверждая себя дополнительно.

Для особей макрогектопуса размерно-возрастной группы 7-14 мм период длительного отсутствия в пелагиали в слое 0-250 м приходится на 1964-1971 года, а для слоя 250-500 м на 1963-1971 года. В свою очередь для особей размерно-возрастной группы 1-6 мм периоды длительного отсутствия в пелагиали в слое 0-250 м приходятся на 1964-1968 года и 1968-1971 года, а для слоя 250-500 м на 1963-1968 года и 1968-1971 года.

Обнаруженные и продемонстрированные периоды длительного (именно длительного, т.к. кратковременные периоды отсутствия фиксировались и ранее) отсутствия особей макрогектопуса говорят о том, что на данный момент, по-прежнему, крайне мало известно об экологии данного вида. Подобное миграционное поведение в пелагиали озера затрудняет подсчет биомассы данного вида, о несостыковках в которой ранее неоднократно отмечалось.

Безусловно, отсутствие потенциальной жертвы будет сказываться и на численности рыб, которые ей питаются, в данном районе, что в свою очередь будет сказываться и на пятнистости распределения рыбы. Поэтому представляется необходимым продолжать изучение экологии данного вида, в том числе в контексте взаимосвязи с биотическими и абиотическими факторами среды.

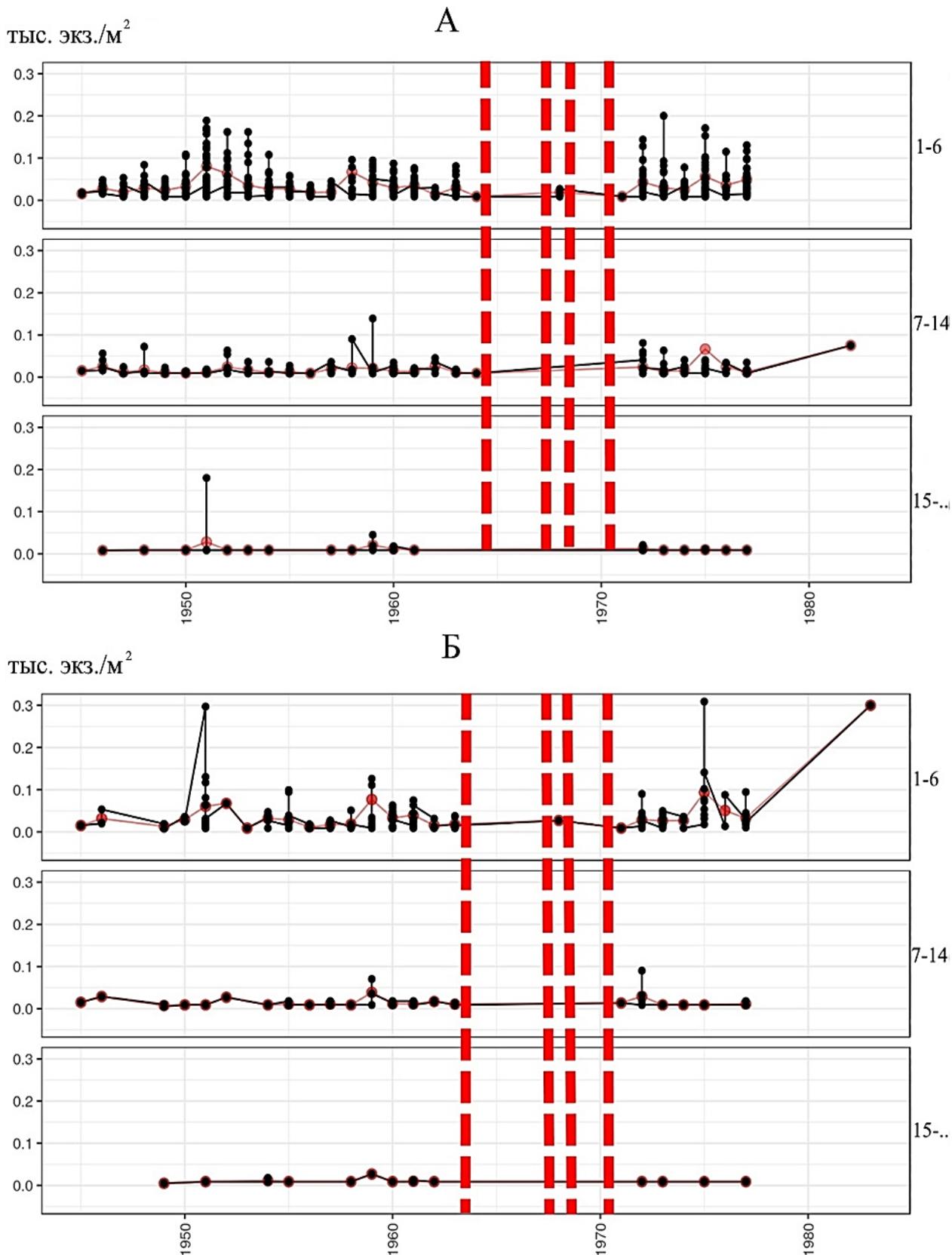


Рисунок 1 – А – периоды длительного отсутствия особей макрогектопуса разных размерно-возрастных групп в слое 0-250 м; Б – периоды длительного отсутствия особей макрогектопуса разных размерно-возрастных групп в слое 250-500 м.

Библиографический список

1. Байкаловедение: в 2 кн.–Новосибирск: Наука, 2012.–Кн.2.– 644 с.
2. Didorenko S., Botvinkin A., Takhteev V. A new, original trophic relationship in the lake Baikal ecosystem: the pelagic amphipod, *Macrohectopus branickii* (Crustacea, Amphipoda) and *Myotis petax* bats (Mammalia, Chiroptera) // *Zoolog. Jour.*–2020.–V.99.–№10. – P. 1140-1147.
3. Karnaukhov D., Bedulina D., Kaus A., Prokosov S., Sartoris L., Timofeyev M., Takhteev V. Behaviour of Lake Baikal amphipods as a part of the night migratory complex in the Kluevka settlement region (South-Eastern Baikal) // *Crust.*–2016.–V.89.–№4.–P. 419-430.
4. Karnaukhov D., Dolinskaya E., Biritskaya S., Teplykh M., Ermolaeva Ya., Pushnica V., Kuznetsova I., Okholina A., Bukhaeva L., Rusanovskaya O., Silow E. New data regarding ecology of freshwater pelagic amphipod *Macrohectopus branickii* (Dybowsky, 1874) (Amphipoda: Macrohectopodidae) and other crustaceans of plankton from the southern part of Lake Baikal (Russia, Southern Siberia) // *Acta Biol. Sib.*–2021.–V.7.–P. 39-48
5. Rudstam L.G., Melnik N.G., Timoshkin O.A., Hansson S., Pushkin S.V., Nemov V. Diel dynamics of an aggregation of *Macrohectopus branickii* (Dyb.) (Amphipoda, Gammaridae) in the Barguzin Bay, Lake Baikal, Russia // *J. Great Lakes Res.*–1992.–V.18.–№2.–P. 286-297.
6. Takhteev V., Berezina N., Sidorov D. Checklist of the Amphipoda (Crustacea) from continental waters of Russia, with data on alien species // *Arthrop. Selec.*–2015.–V.24.–№3.–P. 335-370.
7. Watanabe Yu., Baranov E., Miyazaki N. Ultrahigh foraging rates of Baikal seals make tiny endemic amphipods profitable in Lake Baikal // *PNAS.*–2020.–V.117.–№49.–P. 31242-31248.

ВЛИЯНИЕ ИНСЕКТИЦИДНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КОМНАТНОЙ МУХИ *MUSCA DOMESTICA* L.

Кинарейкина А. Г.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ТюмНЦ СО РАН, Тюмень, Россия

Аннотация. Природные популяции насекомых подвергаются летальному и сублетальному воздействию пестицидов. В работе представлены результаты исследования активности и кинетических параметров ацетилхолинэстеразы (AChE) у имаго *Musca domestica* L. после воздействия инсектицидами фипронилом и хлорфенапиром в сублетальных концентрациях. После воздействия фипронилом у самок наблюдали снижение удельной активности AChE, K_m и V_{max} по сравнению с контролем, в то время как у самцов таких изменений не обнаружено.

Ключевые слова: комнатная муха (*Musca domestica* L.), инсектициды, хлорфенапир, фипронил, ацетилхолинэстераза.

THE EFFECT OF INSECTICIDAL ACTION ON THE ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY OF THE HOUSEFLY *MUSCA DOMESTICA* L.

Kinareikina A. G.

ASRIVEA – branch of the Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia

Abstract. Natural insect populations are exposed to detailed and sublethal exposure to pesticides. The paper presents the results of a study of the activity and kinetic parameters of acetylcholinesterase (AChE) in imago *Musca domestica* L. After exposure to insecticides with fipronil and chlorphenapir in sublethal concentrations. After exposure to fipronil, a decrease in the specific activity of AChE, K_m and V_{max} was observed in females compared to the control, while no such changes were found in males.

Keywords: housefly (*Musca domestica* L.), insecticides, chlorphenapir, fipronil, acetylcholinesterase.

В настоящее время, среди методов контроля численности насекомых наиболее распространенным является применение пестицидов [1]. Борьба против взрослой стадии *Musca domestica* L. осуществляется в основном синтетическими инсектицидами во многих странах мира (в Китае [1], Турции [2], Иране [3]), такими как пиретроиды (циперметрин, дельтаметрин и перметрин [4]), неоникотиноиды, фосфорорганические соединения и карбаматы [3].

Пестициды способны распространяться в окружающей среде на расстояние от нескольких метров до нескольких сотен километров (2-25% потерь химического вещества) [5], приводя к значительным рискам загрязнения окружающей среды [6], а из-за острой токсичности и эффектов биоаккумуляции [7] к потенциально опасным последствиям для

здоровья людей, животных [8], в том числе и нецелевых видов насекомых (например, медоносных пчел) [9]. Изучение хронических и сублетальных эффектов инсектицидного воздействия и их видовых особенностей важно для более полного понимания экологических и эволюционных закономерностей пестицидной устойчивости.

Цель данной работы состояла в изучении активности и кинетических параметров ацетилхолинэстеразы у самок и самцов комнатной мухи *M. domestica* L. после воздействия сублетальных концентраций хлорфенапира и фипронила.

Работа проведена на базе Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиале ТюмНЦ СО РАН, в период 2020-2022 гг. В качестве объекта исследования выступали имаго 3-5 дневного возраста лабораторной линии *M. domestica* L. Хлорфенапир – это пирроловый проинсектицид [10], поэтому он должен подвергнуться биоактивации, опосредованной цитохромом P450 для создания соответствующего токсичного метаболита (CL 303268), нарушающего процесс окислительного фосфорилирования в митохондриях [11]. Инсектицид обладает преимущественно кишечной и некоторой контактной активностью [12]. Фипронил относится к классу фенилпиразолов, обладает широким контактно-кишечным, системным спектром действия [13]. Инсектицид действует как неконкурентный антагонист рецептора γ -аминомасляной кислоты [14].

Испытания инсектицидов проводили в следующих концентрациях (%): хлорфенапир – 0,015; 0,02; 0,025; 0,05, фипронил – 0,00025; 0,0005; 0,001; 0,002; 0,0025; 0,005 (для каждой концентрации выполнено не менее 3 повторностей). Осуществляли кишечное воздействие инсектицидом на имаго *M. domestica* L. методом группового кормления мух [15].

Таблица 1 – Смертность при сублетальном воздействии хлорфенапира и фипронила на имаго *Musca domestica* L.

Инсектицид	Концентрация инсектицида, %	Летальность, %	
		Самки	Самцы
Хлорфенапир	0,015	18,2	42,1
	0,025	40,6	100,0
Фипронил	0,0005	23,3	45,0
	0,001	72,0	100,0

В таблице 1 показано, что самцы лабораторной линии *Musca domestica* L. более чувствительны к воздействию инсектицидов, чем самки. При более низких концентрациях инсектицида показатели летальности у самцов выше, чем у самок.

Метаболизм ксенобиотиков – это центральный процесс детоксикации, который происходит во всех организмах. Многие пестициды ингибируют активность эстераз, сложных ферментов со многими формами и функциями [16]. Эстеразы относятся к подклассу гидролаз, катализируют гидролитическое расщепление различных сложных эфиров органических соединений, поэтому они играют важную роль в биотрансформации ксенобиотиков в большинстве организмов [17]. Ацетилхолинэстераза (КФ 3.1.1.7; AChE) – это сериновая эстераза из семейства α -, β -гидролаз [18]. Является ключевым ферментом холинергической нейротрансмиссии, поскольку она регулирует уровень ацетилхолина, посредством его гидролиза на холин и уксусную кислоту [19]. AChE является объектом-мишенью для некоторых инсектицидов (фосфорорганические соединения, карбаматы, флавоноиды) [20]. Изменение активности и чувствительности AChE – важные механизмы детоксикации многих инсектицидов с образованием менее токсичных метаболитов [4].

Результаты определения удельной активности ацетилхолинэстеразы у имаго *M. domestica* L. представлены на рисунках 1-2.

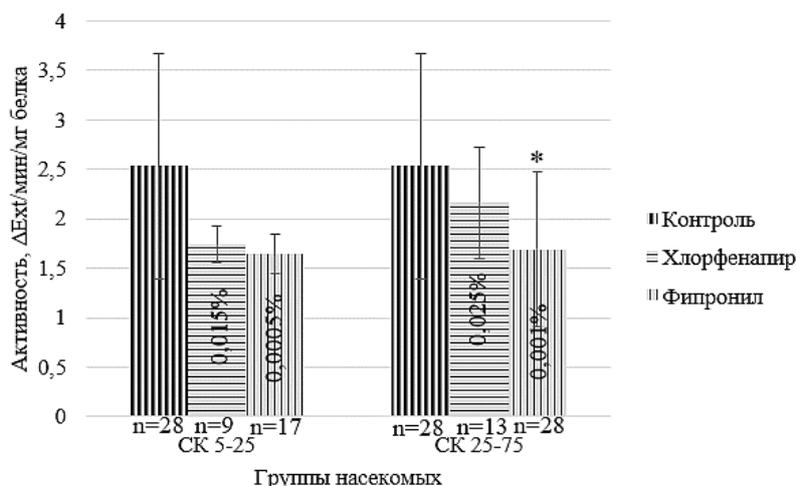


Рисунок 1 – Удельная активность ацетилхолинэстеразы при 1 мМ АТХ у самок *Musca domestica* L. после инсектицидного воздействия.

Примечание: n – объём выборки; СК5-25 – концентрация инсектицида, вызывающая гибель 5-25% имаго, %; СК25-75 – концентрация инсектицида, вызывающая гибель 25-75% имаго, %; * $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой имаго.

На рисунке 1 показано, что при воздействии хлорфенaпирa на самок лабораторной линии *Musca domestica* L. не обнаружено статистически достоверных изменений удельной активности АСhE. При воздействии фипронилom в концентрации 0,001% удельная активность статистически достоверно снижалась на 33,20% по сравнению с контрольным уровнем ($p \leq 0,05$), при этом летальность имаго составляла 72,0% (СК25-75).

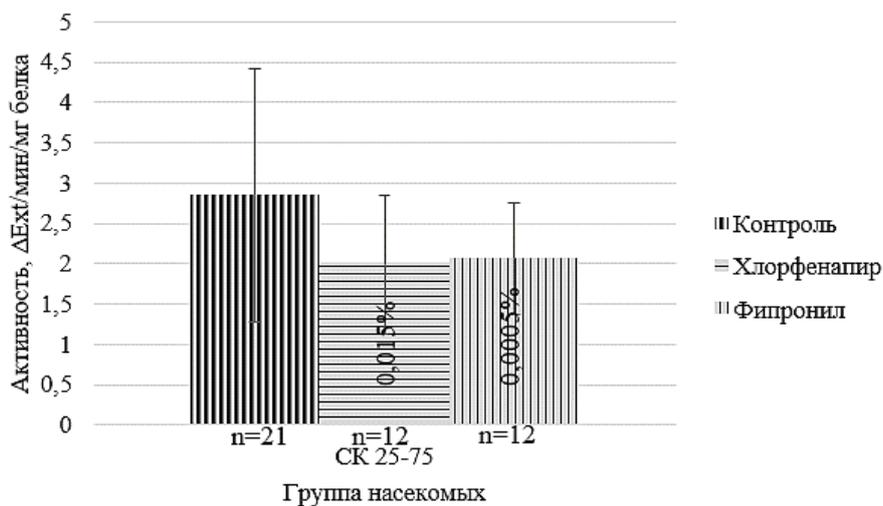


Рисунок 2 – Удельная активность ацетилхолинэстеразы при 1 мМ АТХ у самцов *Musca domestica* L. после инсектицидного воздействия.

Примечание: n – объём выборки; СК25-75 – концентрация инсектицида, вызывающая гибель 25-75% имаго, %.

На рисунке 2 показано, что при воздействии хлорфенапиром, фипронилом на самцов лабораторной линии *Musca domestica* L. статистически достоверных изменений удельной активности АСhЕ обнаружено не было.

Результаты определения кинетических параметров (V_{max} , K_m) у имаго *M. domestica* приведены на рисунках 3-4.

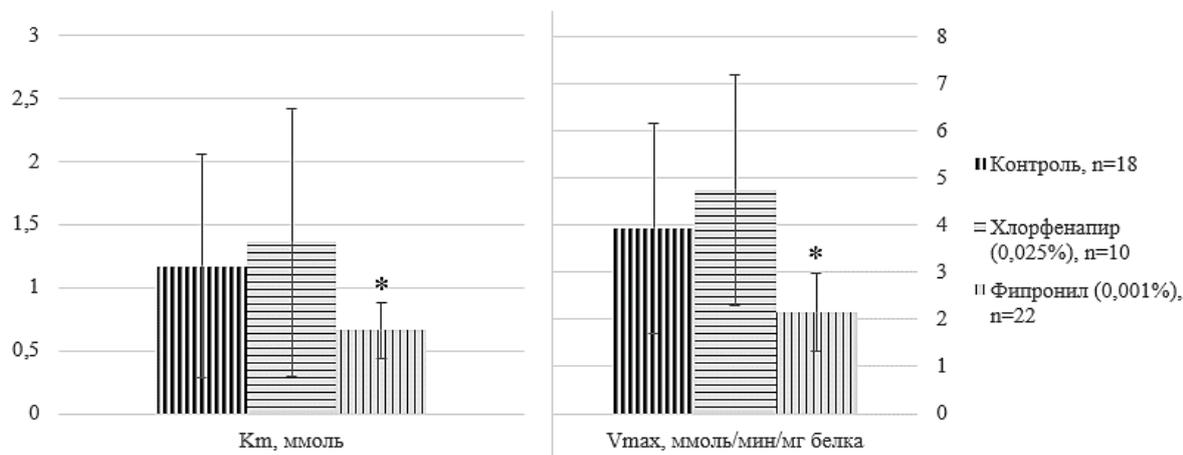


Рисунок 3 – Кинетические характеристики (K_m , V_{max}) АСhЕ самок *Musca domestica* L. после инсектицидного воздействия.

Примечание: n – объём выборки; * $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой имаго.

При воздействии хлорфенапира на самок *Musca domestica* L. статистически достоверных изменений кинетических параметров по сравнению с контрольной группой обнаружено не было. После воздействия фипронилом в концентрации 0,001% на самок *Musca domestica* L. K_m статистически достоверно снижалась на 43,59% по сравнению с контрольным уровнем ($p \leq 0,05$); V_{max} статистически достоверно снижалась ($p \leq 0,05$) на 45,29% по сравнению с соответствующей контрольной группой (Рисунок 3).

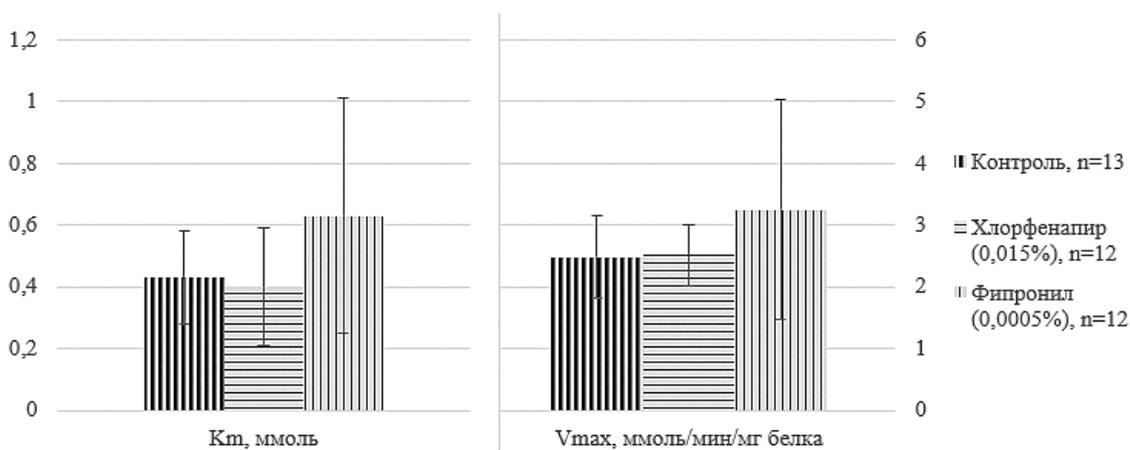


Рисунок 4. Кинетические характеристики (K_m , V_{max}) АСhЕ самцов *Musca domestica* L. после инсектицидного воздействия.

Примечание: n – объём выборки.

На рисунке 4 показано, что после воздействия хлорфенапиром, фипронилом на самцов лабораторной линии *Musca domestica* L. статистически достоверных изменений кинетических параметров ацетилхолинэстеразы обнаружено не было.

Таким образом, воздействие фипронилом в сублетальных концентрациях сопровождалось снижением удельной активности ацетилхолинэстеразы на 33,20% у самок относительно контрольных значений, а при воздействии хлорфенапиром не наблюдали изменений данного параметра у имаго по сравнению с контролем. Воздействие фипронилом сопровождалось снижением V_{max} (на 45,29%) и K_m (на 43,59%) ацетилхолинэстеразы у самок, но не у самцов по сравнению с контрольными особями. Воздействие хлорфенапиром не повлияло на кинетические параметры ацетилхолинэстеразы имаго.

Работа выполнена в рамках программы фундаментальных научных исследований РАН (проект № 121042000076-5).

Библиографический список

1. Qiu X.-H., Pan J., Li M., Li Y. PCR-RFLP methods for detection of insecticide resistance-associated mutations in the housefly (*Musca domestica*) // *Pesticide biochemistry and physiology*. – 2012. – V. 104. – № 3. – P. 201-205.
2. Başkurt S., Taşkın B. G., Doğaç E., Taşkın V. Polymorphism in the acetylcholinesterase gene of *Musca domestica* L. field populations in Turkey // *Journal of vector ecology*. – 2011. – V. 36. – № 2. – P. 248-257.
3. Ahmadi E., Khajehali J. Dichlorvos Resistance in the House Fly Populations, *Musca domestica*, of Iranian Cattle Farms // *Journal of arthropod-borne diseases*. – 2020. – V. 14. – № 4. – P. 344-352.
4. Ranian K., Zahoor M. K., Zahoor M. A., Rizvi H., Rasul A., Majeed H. N., Jabeen F., Sarfraz I., Zuhussnain M., Riaz B., Ullah A. Evaluation of Resistance to Some Pyrethroid and Organophosphate Insecticides and Their Underlying Impact on the Activity of Esterases and Phosphatases in House Fly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) // *Polish Journal of Environmental Studies*. – 2021. – V. 30. – № 1. – P. 327-336.
5. Casu V., Tardelli F., De Marchi L., Monni G., Cuccaro A., Oliva M., Freitas R., Pretti C. Soluble esterases as biomarkers of neurotoxic compounds in the widespread serpulid *Ficopomatus enigmaticus* (Fauvel, 1923) // *Journal of environmental science and health part B-pesticides food contaminants and agricultural wastes*. – 2019. – V. 54. – № 11. – P. 883-891.
6. Farooq M., Freed S. Mortality, Biological, and Biochemical Response of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) to Selected Insecticides // *Journal of entomological science*. – 2018. – V. 53. – № 1. – P. 27-45.
7. Bilal S., Mudassir Hassan M., Fayyaz Ur Rehman M., Nasir M., Jamil Sami A., Hayat A. An insect acetylcholinesterase biosensor utilizing $WO_3/g-C_3N_4$ nanocomposite modified pencil graphite electrode for phosmet detection in stored grains // *Food chemistry*. – 2021. – V. 346. – № 128894. – P. 1-10.
8. Giacoppo J. O., C C França T., Kuča K., da Cunha E. F., Abagyan R., Mancini D. T., Ramalho T. C. Molecular modeling and in vitro reactivation study between the oxime BI-6 and acetylcholinesterase inhibited by different nerve agents // *Journal of biomolecular structure & dynamics*. – 2015. – V. 33. – № 9. – P. 2048-2058.
9. Lang G. J., Zhu K. Y., Zhang C. X. Can Acetylcholinesterase Serve as a Target for Developing More Selective Insecticides? // *Current drug targets*. – 2012. – V. 13. – № 4. – P. 495-501.
10. Oxborough R. M., N'Guessan R., Jones R., Kitau J., Ngufor C., Malone D., Mosha F. W., Rowland M. W. The Activity of the Pyrrole Insecticide Chlorfenapyr in Mosquito Bioassay: Towards a More Rational

Testing and Screening of Non-Neurotoxic Insecticides for Malaria Vector Control // Part of Springer Nature. – 2015. – V. 14. – № 124. – P. 1-11.

11. Ямов В. З., Домацкий В. Н., Силиванова Е. А., Левченко М. А. Скрининг новых средств для уничтожения имаго и личинок мух *Musca domestica* // Пест-менеджмент. – 2012. – № 3(83). – С. 46-49.
12. Еремина О. Ю. Хлорфенапир – перспективный инсектицид из группы пирролов для борьбы с резистентными синантропными насекомыми // Пест-менеджмент. – 2017. – № 1(101). – С. 41-49.
13. Farder-Gomes C. F., Fernandes K. M., Bernardes R. C., Bastos D. S. S., Oliveira L. L., Martins G. F., Serrão J. E. Harmful effects of fipronil exposure on the behavior and brain of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Meliponini) // Sci Total Environ. – 2021. – P. 1-10.
14. González-Morales M. A., DeVries Z., Sierras A., Santangelo R. G., Kakumanu M. L., Schal C. Resistance to Fipronil in the Common Bed Bug (Hemiptera: Cimicidae) // J Med Entomol. – 2021. – V. 58. – № 4. – P. 798-1807.
15. Методические указания. МУ 3.5.2.1759-03. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов, используемых в медицинской дезинсекции. Утв. гл. гос. сан. врачом РФ 28.09.2003.
16. Goncalves A. M. M., Rocha C. P., Marques J. C., Goncalves F. J. M. Fatty acids as suitable biomarkers to assess pesticide impacts in freshwater biological scales-A review // Ecological indicators. – 2021. – V. 122. – № 107299.
17. Cao Y., Herrero-Nogareda L., Cedergreen N. A comparative study of acetylcholinesterase and general-esterase activity assays using different substrates, in vitro and in vivo exposures and model organisms // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2019. – № 109954. – P. 1-10.
18. Marinho C. S., Matias M. V. F., Brandão I. G. F., Santos E. L., Machado S. S., Zanta C. L. P. S. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio* // Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology. – 2019. – V. 222. – P. 11-18.
19. Xiao L. S., Dou W., Li Y., Wang J. J. Comparative studies of acetylcholinesterase purified from three field populations of *Liposcelis entomophila* (Enderlein) (Psocoptera: Liposcelididae) // Archives of insect biochemistry and physiology. – 2010. – V. 75. – № 3. – P. 158-173.
20. Li M., Gao X., Lan M., Liao X., Su F., Fan L., Zhao Y., Hao X., Wu G., Ding X. Inhibitory activities of flavonoids from *Eupatorium adenophorum* against acetylcholinesterase // Pesticide biochemistry and physiology. – 2020. – V. 170. – № 104701. – P. 1-10.

СРАВНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ОСОБЕЙ *CORONELLA AUSTRIACA* РАЗНОЙ ОКРАСКИ

Князева Е.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В статье представлены данные по линейным размерам обыкновенной медянки типичной дикой окраски и меланистов, выявлены достоверные различия по отношению длины тела к длине хвоста. Приведено сравнение некоторых особенностей фолидоза, выявлены достоверные различия в количестве височных щитков 2-го ряда с левой стороны.

Ключевые слова: обыкновенная медянка, фолидоз, линейные размеры, окраска, меланизм.

COMPARISON OF SOME MORPHOLOGICAL FEATURES OF INDIVIDUALS OF *CORONELLA AUSTRIACA* OF DIFFERENT COLORS

Knyazeva E. V.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

Abstract. The article presents data on the linear dimensions of the smooth snake of typical wild color and melanists, revealed significant differences in the ratio of body length to tail length. Some features of pholidosis are compared, and significant differences in the number of temporal scales of the 2nd row on the left side are revealed.

Keywords: smooth snake, pholidosis, linear dimensions, coloration, melanism.

Обыкновенная медянка (*Coronella austriaca* Laurenti, 1768) – представитель семейства ужовых, является достаточно распространённым видом змей, её ареал охватывает почти всю Европу (за исключением Исландии, большей части Британии, северной Скандинавии и южной части Пиренейского полуострова), Кавказ, Крым, северную часть Малой Азии, Западную Сибирь и запад Казахстана. В России вид распространён в европейской части: северная граница проходит в Новгородской, Московской, Костромской, Кировской областях, Пермском крае, а также в Западной Сибири [4]. В Пермском крае медянка встречается на лесостепных участках Кунгурского и Кишертского районов [1].

Окраска дорзальной стороны тела медянки изменчива: от серого, серо-бурого и коричневатого-серого до желто-бурого, красно-бурого и медно-красного цвета. Вдоль спины тянется 2-4 ряда тёмных вытянутых пятен, иногда сливающихся в сплошные полосы. На шее 2 короткие бурые полосы или 2 пятна, сливающиеся на затылке. От ноздри через глаз до угла рта проходит узкая тёмная полоса. Вентральная сторона окрашена светлее [2]. В. Л. Вершинин [3] отмечает находки совершенно чёрных особей, которых также называют меланистами.

Меланизм – это появление большого количества пигмента меланина в тканях животного. Так, меланистами в российских изданиях называют особей не только чёрной, но и коричневой или бурой окраски [5]. Меланизм у змей является распространённым, но достаточно изменчивым явлением. В статье будет принята трактовка преобладания тёмной окраски, тогда как вентральная часть тела и горло имеют типичные для медянки светлые элементы.

Примечательно, что змеи чёрной окраски чаще более заметны по сравнению со змеями типичной окраски и подвергаются повышенной опасности со стороны хищников. Следовательно, вредный эффект должен уравниваться другими преимуществами, например, ускорением нагревания на солнце, интенсификацией терморегуляции, что способствует успеху в период размножения, этим может объясняться поддержание численности меланистов в популяциях змей [6].

Цель настоящего исследования – сравнить особей обыкновенной медянки стандартной окраски и меланистов по морфологическим признакам.

Материалы и методы

Сбор материала проводился с конца мая по конец июня 2021 г. на территории заказника «Предуралье». Выборка по линейным размерам тела и фолидозу туловища включает 16 особей; по фолидозу головы – 15.

Для характеристики линейных размеров тела медянки использовались следующие параметры:

- *L.corp.* – длина туловища с головой, мм;
- *L.cd.* – длина хвоста, мм;
- *L.corp./L.cd.* – отношение длины тела к длине хвоста.

Обработка данных фолидоза производилась по фотографиям, сделанным на участках сбора материала. Учитывались следующие щитки: предглазничные (*praeocularia*), заглазничные (*postocularia*), верхнегубные (*Lab.*), межносовые (*internasalia*), подбородочные, теменные (*parientalia*), носовые (*nasalia*), скуловые (*Lor.*), надглазничные (*Supraoc.*), межчелюстные (*rostrale*), лобные (*frontale*), предлобные (*praefrontalia*), подбородочные (*mentale*), нижнегубные (*Sublab.*), 1 ряд височных (*Temp.1 ряд*), 2 ряд височных (*Temp.2 ряд*), брюшные (*Ventr.*), подхвостовые (*Scd.*), щитки вокруг середины туловища (*Sq.*). Для височных щитков с целью исключения фактора субъективности использовалось правило: височный щиток из 1-го ряда для учёта должен касаться заглазничного щитка, а височный щиток 2-го ряда – височного щитка 1-го ряда.

Результаты и обсуждение

Во время исследований зафиксирована 51 встреча медянки. Среди 16 отловленных особей со стандартной окраской 5 (50%) самок и 5 (50%) самцов, среди тёмноокрашенных особей 5 (83%) самок и 1 (17%) самец. Особи обеих сравниваемых групп повторно отловлены по 6 раз. Примечательно, что среди меланистов повторно отлавливалась единственная особь, а среди светлых – 3, одна из которых повторно поймана 4 раза.

В результате анализа фолидоза выяснено, что число некоторых щитков справа/слева стабильно у всех представителей: предглазничных (1/1), заглазничных (2/2), верхнегубных (7/7), межносовых (1/1), подбородочных (1/1), теменных (1/1), носовых (2/2), скуловых (1/1), надглазничных (1/1); межчелюстных, лобных, подбородочных по 1.

Число нижнегубных и височных 1-го и 2-го ряда вариабельно. Нижнегубных у особей с типичной окраской 9/9, 9/8, 10/9, у меланистов – 9/9, 8/8; височных 1-го ряда 2/2, 1/2, 1/1 и 2/2, 1/2, 2/3; височных 2-го ряда 2/2, 2/3, 2/1, 1/2, 1/1 и 2/2 соответственно.

Нижнегубные, височные 1-го ряда, височные 2-го ряда с правой стороны щитки не имеют статистически значимых различий между особями с типичной окраской и меланистами. Различия височных щитков 2-го ряда с левой стороны имеют статистически значимые различия на уровне 0,05, результаты сравнения представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Некоторые особенности фоллидоза головы у обыкновенной медянки

Признак		Типичная окраска ($n = 9$)	Меланисты ($n = 6$)	t_{Φ} p
<i>Temp.</i> 2 ряд слева	$M \pm m$	1,4±0,18	2±0	2,55 < 0,05
	<i>Lim</i>	1-2	2-2	
	<i>CV (%)</i>	36,49	0,00	

Сравнение чешуй вокруг середины туловища, подхвостовых и брюшных щитков у особей с разной окраской не выявило статистически значимых отличий. Данные по этим щиткам представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Некоторые особенности фоллидоза туловища у обыкновенной медянки

Признак		Типичная окраска ($n = 10$)	Меланисты ($n = 6$)	t_{Φ} p
<i>Ventr.</i>	$M \pm m$	177±2,8	183±2,1	1,35 > 0,05
	<i>lim</i>	166-188	173-187	
	<i>CV (%)</i>	5,07	2,78	
<i>Scd.</i>	$M \pm m$	54±1,1	52±2,1	0,92 > 0,05
	<i>lim</i>	49-59	46-59	
	<i>CV (%)</i>	6,66	9,72	
<i>Sq.</i>	$M \pm m$	19±0,2	19±0,2	0,56 > 0,05
	<i>lim</i>	19-20	19-20	
	<i>CV (%)</i>	2,50	2,13	

Статистически значимых отличий по длине тела и длине хвоста у особей также не обнаружено, но выявлено отличие особей с разной окраской по отношению длины тела к длине хвоста. Однако данное отличие может быть связано с преобладанием в выборке меланистов самок, а критерий, отражающий пропорции тела, является половым диморфизмом у исследованных особей медянки обыкновенной. Данные линейных размеров отражены в таблице 3.

Таблица 3 – Линейные размеры обыкновенной медянки

Признак		Типичная окраска ($n = 10$)	Меланисты ($n = 6$)	t_{ϕ} p
<i>L.corp.</i>	$M \pm m$ (мм)	52±2,3	56±1,7	1,40 > 0,05
	<i>lim</i> (мм)	39-60	50-60	
	<i>CV</i> (%)	14,22	7,5	
<i>L.cd.</i> (мм)	$M \pm m$ (мм)	12±0,6	11±0,6	1,01 > 0,05
	<i>lim</i> (мм)	9,5-14,5	9-13	
	<i>CV</i> (%)	14,76	12,86	
<i>L.corp./L.cd.</i>	$M \pm m$	4,4±0,15	5,2±0,31	2,66 < 0,05
	<i>lim</i>	3,7-5,0	3,8-5,8	
	<i>CV</i> (%)	11,02	14,65	

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод о наличии незначительных морфологических различий между особями медянки со стандартной окраской и меланистами. Однако статистическая значимость этих признаков может объясняться другими факторами, а не особенностями окраски, а именно преобладанием самок в выборке меланистов. Так нельзя говорить и о стабильности фолидоза у медянок, исходя из данных по височным щиткам 2-го ряда слева, так как у меланистов имеются другие отклонения щиткования.

Библиографический список

1. Антонюк Э.В. К вопросу о северной границе распространения обыкновенной медянки *Coronella austriaca* Laurenti, 1768 в восточной части ее ареала // Вестник Тамбовского университета: серия Естественные и технические науки. – 2013. – Т. 18, №6. – С. 2972-2974.
2. Банников А.Г., Даревский И.С., Ищенко В.Г., Рустамов А.К., Щербак Н.Н. Определитель земноводных и пресмыкающихся фауны СССР. М.: Просвещение, 1977. 414 с.
3. Вершинин В. Л Амфибии и рептилии Урала. – Екатеринбург, 2007. – 227 с.
4. Кузьмин С.Л., Семенов Д.В. Конспект фауны земноводных и пресмыкающихся России. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2006. – 139 с.
5. Яблоков А.А., 1974. Меланизм. Большая Советская Энциклопедия (В 30 томах). Гл. ред. А.М. Прохоров. М.: Советская энциклопедия. Т. 16. Мёзия–Моршанск. С. 40.
6. Lorigou, S., Bonnet, X., Brischoux, F., De Crignis, M. Is melanism adaptive in sea kraits? // *Amphibia-Reptilia*. – 2008. – V. 29. – P. 1-5.

МЕЖПОРОДНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ГОСУДАРСТВЕННЫХ ВОЕНИЗИРОВАННЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ ПО УРОВНЮ ИНТЕЛЛЕКТА

Корнилова Е.А., Смирнов А.С.

*Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации, Пермь,
Россия*

Аннотация. Статья посвящена изучению межпородных различий служебных собак государственных военизированных организаций по уровню интеллекта. Отмечено отсутствие зависимости изучаемого параметра от пола животного, выявлена небольшая тенденция улучшения результатов с возрастом. Проанализирована межпородная и внутривидовая изменчивость служебных собак по уровню интеллекта.

Ключевые слова: служебные собаки, породы, тестирование, уровень интеллекта, изменчивость.

INTERBREED DIFFERENCES IN SERVICE DOGS OF STATE PARAMILITARY ORGANIZATIONS ACCORDING TO THE LEVEL OF INTELLIGENCE

Kornilova E. A., Smirnov A. S.

Perm Military Institute of the National Guard of the Russian Federation, Perm, Russia

Abstract. The article is devoted to the study of interbreed differences in service dogs of state paramilitary organizations in terms of intelligence. The absence of dependence of the studied parameter on the sex of the animal was noted, a slight tendency to improve the results with age was revealed. Analyzed interbreed and intrabreed variability of service dogs in terms of intelligence.

Keywords: service dogs, breeds, testing, intelligence level, variability.

Вопросы наличия и уровня интеллекта животных всегда привлекали внимание человека. Особенно такого вида, как собака (*Canis familiaris*), живущего рядом с нами более двенадцати тысяч лет. На сегодняшний день существует огромное множество определений термина «интеллект», а в особенности «интеллект животных». Рассмотрим некоторые из них.

Интеллект, как высшая стадия развития психики, представлена и у животных, однако максимального развития достигает у человека и является совокупностью всех познавательных функций индивида [1, 2]. Интеллектуальное поведение тесным образом связано с различными формами врожденного поведения и научения и складывается из индивидуально изменчивых компонентов поведения [3]. В сравнительной физиологии и психологии принято определение интеллекта животных, как высшей формы психологической деятельности, связанной с решением нестандартных задач с помощью орудийного действия, опираясь на предшествующий опыт [4]. Отметим, что интеллектом собак может быть названа способность обращаться к прошлому опыту и использование его в целях адаптации к новой ситуации [5]. По мнению Л.В. Крушинского, уникальная особенность рассудочной (интеллектуальной)

деятельности заключается в том, что животное сразу, без специального обучения, может принять правильное решение [6].

Некоторые исследователи утверждают, что интеллект у собак бывает двух основных типов [7]. Первый тип – «инстинктивный» интеллект. Отвечающий за природные способности, присущие данной породе или группе пород собак (например, собаки – пастухи (бордер колли) или охотники, которые, в свою очередь могут быть норными (фокстерьер), легавыми (пойнтер) и т.д.). Второй тип – «адаптивный». Он отвечает за способность собаки к обучению и включает в себя: послушание, готовность к выполнению команды, скорость обучения командам, способность проявлять внимание к деталям в поведении человека.

Таким образом, интеллект представляет собой взаимодействие нескольких параметров, таких как скорость обучения, память, внимание, способность к решению задач и многих других, соответственно, оценка этих факторов важна для определения способностей животного и возможности его использования. Разница при работе с собаками разных пород заключается в той степени сложности или легкости, с которой может быть достигнут определенный уровень подготовки собаки конкретной породы, и в том, каков абсолютный максимум подготовки. Отметим, что, даже внутри одной породы, интеллект особей может достаточно широко варьировать. Помимо собак-компаньонов, непосредственно контактирующих с людьми, существуют служебные собаки государственных военизированных организаций, призванные выполнять поставленные перед ними сложные задачи.

Наше исследование направлено на определение уровня интеллекта служебных собак государственных военизированных организаций, выявление межпородных и внутривидовых различий.

Объектом нашего исследования послужила собака домашняя (*Canis familiaris*), предметом – уровень интеллектуальных способностей животного. Всего исследовано 40 собак, относящихся к шести породам (табл. 1), из них 17 кобелей и 23 суки. В исследовании участвовали особи, относящиеся к четырем возрастным группам: подростки (животные до года) (n=2), молодые (от года до двух лет) (n=6), взрослые (от двух до шести лет) (n=27) и старше шести лет (n=5). Собаки принадлежат государственным военизированным организациям (Центр кинологической службы МВД и батальон охраны и конвоирования).

Таблица 1 – Объем исследованного материала

Породы собак	Всего особей	Общий розыск	Конвойные	Трупорозыскная	Нарко-розыскная	Минно-розыскная	Караульная
Немецкая овчарка	15	6	7	1		1	
Бельгийская овчарка (малинуа)	13	6	2	1	2	2	
Лабрадор	4				2	2	
Ротвейлер	5		5				
Кавказская овчарка	1						1
Среднеазиатская овчарка	2						2
Общее количество исследованных собак	40	12	14	2	4	5	3

Существуют разнообразные методы и способы оценивания «адаптивного» интеллекта животных, в частности собак [1, 2, 8, 9]. Одна из систем игровых тестовых заданий была

разработана профессором психологии Университета Британской Колумбии Стэнли Кореном, автором книги «Интеллект собак» [10]. Тесты на уровень интеллекта представляют собой стандартизированный метод, созданный для измерения уровня интеллекта как величины, не зависящей от приобретенных знаний и опыта.

В своей работе мы использовали следующие тесты [11]:

Тест 1. На решение задачи: лакомство под пустой банкой (рис. 1).

Тест 2. На решение задачи: ткань на голове собаки.

Тест 3. На способность распознать эмоции человека (рис. 2).

Тест 4. На решение задачи: лакомство под полотенцем (рис. 3).

Тест 5. На проверку кратковременной памяти.

Тест 6. На проверку долговременной памяти (рис. 4).

Тест 7. На решение задачи и способность манипулировать предметами (рис. 5).

Тест 8. На понимание речи.

Тест 9. Решение задачи на экстраполяцию (рис. 6).

В комплексе, все эти составляющие и стали показателем уровня интеллекта собак. Действия оценивались по времени прохождения каждого теста, что соответствовало определенным баллам. Возможный максимум – 45 баллов.

Для любого исследования первоочередной задачей является нахождение зависимости изучаемого параметра от пола и возраста животного.



Рисунок 1 – Немецкая овчарка выполняет тест №1.



Рисунок 2 – Лабрадор выполняет тест №3.



Рисунок 3 – Кавказская овчарка выполняет тест №4.

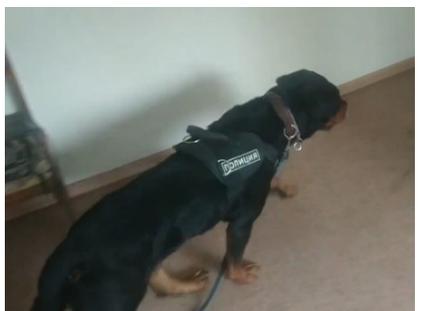


Рисунок 4 – Ротвейлер выполняет тест №6.



Рисунок 5 – Бельгийская овчарка (малинуа) выполняет тест №7.



Рисунок 6 – Бельгийская овчарка (малинуа) выполняет тест №9.

Среднее значение показателя среди кобелей составило $32,3 \pm 1,97$ баллов ($n=16$), среди сук $32,8 \pm 0,85$ баллов ($n=23$), достоверная разница не выявлена ($t_d=0,23$ при $p=0,05$), что позволяет проводить дальнейшее исследование без учета пола животного. Сравнение собак

четырёх возрастных групп по уровню интеллекта не показало достоверной разницы между молодыми (от года до двух лет) ($n=6$) и взрослыми (от двух до шести лет) ($n=27$) особями, что позволило объединить данные группы. Значения средних арифметических и их ошибок распределились следующим образом: $18,0 \pm 1,00$ балла у подростков до года, которые были представлены среднеазиатскими овчарками, $32,2 \pm 0,92$ балла у собак от года до шести лет и $35,8 \pm 1,32$ баллов у особей старше шести лет. Прослеживается небольшая тенденция улучшения результатов с возрастом. Анализ межпородной изменчивости, представленный на рисунке 7, демонстрирует достаточно высокие результаты для четырех пород. Кавказская и среднеазиатские овчарки были менее успешны при прохождении тестирования.

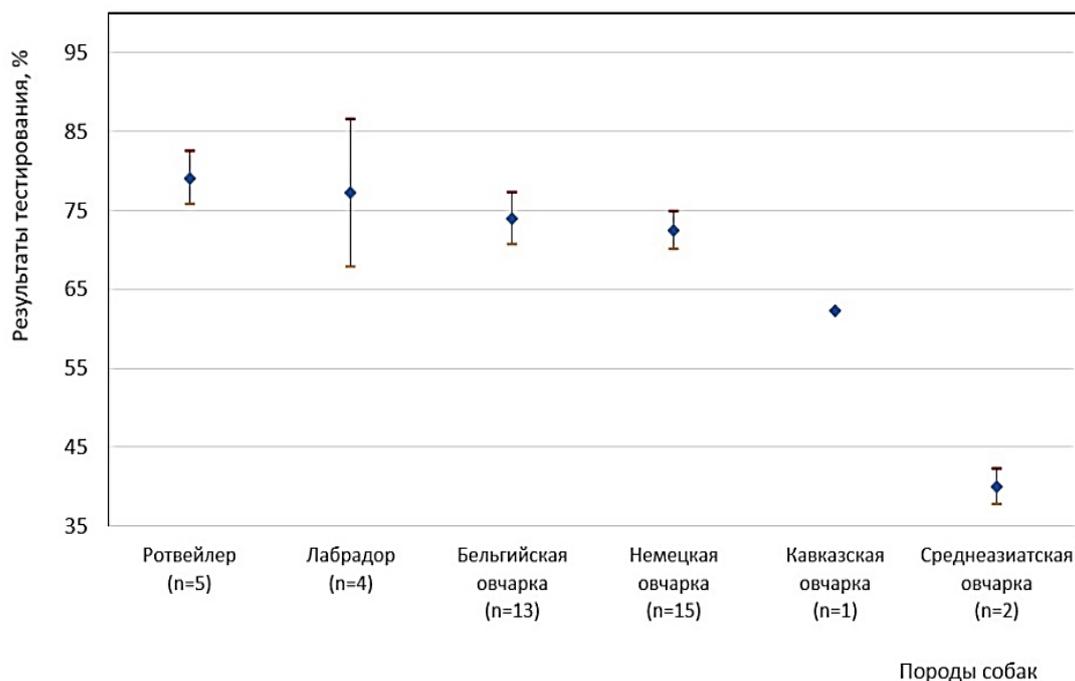


Рисунок 7 – Межпородное сравнение значений среднего арифметического с интервалами их ошибок по уровню интеллекта собак, %

При сравнении собак разных категорий предназначения по уровню интеллекта ($M \pm m$) мы выявили (рис. 8), что караульные собаки показывают достоверно более низкие результаты по итогам тестирования, чем собаки, относящиеся к другим категориям. Лучшие результаты продемонстрировали нарко-розыскные, их результат составил 89% от максимально возможного результата.

Несомненно, то, что выборочные совокупности, представленные малым количеством особей, не дают объективной оценки, мы можем говорить только о некой тенденции полученных результатов у исследуемых собак.

Дальнейшее ранжирование по итогам тестирования уровня интеллекта исследованных собак, позволило выделить пять достоверно отличающихся групп, которые получили, в зависимости от набранных баллов, следующие названия: 1) «Превосходный интеллект» (успешность выполненных заданий составила $91,9 \pm 2,0$ % от максимально возможного результата), 2) «Интеллект выше среднего» ($78,1 \pm 0,9$ %), 3) «Средние умственные способности» ($68,7 \pm 0,6$ %), 4) «Интеллект ниже среднего» ($62,7 \pm 0,8$ %) и 5) «Интеллект оставляет желать лучшего» ($48,4 \pm 3,3$ %). Большинство собак относятся ко второй и третьей группам (рис. 9).

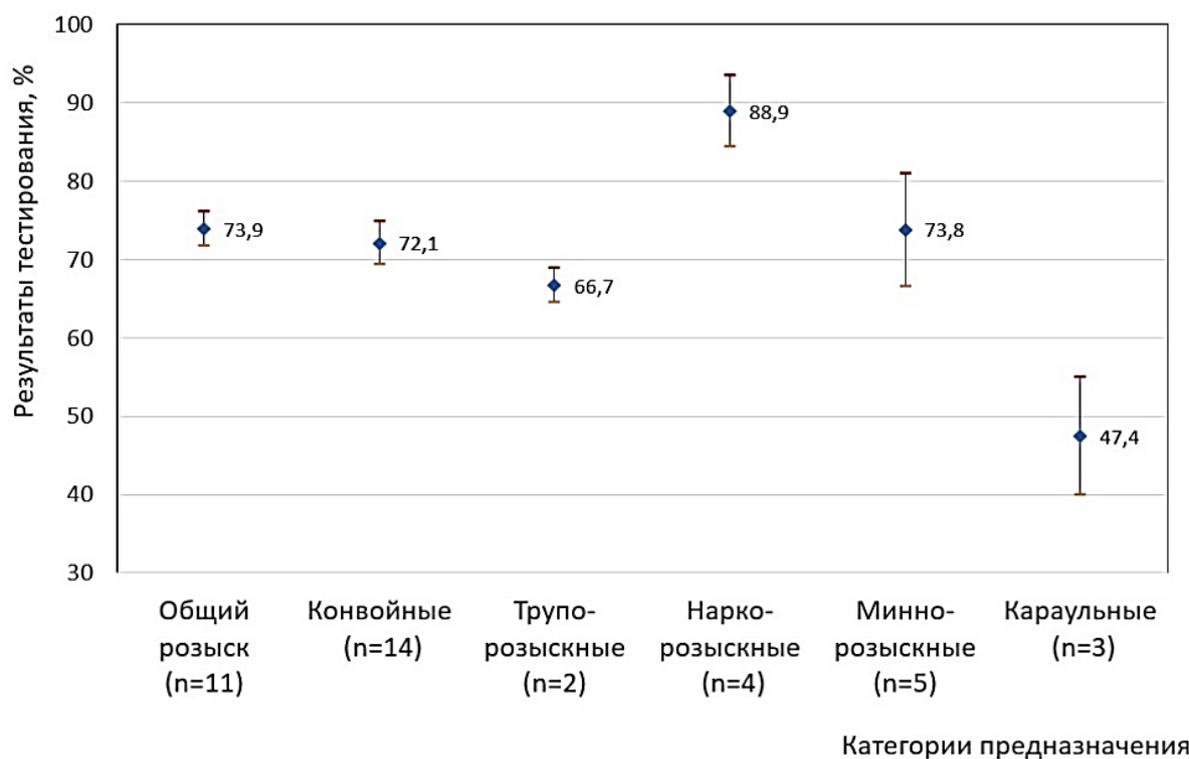


Рисунок 8 – Сравнение собак разных категорий предназначения по результатам тестирования, %

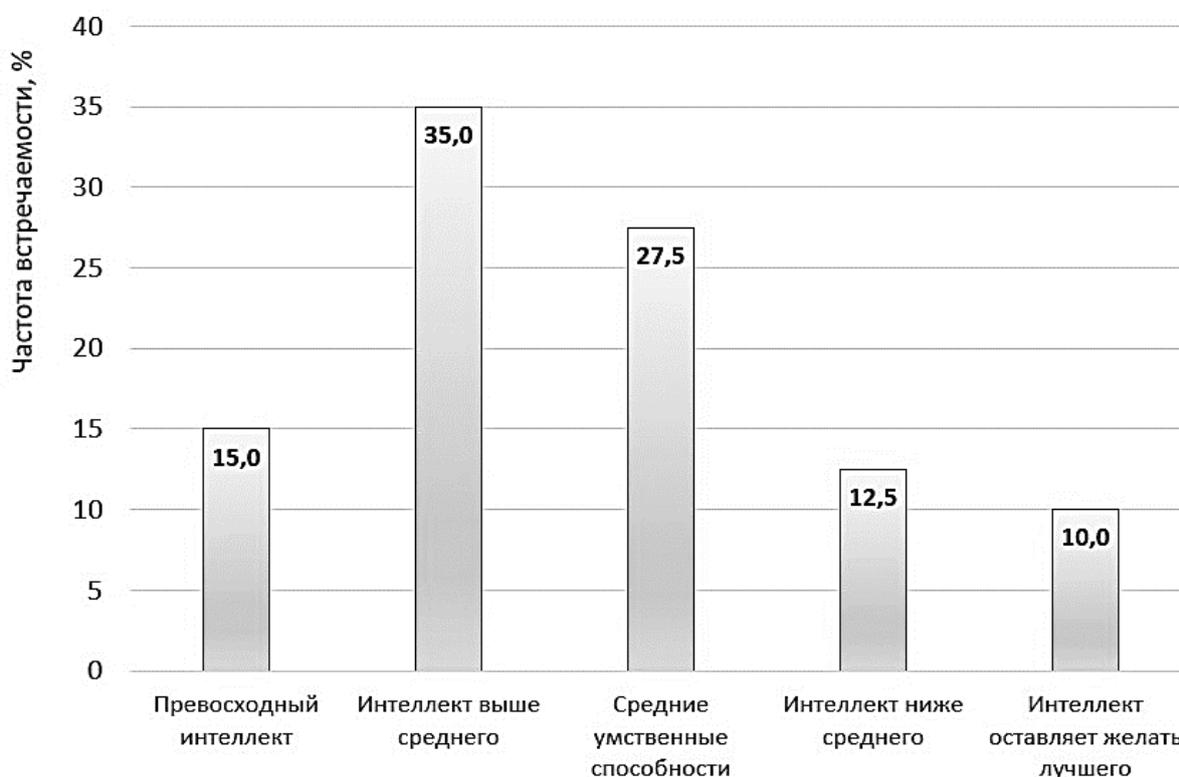


Рисунок 9 – Частота встречаемости собак каждой из выделенных групп, %

На следующей диаграмме продемонстрировано ранжирование среди собак разных пород по уровню интеллекта с учетом относительной численности каждой выборочной совокупности (рис. 10).

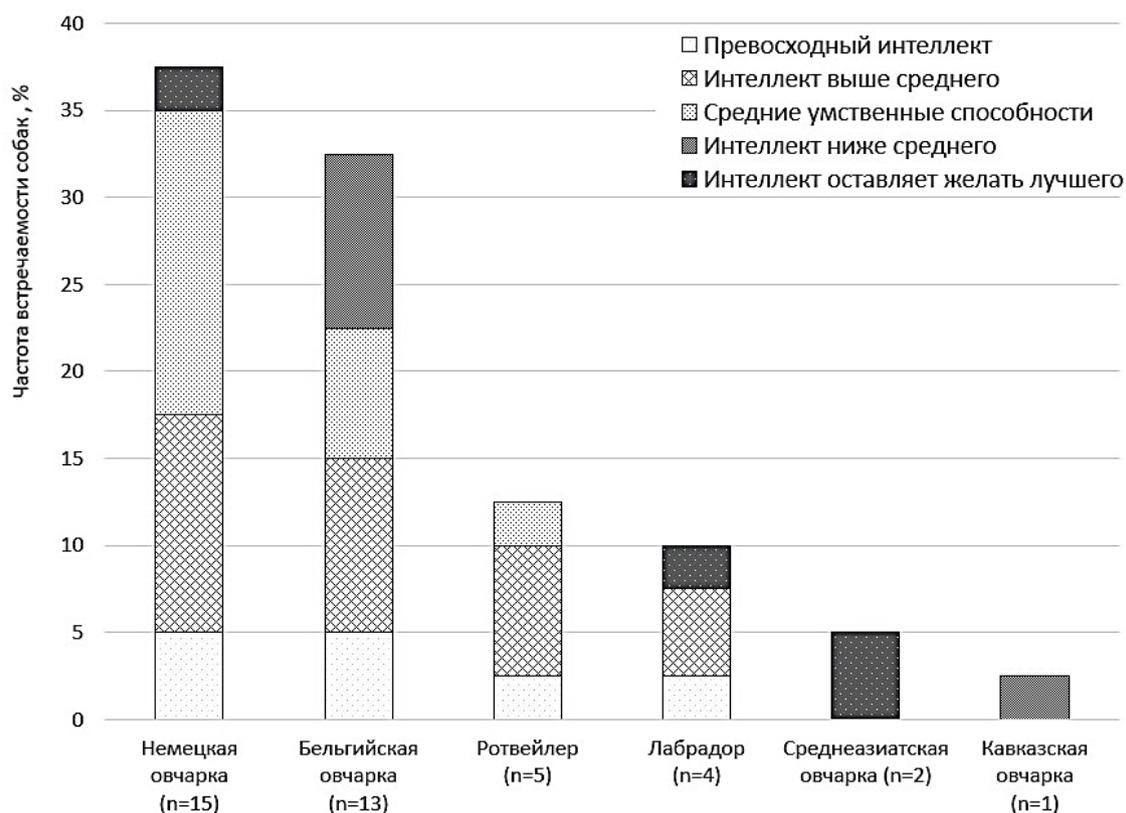


Рисунок 10 – Ранжирование среди собак разных пород по уровню интеллекта, %

Подводя итог, мы можем сказать, что более низкие результаты тестирования кавказских и среднеазиатских овчарок связаны с тем, что у них преобладает «инстинктивный» интеллект, отвечающий за природные особенности (охранные и сторожевые качества). Использование представителей этих пород, как караульных собак максимально раскрывает их возможности.

У бельгийских овчарок (малинуа), немецких овчарок, лабрадоров и ротвейлеров преобладает «адаптивный» интеллект, что доказывают высокие результаты тестирования. Данные породы выведены для тесного взаимодействия с человеком.

Внутрипородная вариабельность уровня интеллекта еще раз подтверждает наличие внутрипопуляционной изменчивости, которая дает возможность применения таких селекционных мероприятий, как отбор и подбор с целью сохранения и улучшения существующих пород собак.

Библиографический список

1. Зорина З.А., Полетаева И.И. Элементарное мышление животных. – М.: Аспект Пресс, 2001. – 320 с.
2. Зорина З.А., Полетаева И.И., Резникова Ж.И. Основы этологии и генетики поведения. – М.: Изд-во МГУ, Высшая школа, 2002. – 383 с.
3. Мычко Е.Н., Сотская М.Н., Беленький В.А., Журавлев Ю.В. и др. Поведение собаки. – М.: ООО Аквариум-Принт, 2005. – 400 с.
4. Ожегов С.И. Словарь русского языка. – М.: ООО Оникс, ООО Мир и образование, 2007. – 1328 с.

5. Фогл Б. О чем думает собака. – М.: ООО «Изд-во АСТ»: ООО «Изд-во Астрель», 2004. – 255 с.
6. Крушинский Л. В. Биологические основы рассудочной деятельности. Эволюционный и физиолого-генетический аспекты поведения. – М.: Едиториал УРСС, 2018. – 272 с.
7. Eckstein W. How smart is your dog? Give him an IQ test // Source: TODAY. March 4, 2005. URL: <https://www.today.com/style/how-smart-your-dog-give-him-iq-test-2D80555204>
8. Мак-Фарленд Д. Поведение животных: Психобиология, этология и эволюция. – М.: Мир, 1988. – 520 с.
9. Резникова Ж.И. Интеллект и язык: Животные и человек в зеркале экспериментов. Ч. I. – М.: Наука, 2000. – 279 с.
10. Coren, S. The Intelligence of Dogs: A Guide to The Thoughts, Emotions, And Inner Lives of Our Canine Companions. – New York: Bantam Books, 1995. – ISBN 0-553-37452-4
11. Корен С. Интеллект собак. Пер. В.В. Гриценко // Кот и пес. 1996.

ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ Р. УРАЛ В ПРЕДЕЛАХ ОРЕНБУРГСКОГО ЗАПОВЕДНИКА (АЙТУАРСКАЯ СТЕПЬ) ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ

Крайнева Т.С., Паньков Н.Н.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

Аннотация. Произведена оценка качества воды р. Урал в пределах Оренбургского заповедника (Айтуарская степь), по биологическим показателям. В составе зообентоса этого водотока выявлено 70 видов и форм. Согласно индексам Вудивисса, Гуднайта и Уитли, Кинга и Болла, воды р. Урал, в основном, отвечают категории «чистая». Исключение составляет прибрежная полоса, являющаяся областью аккумуляции детрита. В пределах этой полосы воды р. Урал характеризуются как умеренно или сильнозагрязнённые.

Ключевые слова: Качество воды, беспозвоночные, р. Урал, Оренбургский заповедник, Айтуарская степь.

ASSESSMENT OF THE WATER QUALITY OF THE URAL RIVER WITHIN THE ORENBURG RESERVE (AITUARSKAYA STEPPE) BY BIOLOGICAL INDICATORS

Kraïneva T.S., Pankov N.N.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Perm State National Research University», Perm, Russia

Annotation. The assessment of the water quality of the Ural River within the Orenburg Reserve (Aituarskaya steppe), according to biological indicators. 70 species and forms have been identified as part of the zoobenthos of this watercourse. According to the indices of Woodiwiss, Goodnight and Whitley, King and Ball, the waters of the Ural River mainly meet the category of "clean". The exception is the coastal strip, which is an area of accumulation of detritus. Within this band, the waters of the Ural River are characterized as moderately or heavily polluted.

Keywords: Water quality, invertebrates, Ural River, Orenburg Nature Reserve, Aituar steppe.

Государственный природный заповедник «Оренбургский» был образован 12 мая 1989 года в целях сохранения и восстановления степных ландшафтов Заволжья, Предуралья, Южного Урала и Зауралья [1]. Одной из его частей является Айтуарская степь. Эта территория расположена в левобережье реки Урал, близ посёлка Айтуарка Кувандыкского муниципального района.

Урал – один из крупнейших водотоков Европы. Его длина составляет 2428 километров, площадь бассейна – 231000 км² [2]. Хозяйственное значение Урала исключительно велико и многогранно. Эта река используется в целях водоснабжения промышленных объектов и населённых пунктов, промыслового и любительского рыболовства, орошения

сельскохозяйственных угодий [3]. Урал протекает по густонаселенной территории, отличающейся развитой промышленностью, сельским хозяйством и транспортной сетью [3]. В связи с этим, гидрологический режим данной реки существенно изменен, а водотоки его бассейна испытывают интенсивное и разнокачественное загрязнение [4,5]. Несмотря на эти факты, Урал относится к числу водных объектов, гидробиологическая изученность которых явно недостаточна. В связи с вышесказанным, оценка качества воды р. Урал как водотока, имеющего большое экономическое и социальное значение, представляется актуальной задачей.

Опыт европейских стран в области мониторинга качества окружающей среды и управления водными ресурсами свидетельствует о широком использовании биологических показателей при интегральной оценке состояния водных экосистем. Дело в том, что оценка качества воды по результатам гидрохимических исследований не всегда достоверно отражает уровень техногенной нагрузки. К тому же, использование биоиндикации не требует дорогостоящего оборудования и характеризуется невысокими затратами на исследования. Наиболее популярными являются биотические индексы, основанные на структурных характеристиках макрозообентоса, как наиболее удобные в применении и адекватные решаемым задачам [6].

Настоящее сообщение основано на результатах обработки 20 количественных проб зообентоса, отобранных Т.С. Крайневой в июле 2017 г. Материал отбирался на территории ФГБУ «Государственный природный заповедник Оренбургский» в пределах участка «Айтуарская степь» (окрестности посёлка Айтуар). Исследованиями были охвачены русло р. Урал, а также водоёмы его поймы (старицы и озёра).

В качестве биологических показателей качества воды рассчитывались индексы Ф.С. Вудивисса [7], С. Дж. Гуднайта и Л.С. Уитли [8], Д.И. Кинга и Р.С. Болла [9].

В составе зообентоса р. Урал и водоёмов его поймы в пределах Оренбургского заповедника (Айтуарская степь) выявлено 70 видов и форм донных животных.

Наиболее разнообразно представлены подёнки и личинки комаров-звонцов (13 и 12 видов и форм соответственно). Богаты видами ручейники (10) и веснянки (7). Среди других беспозвоночных зарегистрированы двустворчатые (6) и брюхоногие моллюски (5), малощетинковые черви (5), прочие двукрылые (4), пиявки, ракообразные и стрекозы (по 2), а также клопы и жуки (по одному виду).

На песчано-гравийно-галечных грунтах формируется сообщество, в котором доминируют подёнки *Ephoron virgo*. Им сопутствуют личинки хирономид. Биомасса сообщества изменяется в пределах 29.32...31.68 г/м² при численности 18.1...32.44 тыс. экз/м². В прибрежной полосе русла формируется пелофильный зообентоценоз, основу численности и биомассы которого составляют малощетинковые черви *Limnodrilus hoffmeisteri*. Им сопутствуют моллюски *Stagnicola palustris* и мизиды *P. lacustris*. Биомасса сообщества составляет 13.68 г/м² при численности 15.45 тыс. экз/м². В пойменных водоёмах формируются пелофильные зообентоценозы, биомасса которых изменяется в пределах 19.2...34.24 г/м² при численности 5.64...30.04 тыс. экз/м². Основу численности составляют личинки комаров-звонцов. Биомасса складывается за счёт стрекоз *Libellula sp.*, хирономид и моллюсков *Bithynia tentaculata*.

Биотический индекс Вудивисса широко используется для определения качества воды в ручьях и реках по структурным характеристикам зообентоса. Он учитывает таксономическое разнообразие населяющих водоток донных животных и наличие в нём организмов,

принадлежащих к той или иной индикаторной группе. Он основан на том известном явлении, что, по мере роста уровня загрязнения, из состава донной фауны последовательно выпадают организмы – сначала наиболее чувствительные (веснянки, подёнки, ручейники), затем ракообразные, пиявки и моллюски. При сильном загрязнении в составе зообентоса сохраняются только малощетинковые черви-трубочники (семейство *Tubificidae*) и личинки комаров-звонцов рода *Chironomus* (мотыль). При очень сильном загрязнении индекс Вудивисса равен нулю. Для категории грязных вод величина индекса равна единице, загрязнённых – двум. Умеренно загрязнённые воды имеют индекс, равный трём-четырёх, чистые – пять-семь, очень чистые – от восьми и более.

Индекс Вудивисса для русла р. Урал изменялся от 6 (рипаль плёсов с песчано-гравийно-галечными грунтами) до 7 (медаль плёсов и перекаты), что соответствует классу качества вод «чистая». В прибрежной полосе русла, где наблюдается скопление серых илов с примесью грубого растительного детрита, индекс Вудивисса оказался равным 4, что говорит об умеренном органическом загрязнении вод данной акватории.

Ещё одним распространённым показателем качества воды является индекс Гуднайта-Уитли, отражающий долю малощетинковых червей в общей численности зообентоса. Чем больше значение индекса, тем выше степень загрязнения водного объекта. Известно, что чем сильнее водоём загрязнён органическими веществами, тем интенсивнее развиваются в нём малощетинковые черви *Tubificidae* (трубочники), толерантные к дефициту кислорода.

Основным недостатком индекса является его пренебрежение к особенностям таксономического состава олигохетофауны, из-за чего он может давать искажённые результаты. Так, среди малощетинковых червей могут присутствовать не только трубочники, но и представители семейства *Naididae*, остро реагирующие на органические загрязнения [10]. Считается, что, если доля олигохет в численности донной фауны не превышает 60%, река находится в хорошем состоянии. Если численность олигохет находится в пределах 60-80% – состояние реки сомнительное, свыше 80% – река испытывает тяжёлое загрязнение.

Индекс Гуднайта-Уитли на перекатах и плёсах р. Урал изменялся от 2,0 до 25,4%, что свидетельствует о хорошем экологическом состоянии водотока. В прибрежной полосе этот индекс составил 95,5%, что указывает на тяжёлое органическое загрязнение.

Индекс Кинга и Болла представляет собой отношение веса насекомых к весу олигохет. В его основу положена высокая чувствительность многих насекомых к присутствию загрязняющих веществ и толерантность к ним малощетинковых червей (трубочников). Недостаток индекса состоит в том, что среди насекомых, как и олигохет, присутствуют беспозвоночные с очень разными требованиями к качеству воды. Такие отряды амфибиотических насекомых, как подёнки, ручейники, стрекозы и, особенно, веснянки являются индикаторами чистых вод, тогда как некоторые хирономиды (мотыль) выдерживают сильное органическое загрязнение, мало уступая в этом даже трубочнику.

При загрязнении водоёма индекс Кинга и Болла равен нулю или меньше единицы.

Индекс Кинга и Болла на плёсах и перекатах изменялся от 10 до 18, что позволяет отнести воды р. Урал к категории чистых. В прибрежной же полосе его величина не превышала 0,1, что указывает на присутствие здесь органических загрязнений.

Таким образом, воды р. Урал в пределах Оренбургского заповедника (Айтуарская степь), в основном, отвечают категории «чистая». Исключение составляет узкая прибрежная полоса, являющаяся областью аккумуляции органического детрита. В пределах этой полосы воды р. Урал характеризуются как умеренно или сильнозагрязнённые.

Библиографический список

1. Чибилёв А.А. Природное наследие Оренбургской области. Оренбургское книжное издательство, 1996. 197 с.
2. Чибилёв А.А. Река Урал. Историко-географические и экологические очерки. Л.: Гидрометеиздат, 1987. 168 с.
3. Чибилёв А. А. Бассейн Урала: история, география, экология. Екатеринбург: УрО РАН, 2008. 312 с.
4. Гареев А.М., Фатхутдинова Р.Ш. Гидролого-экологическая характеристика бассейна реки Урал (в пределах Российской Федерации) // Чистая вода России: Сборник материалов XIII Международного научно-практического симпозиума и выставки. 2015. С. 76-82.
5. Филинова Е.И. Макрозообентос верхнего и среднего течения р. Урал и притоков на участках, подверженных хроническому антропогенному загрязнению // Биоиндикация в мониторинге пресноводных экосистем III: Материалы международной конференции. СПб.: Своё издательство, 2017. С. 340–342.
6. Андрианова А.В. Биотические индексы и метрики в оценке качества воды малых рек на территории природного парка «Ергаки» (юг Красноярского края) // Сибирский экологический журнал. 2015. № 3. С. 439–451.
7. Woodiwiss F.S. The biological system of stream classification used by the Trent River Authority // Chemistry and Industry, 1964. P. 443-447.
8. Goodnight C.J., Whitley L.S. Oligochaetes as indicators of pollution // Proc. 15th Ind. Waste Conf., Purdue Univ. Ext. Sec? 1961. V. 106. P. 139-142.
9. King D.I., Ball R.S. A quantitative biological measure stream pollution // J. Water Pollution Control Federation, 1964. V. 36. № 5. P. 650-653.
10. Балущкина Е.В., Финогенова Н.П. Структурные характеристики зообентоса как основа оценки состояния экосистем Невской губы и восточной части Финского залива // Структурно-функциональная организация пресноводных экосистем разного типа. Труды ЗИН РАН. Т. 279. СПб: Наука, 1999. С. 269–292.

ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА ПРИ КОРМЛЕНИИ ПОЛНОРАЦИОННЫМ СУХИМ КОРМОМ

Крылова И.О., Лапай М.И.

Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации, Пермь, Россия

Аннотация. В статье освещены результаты исследования кишечного микробиома служебных собак породы немецкая овчарка при кормлении полнораационным сухим кормом. Качественный анализ макронутриентного состава корма выявил большую долю белков растительного происхождения, высокую степень калорийности за счет дисбаланса в содержании жиров и углеводов. Комплексный анализ микробиома кишечника взрослого поголовья показал, что биоразнообразие бактериальных изолятов представлено нормальной и условно-патогенной микрофлорой. Микробиологический анализ выявил нарастающий дисбактериоз с увеличением доли условно-патогенной микрофлоры на втором и третьем этапе исследования.

Ключевые слова: микробиом кишечника; служебные собаки породы немецкая овчарка; полнораационный сухой корм; здоровьесбережение собак.

ASSESSMENT OF THE STATE OF THE INTESTINAL MICROBIOME OF SERVICE DOGS OF THE GERMAN SHEPHERD BREED WHEN FEEDING WITH FULL-FLEDGED DRY FOOD

Krylova I. O., Lapai M. I.

Perm Military Institute of the National Guard of the Russian Federation, Perm, Russia

Abstract: The article highlights the results of the study of the intestinal microbiome of service dogs of the German Shepherd breed when feeding with full-fledged dry food. Qualitative analysis of the micronutrient composition of the feed revealed a large proportion of vegetable proteins, a high degree of caloric content due to an imbalance in the content of fats and carbohydrates. A comprehensive analysis of the intestinal microbiome of adult livestock has shown that the biodiversity of bacterial isolates is represented by normal and conditionally pathogenic microflora. Microbiological analysis revealed an increasing dysbiosis with an increase in the proportion of opportunistic microflora at the second and third stages of the study.

Keywords: gut microbiome; service dogs of the German Shepherd breed; complete dry food; health care of dogs.

Организация кормления служебных собак регламентируется внутренними нормативными документами войск и отражает вопросы, как натурального кормления, так и

использования сухих кормов калорийностью не менее 370 килокалорий на 100 граммов полнорационного корма [1]. Вместе с тем, практически во всех подразделениях войск доля кормления сухими кормами служебных собак существенно преобладает. Сухие корма удобны в своем применении, особенно в отрыве от мест постоянной дислокации, но последствия перманентного скармливания их животным, качественный состав корма, спонтанный, не обоснованный перевод с одного вида корма на другой, зачастую приводит к разбалансировке функционального состояния животного [2].

Исходя из этого, целью исследования явилось: изучить функциональное состояние кишечного микробиома служебных собак породы немецкая овчарка при кормлении полнорационным сухим кормом.

Объект исследования: взрослые собаки породы немецкая овчарка (10 голов).

Организация и методика исследования: проведено комплексное динамическое исследование кишечной микробиоты (в три этапа) общепринятыми методами согласно Методическим рекомендациям [3, 4]. Часть анализов на выделение и идентификацию бактерий желудочно-кишечного тракта проводилась в лаборатории ГБУВК «Пермский ветеринарный диагностический центр». В период исследования служебные собаки находились на кормлении полнорационным сухим кормом Black Dog. Анализ питательности корма проводился общепринятыми методами [5].

Исследование проведено в рамках научно-исследовательской работы кафедры биологии факультета (кинологического), по заявке ЦА ВНГ РФ.

Результаты исследования.

Анализ качественного состава полнорационного сухого корма для взрослых собак Black Dog показал, что первые пять основных ингредиентов корма составляют: дегидратированное мясо птицы (белковый концентрат, неизвестного видового происхождения); злаки – на втором месте (поставщик растительного белка неизвестного происхождения с низким процентом усвоения); куриный жир (источник незаменимых Омега-6 жирных кислот); масло лосося (источник Омега-3 жирных кислот – без отражения на упаковке их содержания и соотношения); масло растительное. Содержание белков находилось на уровне 26,0-30,0%, при минимально-допустимом количестве 18,0% [6]. Количество жиров при минимальной границе 5,5% находилось в диапазоне от 16,0 до 21,0% [6]. Содержание углеводов – низкое (30,9-39,2%), при рекомендуемом – 45,0-50,0% [6]. Энерго-протеиновое соотношение не соответствует нормативным показателям. Таким образом, Black Dog – сухой корм с высокой степенью калорийности за счет дисбаланса в количестве и энергетической емкости жиров и углеводов, с большой долей белков растительного происхождения.

Комплексный динамический анализ полостной кишечной микробиоты анализируемой выборки на первом этапе исследования выявил: нормофлора в 100% случаев имела в своем составе типичных представителей энтеробактерий рода *Escherichia* (*E. coli*), споровых анаэробов, лактобактерий рода *Lactobacillus* и бифидобактерий рода *Bifidobacterium*.

Условно-патогенная микробиота была представлена в 50% случаев грамположительными бактериями рода *Enterococcus* (*E. faecalis*), доля условно-патогенных микроорганизмов составила 12,5% по отношению к нормофлоре. Известно, что бактерии рода *Enterococcus* – бактерии облигатной части нормофлоры [7] – относятся к 17 группе «Грамположительные кокки» по классификации определителя Берджи [8]. Энтерококки являются факультативными анаэробами, грамположительны, высокорезистентны к различным факторам внешней среды и дезинфицирующим средствам. С одной стороны бактерии рода *Enterococcus* обеспечивают колонизационную резистентность слизистой

оболочки желудочно-кишечного тракта животных и человека, с другой стороны, являются возбудителями инфекций мочевыводящих путей, раневых инфекций, способны вызывать гнойно-воспалительные процессы различной локализации, протекающие обычно вяло, хронически. Энтерококки способны активно приспосабливаться к различным неблагоприятным факторам, устойчивы к низким значениям pH среды, передаются горизонтально через руки, поверхности, инвентарь [7].

Второй этап динамического исследования выявил снижение доли споровых анаэробов и типичной кишечной палочки в два раза, содержание бифидо- и лактобактерий осталось на прежнем уровне. В 50% случаев пробы были контаминированы условно-патогенными бактериями семейства *Enterococcaceae*, род *Enterococcus* (*E. faecalis*) и в 50% случаев бактериями семейства *Enterobacteriaceae* (род *Escherichia*; *E. coli*). Особо необходимо отметить выделение в третьем разведении в 50% случаев представителей эпидермального стафилококка – бактерий семейства *Staphylococcaceae* (род *Staphylococcus*, *St. epidermidis*). Эпидермальный стафилококк относится к 4 группе патогенности, в меньшей степени вызывает патогенные процессы у животных, но также может в условиях иммунодефицита стать причиной возникновения воспалительных процессов [9].

На втором этапе исследования доля условно-патогенных микроорганизмов составила 66,6% по отношению к нормофлоре.

Третий этап характеризовался наращиванием качественного разнообразия нормофлоры: в 66,6% случаев были представлены споровые анаэробы, 100% проб обсеменены бифидо- и лактобактериями, в 66,6% проб выделены клетки фекального энтерококка (род *Enterococcus*: *E. faecalis*).

Условно-патогенные микроорганизмы были представлены в 66,6% исследуемых проб: кишечная палочка; в 33,3% проб лактазонегативная кишечная палочка. Доля эпидермального стафилококка, фекального энтерококка, споровых анаэробов составила по 33,3% проб в анализируемой выборке. Таким образом, доля условно-патогенных микроорганизмов к третьему этапу исследования увеличилась и составила 69,96% по отношению к нормофлоре.

Патогенных микроорганизмов на всех этапах исследования изолировано не было.

Анализ функционального состояния проводился на основании данных методических рекомендаций по классификации дисбиозных состояний [4]: дисбактериоз 1, 2, 3 степени, фазы (латентная, клиническая), стадии (компенсированная, субкомпенсированная, декомпенсированная). По степени тяжести дисбактериоза в зависимости от характера изменений просветной микрофлоры толстого кишечника различают три степени дисбактериоза [4]:

- *первая степень дисбактериоза* характеризуется снижением количества бифидобактерий, лактобактерий или и тех, и других вместе на 1-2 порядка. Возможно снижение или повышение содержания кишечных палочек с появлением небольших титров их измененных форм;

- *вторая степень дисбактериоза* определяется при наличии одного вида условно-патогенных микроорганизмов в концентрации не выше 10^5 КОЕ/г или обнаружении ассоциаций условно-патогенных бактерий в небольших титрах. Для этой степени характерны высокие титры лактозоотрицательных кишечных палочек или *Escherichia coli* с измененными ферментативными свойствами (не способных гидролизовать лактозу);

- *третья степень дисбактериоза* регистрируется при выявлении в анализе условно-патогенных микроорганизмов в высоких титрах как одного вида, так и в ассоциациях.

Таким образом, в результате исследования было показано, что доля условно-патогенной микрофлоры на втором этапе возросла в 5,3 раза по сравнению с первым этапом, в то время как к третьему этапу, тенденция хоть и осталась прежней, контаминация микробиома условно-патогенной микрофлорой значительно снизилась, что может свидетельствовать о постепенной адаптации кишечного микробиома к полнорационному сухому корму. Состояние микробиома кишечника взрослых особей служебных собак породы немецкая овчарка на заключительном этапе исследования может характеризоваться как – первая степень дисбиоза, латентная, компенсированная. Комплексный анализ кишечной микробиоты отражает устойчивое положение нормобиоты взрослых особей анализируемого поголовья, формирующей колонизационную резистентность организма собаки и ее функциональную устойчивость.

Для поддержания и улучшения микрофлоры кишечника собак служебных пород рекомендовано применять комплексный подход: восстановление состава и функциональной активности нормальной микрофлоры проводить используя мероприятия по дегельминтизации; использовать про- и пребиотики, особенно после антибиотикотерапии; применять кормовые добавки и иммуномодуляторы; использовать полнорационные корма, базирующиеся на комплексном анализе состава сухих кормов; осуществлять мониторинг физикальных показателей собак; проводить периодический динамический срез для оценки состояния кишечного микробиома.

Библиографический список

1. Приказ Федеральной службы войск национальной гвардии РФ от 19 октября 2020 г. № 416. «Об утверждении Порядка и Норм обеспечения кормами (продуктами) и подстилочными материалами штатных животных войск национальной гвардии Российской Федерации, а также Норм замены одних кормов (продуктов) другими и Нормы замены одних подстилочных материалов другими при обеспечении штатных животных войск национальной гвардии Российской Федерации».
2. Крылова И.О., Садыкова Ю.Р. Оценка состояния кишечного микробиома служебных собак по индексу колонизационной резистентности. Проблемы медицинской микологии. 2021, Том 23, № 2. С. 97-98.
3. Методические рекомендации «Выделение и идентификация бактерий желудочно-кишечного тракта животных», от 11 мая 2004 г. Департамент Ветеринарии Министерства сельского хозяйства Российской Федерации.
4. Методические рекомендации «Микробиологическая диагностика дисбактериоза кишечника», от 15 марта 2007 г. Российская академия медицинских наук, ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.
5. Ветеринарно-санитарные нормы и требования к качеству кормов для непродуктивных животных №13-7-2/1010 от 15.07.1997 г.
6. ГОСТ Р55453-2013 Национальный стандарт Российской Федерации «Корма для непродуктивных животных. Общие технические условия» от 01.07.2014 г.
7. Шалабот Н.Е. и др. – Кормление домашней собаки (эволюционные, этологические и физиологические аспекты) – Пермь: ПВИ ВВ МВД России, 2010. – 400 с.
8. Определитель бактерий Берджи т.1, т.2. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Изд-во «Мир», 1997. – 800 с.
9. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» от 1.09.2021 г.

КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ БЛАГОПОЛУЧИЯ ЛОШАДЕЙ ПРЖЕВАЛЬСКОГО (*EQUUS FERUS PRZEWALSKII*) В ЗООПАРКЕ – ВКЛАД В СОХРАНЕНИЕ ЭКОСИСТЕМЫ СТЕПИ

Ксенофонтова А.А., Гурьянов С.И.

*Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева,
Москва, Россия*

Аннотация. Рассмотрен вклад диких копытных в поддержании экосистемы степей и роль зоопарков в сохранении популяции лошадей Пржевальского. С помощью методики BIAZA проведен аудит благополучия лошадей Пржевальского. Установлено, что созданные для животных условия соответствует высоким стандартам благополучия, предъявляемым к содержанию животных в неволе. Выявленные проблемы, снижающие уровень благополучия животных, помогут разработать управленческие стратегии, направленные на его повышение, что, повысит эффективность программ реинтродукции данного вида.

Ключевые слова: лошадь Пржевальского, благополучие животных, степной биом, охрана природы, зоопарк.

COMPREHENSIVE ANALYSIS OF THE WELFARE OF PRZEWALSKI'S HORSES (*EQUUS FERUS PRZEWALSKII*) IN THE ZOO – CONTRIBUTION TO THE PRESERVATION OF THE STEPPE ECOSYSTEM

Ksenofontova A. A., Gurianov S. I.

Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, Russia

Abstract. The contribution of wild ungulates to the maintenance of the ecosystem of the steppes and the role of zoos in preserving the population of Przewalski's horses is considered. With the help of the BIAZA methodology, an audit of the welfare of Przewalski's horses was conducted. It was found that the conditions created for the animals meet the high standards of well-being imposed on keeping animals in captivity. The identified problems that reduce the level of animal welfare will help to develop management strategies aimed at improving it, which will increase the effectiveness of reintroduction programs for this species.

Keywords: przewalski's horse, animal welfare, steppe biome, nature conservation, zoo.

Вопросы спасения и сохранения видов в современном мире представляют собой одну из самых острых проблем. Существующие угрозы процветанию и выживанию отдельных видов животных требуют изменения в подходах к их сохранению, которые могли бы стать основой для специалистов по защите животных и экологов при разработке новых подходов [1].

Лошадь Пржевальского (*Equus ferus przewalskii* Poliakov, 1881), являющаяся единственным настоящим представителем диких лошадей в мире среди 13 современных видов

рода *Equus*, классифицируется МСОП как вымершая в дикой природе (EW) и выжила только благодаря разведению в неволе [2,3]. К основным причинам вымирания данного вида относят совокупность факторов, наиболее значимыми из которых являются конкуренция за пастбища с домашним скотом и охота [4].

Истребление диких копытных может нести за собой очень критические последствия для степных экосистем, как правило, приводя к их деградации [5].

Значение копытных животных в образовании и жизнедеятельности степей как комплексных экосистем крайне велико. Являясь одним из звеньев пищевых цепей степных биотопов, они способствовали формированию и сохранению гумуса, почв, растительного покрова. Также копытные разбивают войлок степной подстилки, который формируется отмершими растениями, стимулируют к росту травы, срезая их вегетативные части и дополнительно обеспечивают растения органическими веществами [6]. Лошадь Пржевальского относится к ключевым видам степной фауны, которых, исходя из концепции конструктивной модели степи, можно называть титульными, поскольку именно они главным образом формируют степную экосистему [7].

Степная зона России по всем показателям биосферных функций планетарного значения не уступает бореальным лесам и вносит огромный вклад в устойчивость биосферы и глобальный круговорот углерода [8], в связи с чем, её устойчивость должна находиться под пристальным вниманием международных природоохранных организаций. В связи с этим восстановление популяции лошадей Пржевальского, которых можно считать «инженерами» степных экосистем, является одной из приоритетных задач современного природоохранного дела. В настоящее время существуют полувольные популяции, в том числе и в России на территории участка «Предуральская степь» Оренбургского государственного природного заповедника [9,10], а также природные популяции лошади Пржевальского, которые были созданы благодаря работам, направленным на воссоздание вида в пределах его исторического ареала. Предками этих животных являются дикие лошади, изъятые из естественной среды обитания для зоопарков, из которых впоследствии сформировалась популяция данного вида, содержащаяся исключительно в искусственных условиях [11]. В настоящее время, содержащиеся в зоопарках животные используются для расширения генофонда диких популяций лошадей Пржевальского [12]. Обеспечение высоких стандартов благополучия для лошадей Пржевальского, находящихся на их попечении, имеет большое значение как для их разведения в неволе, так и для успешной реинтродукции этого вида, которая будет успешна только в случае подбора наиболее сильных и жизнеспособных особей. Помимо этого, зоопарки несут моральную, этическую и юридическую ответственность за животных в своих коллекциях [13,14].

Мониторинг благополучия животных должен быть максимально объективным и научно обоснованным, включать оценку не только окружения животного, но и состояния самого животного, как физического, так и психологического.

Исследования проводились в отделе копытных на базе Центра воспроизводства редких видов животных Московского зоопарка на группе лошадей Пржевальского гаремного типа, которая состояла из 4 особей: 1 половозрелого самца, 2 половозрелых кобыл и 1 неполовозрелой кобылки. Аудит благополучия животных проводился по методике, разработанной Британско-ирландской ассоциацией зоопарков и аквариумов (BIAZA) [15]. Комплексная оценка уровня благополучия лошадей по методике BIAZA проводилась по 2 векторам: 1) индикаторы благополучия, основанные на состоянии животного, из которых 16 характеризовали поведение животных, 13 – их физическое здоровье; 2) индикаторы

благополучия, основанные на доступных ресурсах, из них 6 относились к показателям кормления животных, 22 – состояния окружающей среды (вольера). Каждый показатель оценивался в баллах: 1 – да / отвечает критерию, 0 – нет / не отвечает критерию. Также в протоколе наблюдений отражалась не возможность применения оценки по данному показателю (N/A) и ситуация, когда показатель не фиксировался во время аудита (N/W). Результат оценки благополучия животных подсчитывался путем суммирования числа утверждений, оцененных как удовлетворяющие критериям (1), а затем выражался в виде процентной доли от максимально возможного значения (ответы типа N/A и N/W при подсчете не учитывались). Доказательной базой являлись собственные комплексные этологические наблюдения, проводимые на особях данной группы [16].

Анализ данных, полученных при аудите благополучия лошадей Пржевальского по методике BIAZA, показал, что условия содержания животных в Зоопитомнике Московского зоопарка соответствуют высоким стандартам благополучия, итоговый результат комплексной оценки составил 85% от максимально возможного значения, однако были выявлены ряд угроз благополучию изучаемого поголовья.

При оценке поведения лошадей (87%) установлено, что животные не имеют возможности проявлять естественное кормодобывающее (поиск кормов) и кормовое (поедание корма) поведение, и как следствие демонстрируют аномальное стереотипное поведение. Как известно свободноживущие лошади 16-18 часов в сутки затрачивают на пастьбу, что является видоспецифичным поведенческим паттерном, однако система кормления, применяемая в Зоопитомнике, не позволяет им использовать врожденные модели поведения – медленно потреблять корм на протяжении длительного периода времени в естественной позе (голова опущена к земле) постоянно при этом перемещаясь.

Анализ физического состояния животных (93%) показал, что изучаемое поголовье находится в хорошей физической форме, животные здоровы, не проявляют признаков боли и дискомфорта, имеют хорошую упитанность, но при этом не проводится постоянный мониторинг и оценка качества жизни животных, что в долгосрочной перспективе может привести к снижению уровня их благополучия.

Оценка показателей кормления лошадей Пржевальского в целом соответствует высоким показателям благополучия (93%): все животные имеют постоянный свободный доступ к чистой воде, получают необходимое количество высококачественных кормов, рацион данного вида представлен в отдельном документе, в который вносятся изменения с учетом существующих новых рекомендаций по кормлению и современных научно-обоснованных данных. В процессе аудита выявлено, что при кормлении животных не применяется подходящий для данного вида способ подачи корма, что, как было сказано ранее, не позволяет лошадям удовлетворять видоспецифичные потребности, и приводит к развитию аномальных форм поведения, являющихся маркерами стресса.

Самая низкая оценка (66%) была получена по показателям, характеризующим состояние среды обитания животных, в связи с тем, что в вольере отсутствует подходящий субстрат для проявления животными кормодобывающего поведения, а так же убежища, укрытия и места, находящиеся вне зоны видимости посетителей, где животное может спрятаться от особей своего вида и посетителей, почва, как в самом вольере, так и за его пределами перенасыщена влагой, и животные не обеспечены водой (не питьевой) для отдыха и физической активности.

Таким образом, проведенная комплексная оценка благополучия поголовья лошадей Пржевальского с помощью концепции, предложенной Британско-ирландской ассоциацией зоопарков и аквариумов (BIAZA), позволила получить информацию о несоответствии условий

содержания видовым потребностям животных по ряду параметров, что может помочь разработать правильную стратегию при принятии управленческих решений, направленную на повышение уровня их благополучия. Лошади Пржевальского, выращенные в неволе в соответствии с высокими стандартами благополучия, вероятно, будут иметь больше возможностей успешно пополнить дикие популяции, чтобы дать возможность виду успешно восстанавливаться в границах степного биома [17]. Последнее тем самым будет вносить существенный вклад в программы сохранения евразийской степи, являющейся самой обширной степной экосистемой на планете, в пределах ареала которой существует большое разнообразие флористических и фаунистических комплексов, и вносящей огромное значение в поддержание устойчивости биосферы, а также выполняющей ряд крайне весомых экосистемных услуг.

Библиографический список

1. Barongi, R., Fisker, F. A., Parker, M., & Gusset, M. (Eds.). *Committing to conservation: The world zoo and aquarium conservation. Strategy*. Gland: WAZA, Executive office, 2015. – P. 70.
2. Wakefield S, Knowles J, Zimmermann W, Van Dierendonck M. Status and Action Plan for the Przewalski's horse (*Equus ferus przewalskii*) In: Moehlman P, editor. *Equids: Zebras, Asses and Horses*. IUNC/SSC Equid Specialist Group, IUCN Publications Services Unit; Cambridge, UK. 2002. – P. 82-92.
3. *Integrated Taxonomic Information System*. – 1992 [Электронный ресурс]. Дата обновления: 05.10.2022. – URL: https://it.is.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&anchorLocation=SubordinateTaxa&credibilitySort=TWG%20standards%20met&rankName=ALL&search_value=180689&print_version=SCR&source=from_print#SubordinateTaxa (дата обращения: 03.10.2022).
4. Kaczynsky P, Ganbaatar O, von Wehrden H, Enksaikhan N, Lkhagvasuren D, Walzer C. Przewalski's Horse (*Equus ferus przewalskii*) Re-introduction in the Great Gobi B Strictly Protected Area: from Species to Ecosystem Conservation // *Mongolian Journal Biological Sciences*. – 2007 December. – 5(1-2). – P.13-18.
5. Опарин, М. Л. Выпас как фактор трансформации наземных экосистем семиаридных регионов / М. Л. Опарин, О. С. Опарина, А. А. Цветкова // *Поволжский экологический журнал*. – 2004. – № 2. – С. 183-199.
6. Климов, В.В. Лошадь Пржевальского: Последняя дикая лошадь на планете / В.В. Климов – изд. 2-е, перераб. И сущ. Доп. – М.: ЛЕНАНД. 2018. – 320 с.
7. Левыкин, С.В., Казачков, Г.В. Новационная парадигма сохранения и восстановления степи на основе её конструктивной модели / С.В. Левыкин, Г.В. Казачков // *Экопотенциал*. – 2015. – № 2–10. – С. 33-41.
8. Тишков, А.А. Биосферные функции и экосистемные услуги ландшафтов степной зоны России / А.А. Тишков // *Аридные экосистемы*. – 2010. – Т. 16, № 41 – 1. – С. 5-15.
9. Bakirova R. T., Zharkikh T. L. Programme on establishing a semi-free population of Przewalski's horse in Orenburg State Nature Reserve: the first successful project on the reintroduction of the species in Russia // *Nature Conservation Research. Заповедная наука*. – 2019. – Т. 4. – №. S2. – С. 57-64.
10. Жарких, Т.Л., Бакирова, Р.Т., Булгаков, Е.А. Демографические показатели полувольной популяции лошади Пржевальского в государственном природном заповеднике «Оренбургский», Россия, в первые годы после начала программы реинтродукции /

- Т.Л. Жарких, Р.Т. Бакирова, Е.А. Булгаков // Проблемы зоокультуры и экологии. – 2020. – Выпуск 4. – С. 74-84.
11. Рожнов, В., Орлов, В., Паклина, Н., Спасская, Н. Возвращение лошади Пржевальского / В. Рожнов, В. Орлов, Н. Паклина, Н. Спасская // Наука в России. – 2011. – № 4. – С. 32-37.
 12. Остапенко, В. А. К вопросу о значении зоопарков в репатриации представителей семейства лошадиных Equidae / В. А. Остапенко // Nature Conservation Research. Заповедная наука. – 2019. – Т. 4. – № S2. – С. 65-71.
 13. Mellor, D. J., & Beausoleil, N. J. Extending the ‘Five Domains’ model for animal welfare assessment to incorporate positive welfare states // Animal Welfare. – 2015. – 24. – P. 241-253.
 14. Gray, J. Zoo Ethics: The Challenges of Compassionate Conservation. Victoria: CSIRO Publishing, 2017. – P. 256.
 15. Harley, J., & Clark, F.E.: Animal Welfare Toolkit. London. BIAZA. Version 1, First Published 2019.
 16. Гурьянов, С. И. Анализ поведенческого репертуара лошадей Пржевальского (*Equus ferus przewalskii*) центра воспроизводства редких видов животных Московского государственного Зоологического парка / С. И. Гурьянов, А. А. Ксенофонтова // Экология и природопользование: тенденции, модели, прогнозы, прикладные аспекты: Материалы Национальной научно-практической конференции, Рязань, 17 марта 2022 года. – Рязань: Рязанский государственный агротехнологический университет им. П.А. Костычева, 2022. – С. 18-22.
 17. Goodall, J. Hope for animals and their world, how endangered species are being rescued from the brink. London, UK: Icon Books, 2009. – P. 416.

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ УСЛОВИЙ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ *RADIX AURICULARIA*

Масленникова М.А., Ермолаева Я.К., Долинская Е.М., Бирицкая С.А., Бухаева Л.Б.,
Пушница В.А., Голубец Д.И., Лавникова А.В., Щукова Е.А., Карнаухов Д.Ю., Зилов Е.А.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

Аннотация. Световое загрязнение – современная экологическая проблема. На данный момент крайне мало данных о влиянии светового загрязнения на моллюсков, в том числе на брюхоногих. В данном исследовании мы решили проверить, влияют ли разные типы искусственного освещения, различающиеся по своим спектрам, на активность моллюска *Radix auricularia*. Для этого использовали два источника света (теплый и холодный свет) и аквариум длиной 1 м. Было выяснено, что искусственное освещение (в зависимости от спектральных характеристик) может повышать активность моллюсков этого вида или снижать ее.

Ключевые слова: световое загрязнение, брюхоногий моллюск, Байкал.

INFLUENCE OF VARIOUS LIGHT CONDITIONS ON THE *RADIX AURICULARIA* MOTOR ACTIVITY

Maslennikova M.A., Ermolaeva Ya.K., Dolinskaya E.M., Biritskaya S.A., Bukhaeva L.B.,
Pushnitsa V.A., Golubets D.I., Lavnikova A.V., Schukova E.A., Karnaukhov D.Yu., Silov E.A.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. Light pollution is a modern environmental problem. At the moment, there is very little data on the effects of light pollution on shellfish, including gastropods. In this study, we decided to test whether different types of artificial lighting, differing in their spectra, affect the activity of the *Radix auricularia* mollusk. For this purpose, two light sources (warm and cold light) and an aquarium with a length of 1 m were used. It was found that artificial lighting (depending on the spectral characteristics) can increase or decrease the activity of this species of mollusks.

Keywords: light pollution, gastropod, Baikal.

Использование искусственного освещения приводит к возникновению светового загрязнения. На суше, основными источниками светового загрязнения являются рекламные щиты, уличное освещение, освещение зданий и автомагистралей. Для водных объектов есть два основных источника светового загрязнения: освещение береговой линии и водный транспорт [1]. Известно, что световому загрязнению могут подвергаться такие гидробионты, как рыбы [2], амфиподы [3], изоподы [4], дафнии [5]. Одной из многочисленных групп

являются моллюски, которые к тому же занимают второе место по видовому разнообразию после членистоногих [6], но несмотря на это, на данный момент крайне мало данных о влиянии светового загрязнения на моллюсков. В озере Байкал обитает около 180 видов моллюсков, из которых ~82% брюхоногие моллюски, из них более 60% являются эндемиками озера [7]. Верхнюю часть литорали (0-5 м) населяет такой вид как *Radix auricularia* (Linnaeus, 1758) [8]. Уже было выяснено, что литоральная часть Байкала подвергается световому загрязнению [9] и поэтому данный вид моллюсков может быть подвержен влиянию данного типа загрязнения.

Исходя из этого, мы решили проверить зависит ли реакция *R. auricularia* на искусственный свет от его спектральных характеристик. Отлов моллюсков проводили 15.09.2021 в Южной части озера Байкал в районе поселка Большие Коты. В течении двух недель до начала эксперимента организмы акклимировались при следующих условиях ($t = 8^{\circ}\text{C}$, режим светового дня – 8:16). Эксперимент начинался в одно и то же время (начало в 10:00), чтобы исключить влияние суточных ритмов. Для эксперимента использовали 4 варианта освещения (дневной свет 58000 люкс, темнота 0 люкс, теплый и холодный свет устанавливался на 15 см выше аквариума, чтобы создать градиент освещения от 0,3 до 33 люкс).

Экспериментальная установка представляла собой аквариум (длина 100 × ширина 10 × высота 10 см). Под аквариум подкладывали разлинованный лист с расстоянием между строчками в 1 см. В эксперименте использовалось 30 особей с средней высотой раковины $16,4 \pm 0,3$ мм. Эксперимент начинался с того, что все 30 особей высаживались в начало аквариума и засекалось время, через 15 минут по разлинованному листу бумаги фиксировалось расстояние, пройденное моллюсками за это время. Для каждого варианта освещения моллюсков 5 раз высаживали с одной стороны и 5 раз с противоположной. Во время проведения эксперимента при дневном освещении и при полной темноте было выяснено, что двигательная активность моллюсков была одинаковой между правой и левой стороной аквариума, следовательно, сторона аквариума не влияла на результат экспериментов. Наибольшая активность данного вида была отмечена при отсутствии какого-либо освещения.

При дневном освещении их активность крайне низкая. Тоже самое наблюдается при использовании тёплого света, двигательная активность моллюсков была одинаковая в разных концах аквариума, несмотря на разность освещения. В случае с использованием холодного света, мы наблюдаем низкую активность моллюсков при их помещении у наиболее освещённого конца аквариума и наиболее высокую активность у противоположного, при этом движение в данном случае направленно по направлению к источнику света.

Уже давно известно, что Lymnaeidae служат пищей для рыб [10]. И если на *R. auricularia* оказывать воздействие холодным светом, то данный вид будет концентрироваться возле источника освещения, что сделает этого моллюска потенциально видимым для рыб, которые в озере Байкал активно привлекаются искусственным светом [11]. В случае внезапного появления теплого света в локальном месте, где уже имеется популяция моллюсков, его резкое появление скорее всего может привести к резкому снижению двигательной активности моллюсков, что также сделает их более уязвимым для потенциальных хищников.

Библиографический список

1. Navarro-Barranco, C., Hughes, L.E. Effects of light pollution on the emergent fauna of shallow marine ecosystems: Amphipods as a case study // *Marine Pollution Bulletin*. – 2015. – V. 94.- P. 235–240.
2. Pulgar, J., Zeballos, D., Vargas, J., Aldana, M., Manriquez, P. H., Manriquez, K., Quijón, P. A., Widdicombe, S., Anguita, C., Quintanilla, D., Duarte, C. Endogenous cycles, activity patterns and energy expenditure of an intertidal fish is modified by artificial light pollution at night (ALAN) // *Environmental Pollution*. – 2019. – V. – 244. – P. 361-366.
3. Luarte, T., Bonta, C.C., Silva-Rodriguez, E.A., Quijón, P.A., Miranda, C., Farias, A.A., Duarte, C. 2016. Light pollution reduces activity, food consumption and growth rates in a sandy beach invertebrate // *Environmental Pollution*. – 2016. – V. 218. – P. 1147-1153.
4. Duarte, C., Quintanilla-Ahumada, D., Anguita, C., Manríquez, P. H., Widdicombe, S., Pulgar, J., Silva-Rodríguez, E.A., Miranda, C., Manríquez, K., Quijón, P. A. Artificial light pollution at night (ALAN) disrupts the distribution and circadian rhythm of a sandy beach isopod // *Environmental Pollution*. – 2019. – V. 248. – P. 565-573.
5. Moore, M. V., Pierce, S. M., Walsh, H. M., Kvalvik, S. K., Lim, J. D. Urban light pollution alters the diel vertical migration of *Daphnia* // *Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie: Verhandlungen*. – 2000. – V. 27. – №2. – P. 779-782.
6. Giribet, G., Okusu, A., Lindgren, A. R., Huff, S. W., Schrödl, M., Nishiguchi, M. K. Evidence for a clade composed of molluscs with serially repeated structures: monoplacophorans are related to chitons // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2006. – V. 103. – № 20. – P. 7723-7728.
7. Zhuykova, N. S. Gastropods of the family Lymnaeidae (Pulmonata) in the littoral zone and *Spirogyra* blooms from the northwest of Lake Baikal // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2020. – V. 4. – P. 767-768.
8. Aksenova, O., Vinarski, M., Bolotov, I., Kondakov, A., Bepalaya, Yu., Tomilova, A., Paltser, I., Gofarov, M. Two *Radix* spp. (Gastropoda: Lymnaeidae) endemic to thermal springs around Lake Baikal represent ecotypes of the widespread *Radix auricularia*. *Journal of zoological systematics and evolutionary research*. – 2017. – V. 55. – № 4. – P. 298-309.
9. Karnaukhov, D., Teplykh, M., Dolinskaya, E., Biritskaya, S., Ermolaeva, Y., Pushnica, V., Kuznetsova, I., Okholina, A., Bukhaeva, L., Silow, E. Light pollution affects the coastal zone of Lake Baikal. *Limnological Review*. – 2021. – V. – 21. – № 3. – P. 165–168.
10. Ивлев, В.С. Экспериментальная экология питания рыб // М: Пищепромиздат. – 1955. – С. 253.
11. Takhteev, V.V., Karnaukhov, D.Yu., Govorukhina, E.B., Misharin, A.S. Diel Vertical Migrations of Hydrobionts in the Coastal Area of Lake Baikal // *Inland Water Biology*. – 2019. – V. 12. – № 2. – P. 178-189.

АНАЛИЗ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОЗЕРНОЙ КУМЖИ *SALMO TRUTTA* ВОСТОЧНОЙ ФЕННОСКАНДИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛИЗА МИКРОХИМИИ ОТОЛИТОВ

Михеев П.Б.^{1,2} Прусов С.В.³, Эркинаро Я.⁴ Клосс Дж.⁵

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия;*

² *Хабаровский филиал ФГБНУ «ВНИРО» (ХабаровскНИРО), Хабаровск, Россия*

³ *Полярный филиал ФГБНУ «ВНИРО» («ПИНРО» им. Н. М. Книповича), Мурманск, Россия*

⁴ *Институт природных ресурсов Финляндии (Luke), Оулу, Финляндия*

⁵ *Департамент Зоологии, Университет Отаго, Данидин, Новая Зеландия*

Аннотация Целью данного исследования явился анализ происхождения озерной кумжи *Salmo trutta*, Верхнетуломского водохранилища, водосбор которого расположен в пределах России и Финляндии. В качестве метода был использован микрохимический анализ отоликов. Результаты анализа происхождения рыб из смешанной выборки, осваиваемой рыболовством, не соответствовали опубликованному ранее воспроизводственному потенциалу рек в водосборе водохранилища, который основан на площади нерестово-выростных участков (НВУ).

Ключевые слова: кумжа, *Salmo trutta*, биогеохимические метки, микрохимия отоликов, LA- ICP-MS.

ANALYSIS OF THE ORIGIN OF LAKE TROUT *SALMO TRUTTA* OF EASTERN FENNOSCANDIA USING MICROCHEMICAL ANALYSIS OF OTOLITHS

Mikheev P.B.^{1,2} Prusov S.V.³, Erkinaro Ya.⁴ Kloss G.⁵

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia;*

² *Khabarovsk Branch of VNIRO Federal State Budgetary Institution (Khabarovsk), Khabarovsk, Russia*

³ *POLAR Branch of VNIRO Federal State Budgetary Research University (PINRO named after N. M. Knipovich), Murmansk, Russia*

⁴ *Institute of Natural Resources of Finland (Luke), Oulu, Finland*

⁵ *Department of Zoology, University of Otago, Dunedin, New Zealand*

Abstract. The purpose of this study was to analyze the origin of lake trout *Salmo trutta* from Verkhnetulomskoye reservoir, the catchment area of which is located within Russia and Finland. Microchemical analysis of otoliths was used as a method. The results of the analysis of the origin of fish from fisheries mixed sample did not correspond to the previously published reproductive potential of rivers in the reservoir catchment area, which is based on the area of spawning and growing areas.

Keywords: brown trout, *Salmo trutta*, biogeochemical tags, microchemistry of otoliths, LA-ICP-MS.

Введение

Вылов рыб зачастую происходит в местах их нагула, на путях миграций или в местах зимовки. При этом зачастую облавливаются несколько популяций (субпопуляций) промыслового вида рыб. Смешанный промысел требует определенной стратегии управления, основанной на информации о различных популяциях облавливаемой группы рыб, которая позволяет распределять промысловую нагрузку, снижая ее для уязвимых популяций, численность рыб в которых подорвана.

В настоящей работе мы использовали микрохимический анализ отолитов для исследования происхождения и миграций озерной кумжи, осваиваемой в режиме любительского рыболовства в Верхнетуломском водохранилище. Гипотеза исследования заключается в том, что притоки водохранилища с наибольшей площадью нерестово-выростных угодий [4], являются основным источником пополнения озерной кумжи водохранилища. Ранее этот метод не использовался для анализа происхождения запасов рыб крупных озерных систем, хотя он с успехом применялся для рыб, населяющих водосборы рек [5]. Микрохимия отолитов позволяет проводить анализ структуры запаса в более тонких пространственных и временных масштабах, чем большинство генетических методов, что особенно актуально при исследовании популяций рыб с однородной генетической структурой [6].

Материал и методы

Верхнетуломское водохранилище было создано на реке Тулома, в результате строительства плотины Верхнетуломской ГЭС в 1962-1965 годах, что привело к затоплению оз. Нотозеро. Водоохранилище расположено на высоте 80 м над уровнем моря, имеет площадь 745 км², объем 11,5 км³, длину 85 км, максимальную ширину 20 км, максимальную и среднюю глубину 50 и 15 м соответственно.

Популяция озерной кумжи водохранилища полностью дикого происхождения, является одной из крупнейших по численности в Восточной Фенноскандии. Кумжа может достигать массы тела до 10 кг, питаясь пелагическими видами рыб, главным образом ряпушкой, что характерно для крупных озер Фенноскандии [7,8]. Согласно предыдущим исследованиям [9,10], половозрелая кумжа из водохранилища нерестится в двух притоках – реках Лотта и Нота, которые впадают в водохранилище с запада и берут начало на территории Финляндии.

Для оценки происхождения озерной кумжи, нагуливающейся в Верхнетуломском водохранилище, были отобраны фоновые пробы молоди из нерестовых рек и ручьев, впадающих в водохранилище, расположенных как в России, так и в Финляндии. Отдельно проводился сбор кумжи в водохранилище. Микрохимический анализ отолитов молоди и взрослых рыб был выполнен с помощью масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой с квадрупольной лазерной абляцией (Q-LA-ICPMS) [Agilent 7900 Q-ICPMS, соединенной с эксимерным лазером ASI RESOLUTION M-50-LR с длиной волны 193 нм].

Результаты

Нами было оценено происхождение 20 из 57 взрослых особей кумжи из водохранилища. Шесть рыб, отобранных в водохранилище, были классифицированы как происходящие из реки Антерийоки, которая принадлежит водосбору реки Нота. Остальные десять особей были сгруппированы по притокам реки Лотта, включая реки Киертямяйоки (6 особей), Лотту (3 особи) и реку МуорраВааракка (1 особь). Четыре экз. были отнесены к притокам Верхнетуломского водохранилища, в частности к р. Аннама (3 экз.) и р. Хорюха (1 экз.), не

относящимся к рекам Лотта и Нота. Наши данные показали, что 35% отобранных взрослых особей кумжи происходили примерно из 12% известных потенциальных мест нереста и нагула молоди.

Выводы и дальнейшие перспективы исследования

Результаты противоречат данным, согласно которым реки Лотта и Нота являются основными источниками пополнения кумжи в Верхнетуломском водохранилище [9, 4, 10]. Большая доля проанализированных рыб из водохранилища, наряду с четырьмя особями, относящимися к рекам Аннама и Хорюха, указывают на важность других притоков для пополнения кумжи. Это, вероятно, отражает экологическую гибкость кумжи в использовании различных типов текучих вод для нереста и нагула молоди [11,12]. Наши результаты показывают, что совокупная приемная емкость нерестово-выростных угодий небольших ручьев для формирования запаса форели может быть больше, чем таковая крупных рек.

Требуется расширение географии сбора материала молоди с рек и ручьев в исследуемом водосборе, что позволит оценить происхождение большего числа рыб из водохранилища.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20069, <https://rscf.ru/project/22-24-20069/> и при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № 22-24-20069.

Библиографический список

1. Kerr, L. A., Hintzen, N. T., Cadrin, S. X., Clausen, L. W., Dickey-Collas, M., Goethel, D. R., Hatfield, E. M., Kritzer, J. P., & Nash, R. D. 2017. Lessons learned from practical approaches to reconcile mismatches between biological population structure and stock units of marine fish. *ICES Journal of Marine Science*, 74, 1708–1722. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsw188>
2. Crozier W.W., Schön P.-J., Chaput G., Potter E.C.E., Maoiléidigh N.Ó., & MacLean J.C. 2004. Managing Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in the mixed stock environment: challenges and considerations. *ICES J. Mar. Sci.* 61(8): 1344–1358.
3. Bradbury, I.R., Hamilton, L.C., Rafferty, S., Meerburg, D., Poole, R., Dempson, J.B., Robertson, M.J., Reddin, D.G., Bourret, V., Dionne, M., Chaput, G., Sheehan, T.F., King, T.L., Candy, J.R., Bernatchez, L. & Morán, P. 2014. Genetic evidence of local exploitation of Atlantic salmon in a coastal subsistence fishery in the Northwest Atlantic. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 72(1): 83-95. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2014-0058>
4. Erkinaro, J., Mattsson, J., Erkinaro, H., Dolotov, S., Pautamo, J., Alekseev, M., Popov, N., Samokhvalov, I., Saari, T., & Kaukoranta, M. 2001. The River Tuloma salmon habitat inventory. Work report, TACIS Tuloma River Project ENVRUS 9703, 19 p.
5. Olley, R., Young, R.G., Closs, G.P., Kristensen, E.A., Bickel, T.O., Deans, N.A., Davey, L.N. & Eggins, S.M. 2011. Recruitment sources of brown trout identified by otolith trace element signatures. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 45(3): 395-411. doi:10.1080/00288330.2011.592196.
6. Elsdon, T.S., Wells, B.K., Campana, S.E., Gillanders, B.M., Jones, C.M., Limburg, K.E. & Walther, B.D. (2008) Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes – hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and Marine Biology* 46, 297– 330.

7. Huusko, A., Vainikka, A., Syrjänen, J., Orell, P., Louhi, P. & Vehanen, T. 2017. Life-History of the Adfluvial Brown Trout (*Salmo trutta* L.) in Eastern Fennoscandia. In *Brown Trout* (eds J. Lobón-Cerviá and N. Sanz). doi:10.1002/9781119268352.ch12
8. Syrjänen, J., Vainikka, A., Louhi, P., Huusko, A., Orell, P., & Vehanen, T. 2018. History, Conservation and Management of Adfluvial Brown Trout Stocks in Finland. In J. Lobón-Cerviá, & N. Sanz (Eds.), *Brown Trout: Biology, Ecology and Management* (pp. 697-733). John Wiley & Sons Ltd. doi:10.1002/9781119268352.ch28
9. Aalto, J., Niemelä, E., Julkunen, M. & Erkinaro, J. 1998. Juvenile densities, growth and migration of brown trout (*Salmo trutta* L.) in the Rivers Luttojoki and Nuortijoki, northern Finland. *Kalatutkimuksia– Fiskundersökningar*, 138, 1–38. Finnish Game and Fisheries Research Institute, Helsinki (in Finnish with an English abstract).
10. Orell, P., Erkinaro, J., Mäkinen, H. & Seppänen, M. 2015. Taimenseurannat Tuulomajoen vesistön Suomen puolen latvajoissa 2011–2014 [Monitoring of brown trout populations in the Finnish headwaters of the Tuloma system 2011-2014]. Natural Resources Institute Finland, *Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus* 27/2015. 23 p (In Finnish).
11. Jonsson, B., N. Jonsson, E. Brodtkorb & P.-J. Ingebrigtsen, 2001. Life-history traits of brown trout vary with the size of small streams. *Functional Ecology* 15: 310–317. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2001.00528.x
12. Louhi, P., Mäki-Petäys, A. & Erkinaro, J. 2008. Spawning habitat of Atlantic salmon and brown trout: General criteria and intragravel factors. *River Research and Applications* 24: 330-339.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОВЫШЕННОЙ МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РЕЧНОГО ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS*

Михеев П.Б.^{1,2}, Мухина М.В.¹, Костицына Н.В.¹, Бакланов М.А.¹, Пузик А.Ю.¹

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

² *ХабаровскНИРО, Хабаровск, Россия*

Аннотация. Приводятся результаты воздействия экспериментально дозированного засоления и засоления с одновременным умеренным повышением температуры на соматические индексы, биохимические показатели крови и выживаемость сеголеток пресноводного окуня. Границей толерантности к засолению для сеголеток окуня, использованных в эксперименте, оказалось значение минерализации в 8 г/л. Повышение температуры привело к снижению границы толерантности сеголеток окуня при засолении до 5,3 г/л.

Ключевые слова: загрязнение, засоление пресных вод, температура, экологическая толерантность рыб, выживаемость.

EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF THE EFFECT OF INCREASED MINERALIZATION AND TEMPERATURE ON PERCH *PERCA FLUVIATILIS*

Mikheev P.B.^{1,2}, Mukhina M.V.¹, Kostitsyna N.V.¹, Baklanov M.A.¹, Puzik A.Yu.¹

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia*

² *Khabarovsk Branch of VNIRO Federal State Budgetary Institution (Khabarovsk), Khabarovsk, Russia*

Abstract. The results of the effects of experimentally dosed salinization and salinization with a simultaneous moderate increase in temperature on somatic indices, biochemical blood parameters and survival of freshwater perch fingerlings are presented. The limit of salinity tolerance for perch fingerlings used in the experiment turned out to be a mineralization value of 8 g/l. An increase in temperature led to a decrease in the tolerance limit of perch fingerlings during salinization to 5.3 g/l.

Keywords: pollution, salinization of fresh waters, temperature, ecological tolerance of fish, survival.

Введение

Засоление пресноводных экосистем является серьезной проблемой в глобальном плане, при этом в условиях современных тенденций изменения климата негативное воздействие на водную биоту может быть усилено [1]. Россия является одним из мировых лидеров по производству калийных и магниевых солей. Их добыча производится в Пермском крае в пределах Верхнекамского месторождения, при этом побочным эффектом является техногенное засоление водной среды. Отметим, что для бореальных пресноводных экосистем характерна низкая устойчивость к антропогенному воздействию, негативный эффект от

которого способен усиливаться в текущих условиях изменения климата [2; 3]. Пресноводные рыбы бореальной зоны отличаются довольно низкой толерантностью к солености. Целью работы являлся анализ связи биохимических показателей крови с соматическими индексами (упитанность, гепатосоматический индекс) и, в конечном счете, выживаемостью сеголеток окуня при воздействии повышенной минерализации и температуры.

Материал и методы

Экспериментальные работы проводились в ботаническом саду Пермского государственного национального исследовательского университета (ПГНИУ, Пермь, Россия) в августе – октябре 2021 г.

Для эксперимента были использованы сеголетки окуня. Рыбы были отловлены в августе 2021 г. в нижнем течении р. Гайвы – правобережном притоке Воткинского водохранилища в локации с координатами 58.090976, 56.299700. Лов рыб проводили при помощи малькового невода сечением ячеи 5 мм. Для проведения экспериментальных работ были отловлены 1050 экз. сеголетков окуня средней длиной $54,6 \pm 1,0$ мм, которые в течение часа были доставлены в емкостях, оснащенных системами аэрации к месту проведения экспериментальных работ. Отход за время транспортировки составил 178 экз. Для акклиматизации рыбы были пересажены в бассейн объемом 2 м³, который располагался под открытым небом в непосредственной близости от экспериментальной установки. За двое суток до пересадки рыб бассейн был наполнен водопроводной водой, а также был оснащен системами фильтрации и аэрации. В период двухнедельной акклиматизации рыб проводили подмену трети объема воды в бассейне с интервалом в 3-5 дней. В период акклиматизации и до конца экспериментальных работ рыб кормили ежедневно живыми личинками комара-звонца *Chironomus plumosus* (мотыльём). Объем раздаваемого корма регулировали по его поедаемости рыбами. В рыболовной емкости находился незначительный избыток живого корма. Донный осадок ежедневно собирали сифоном.

Эксперимент включал 2 направления:

1. Исследование границ толерантности сеголеток окуня к повышенной минерализации. Проводили оценку выживаемости рыб при различном уровне минерализации по методике, описанной Э. Кристенсенем с соавт. [4]. По 16 особей окуня были пересажены в условия с минерализацией 5, 6, 7, 8, 9 и 10 г/л. Во всех случаях процедура плавного повышения солености в емкостях с рыбами не проводилась. Сеголетки помещались из воды с фоновыми значениями минерализации в воду уже имеющую определенную соленость. Затем на протяжении двух недель проводили оценку выживаемости сеголеток окуня в указанном градиенте солености.

2. Экспериментальные работы по оценке влияния солености, в том числе при воздействии повышенных температур, на сеголетков окуня. Работы проводились в сентябре-октябре 2021 г. Подопытные особи (от 28 до 31 экз.) были рассажены по 9 контейнерам объемом 32 л. Перед посадкой у рыб была измерена длина тела с точностью до 0,1 мм. Контейнеры были пронумерованы, оборудованы системами фильтрации и аэрации. Эксперимент проходил при естественном освещении в формате трехкратных повторений для каждого из факторов, при этом один контейнер представлял из себя одну повторность. В первых трех контейнерах рыбы содержались при фоновых условиях минерализации и температуры. В других контейнерах были созданы условия повышенной солености воды, в том числе с искусственным повышением температуры. Температуру воды измеряли ежедневно во всех контейнерах. Фоновые значения температуры воды варьировали от 5,1 до 14,0°C (в среднем $8,7 \pm 0,12$ °C). В контейнерах, оборудованных аквариумными

подогревателями, температура воды в ходе эксперимента составила 14,3-23,3°C (в среднем 19,7±0,12°C). Для повышения минерализации воды использовали соль, которую отбирали в солеотвалах, расположенных в районах разработки Верхнекамского месторождения калийно-магниевого солей. Контроль над уровнем минерализации *in vivo* проводили с помощью прибора Aquarprobe AP-2000. Среднее значение общей минерализации в контейнерах с фоновыми условиями составило 0,26±0,01 г/л (пределы варьирования 0,2-0,33 г/л). В условиях повышенной солености среднее значение минерализации составило 5,3±0,03 г/л с пределами варьирования 5,0-6,2 г/л.

Продолжительность эксперимента составила 35 дней. В ходе эксперимента ежедневно отмечали число погибших рыб, которых измеряли, а также отмечали состояние покровов тела на наличие признаков проявления дерматомикоза. По окончании эксперимента тестируемых особей измеряли и взвешивали для расчета коэффициента упитанности по Фультону. Измерение длины тела проводили до конца чешуйного покрова. Взвешивание массы рыб проводили с точностью до 0,1 г. Затем проводили взятие проб крови из хвостовой артерии путем отсечения хвостового стебля у анального плавника не позднее чем через 15-20 сек. после извлечения рыбы из воды согласно методике В.В. Метелева [5]. В качестве антикоагулянта при отборе проб крови использовали гепарин. В связи с малым количеством крови у сеголеток, для набора объема крови, необходимого для проведения биохимического анализа (0,5 мл), в одну пробирку с антикоагулянтом объединяли кровь 7-13 особей. Таким образом для проведения биохимического анализа крови были собраны по три объединенные пробы крови рыб, содержащихся в фоновых условиях и условиях повышенной минерализации. Ввиду малочисленности рыб, выживших в условиях повышенной минерализации и температуры, для проведения биохимического анализа была собрана только одна проба. После взятия проб крови рыб вскрывали и взвешивали массу печени с точностью до 0,01 г для дальнейшего расчета гепатосоматического индекса.

Биохимический анализ крови проводили на биохимическом анализаторе Stat Fax 1904+. Анализировали химический состав крови на содержание креатинина, глюкозы, мочевины, общего белка сыворотки, ионов кальция, калия, натрия, магния и хлоридов в соответствии с опубликованными методическими рекомендациями.

Результаты

Оценка выживаемости рыб при различном уровне минерализации показала, что наиболее быстрая смертность 100% сеголетков окуня была отмечена при минерализации 10 г/л. После повышения минерализации до этой величины отмечена гибель всех рыб в течение нескольких часов. В результате оценки выживаемости сеголетков окуня в градиенте солености от 5 до 9 г/л на протяжении двух недель было установлено, что смертность рыб увеличивается с ростом минерализации, использованной для тестирования. При содержании сеголетков окуня при условиях минерализации 5 г/л через 14 дней смертность составила 19%. В контейнере с минерализацией воды 6, 7, 8 и 9 г/л в течение двух недель погибли 37,5%, 62,5%, 81% и 100% подопытных особей сеголетков окуня соответственно.

В ходе эксперимента по влиянию повышенной минерализации и температуры воды на выживаемость сеголетков окуня, наибольшая смертность была характерна для рыб, содержащихся при повышенной температуре. Смертность увеличивалась в ходе эксперимента и к его окончанию составила 67-97% для трех повторностей.

Минимальный уровень смертности был характерен для сеголетков окуня, сдержавшейся в условиях повышенной минерализации. В течение 25 сут. с начала эксперимента живыми оставались 97-100% подопытных особей. Некоторое увеличение смертности отмечалось в

ходе последних 10 сут. проведения эксперимента. Итоговое значение смертности в условиях повышенной минерализации и фоновой температуры составило 6–13% для трех повторностей. Молодь окуня из контрольной группы характеризовалась величинами смертности 11–19% в конце эксперимента. Большая часть погибших рыб из контрольной группы имели признаки дерматомикоза.

Гепатосоматический индекс отличался у подопытных рыб и особей, содержащихся в фоновых условиях (ANOVA $F_{2,166} = 6.65$, $p < 0.01$). Наименьшее значение индекса было характерно для сеголетков окуня, содержащихся в условиях повышенной температуры и минерализации воды. Согласно результатам *post hoc* сравнения, эти рыбы достоверно отличались от особей, содержащихся в фоновых условиях ($p = 0.003$). В двух других парах сравнения значение уровня значимости было близко критическому, но превосходило его. В паре сравнения «фоновые условия» – «повышенная минерализация» значение p составило 0.061, а в паре сравнения «повышенная минерализация и температура» – «повышенная минерализация» уровень значимости различий был равен 0.067.

Упитанность по Фультону отличалась у рыб, содержащихся в различных условиях (ANOVA $F_{2,164} = 8.85$, $p < 0.01$). Наименьшие значения упитанности были характерны для сеголетков окуня из контейнеров с повышенной температурой и минерализацией воды (рис. 3). Согласно результатам попарного *post hoc* сравнения по критерию Тьюки, достоверные различия отмечены в парах сравнения «фоновые условия» – «повышенная минерализация и температура» ($p < 0.01$) и «повышенная минерализация и температура» – «повышенная минерализация» ($p < 0.01$). В паре сравнения «фоновые условия» – «повышенная минерализация» различий выявлено не было ($p = 0.62$).

В конце эксперимента у рыб, содержащихся в условиях повышения минерализации воды, произошло достоверное снижение концентрации общего белка, мочевины, креатинина и калия по сравнению с фоновыми показателями. Кроме того, в крови рыб, содержащихся при повышенной минерализации, было ниже содержание натрия и выше концентрация хлоридов, хотя значение уровня значимости было несколько выше использованного нами критического значения. Наиболее низкое содержание натрия и высокое хлоридов в крови характерны для рыб, содержащихся при повышенной температуре и минерализации воды (табл. 1).

Заключение

В результате проведённых исследований было установлено, что границей толерантности к засолению для сеголетков окуня бассейна р. Камы в условиях Пермского края является значение минерализации в 8 г/л, что опровергает нашу первую гипотезу о том, что для пресноводного окуня границей толерантности к засолению является значение 10 г/л. Предположение о том, что хроническое воздействие стресс-фактора при повышении температуры приводит к снижению толерантности к действию данного фактора и сопровождается повышением смертности, снижением значений соматических индексов и ухудшением показателей крови, подтвердилось. В качестве фактора, облегчающего запуск общепатологических процессов в организме сеголетков окуня в ответ на изменение минерализации воды, выступает повышенная, хотя и далекая от критических значений, температура.

Таблица 1 – Биохимические показатели крови подопытной сеголеток окуня, с результатами сравнения на основе критерия Манна-Уитни

Показатели	Фоновые условия (1)	Повышенная минерализация (2)	Повышенная минерализация и температура	<i>p</i> (1-2)
Белок общий, г/л	70.3±9.0 (53-83)	30.7±1.7 (29-34)	33	0.04
Глюкоза, mmol/L	6.8±0.4 (6-7,5)	6.3±0.6 (5,5-7,5)	6	0.54
Мочевина, mmol/L	10,0±0.6 (9-11)	5,7±0.3 (5-6)	7	<0.01
Креатинин, mkmol/L	211±41,6 (134-277)	42,7±8,4 (28-57)	55	0.05
Кальций, mmol/L	4.6±0.4 (4,2-5,3)	4.1±0.0 (4,1-4,1)	4,2	0.33
Калий, mmol/L	23.8±4.2 (16-30,5)	6,5±0,5 (6-7,5)	7,5	0.05
Натрий, mmol/L	396±24.8 (352-438)	309±25,5 (258-336)	170	0.07
Магний, mmol/L	3.6±0.03 (3,5-3,6)	3.6±0.03 (3,5-3,6)	3,5	1.00
Хлориды, mmol/L	47.7±6,7 (37-60)	88,7±14,3 (62-111)	107	0.08

Примечание: приводится среднее значение ± стандартная ошибка среднего; в скобках приведены пределы варьирования признака; сравнение проводили между выборками сеголеток окуня содержащихся в фоновых условиях и условиях повышенной минерализации; жирным выделены значения уровня значимости, при котором различия являются статистически достоверными.

Следует упомянуть, что определение некоторых параметров крови рыб в контролируемых лабораторных условиях может способствовать выявлению длительности воздействия стрессовых факторов на гидробионтов из природных водоемов в тех ситуациях, когда нельзя точно определить время воздействия данных негативных факторов в естественных условиях [6].

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-24-20069, <https://rscf.ru/project/22-24-20069/> и при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № 22-24-20069.

Библиографический список

- Herbert, E. R., P. Boon, A. J. Burgin, S. C. Neubauer, R. B. Franklin, M. Ardón, K. N. Hopfensperger, L. P. M. Lamers, and P. Gell. 2015. A global perspective on wetland salinization: ecological consequences of a growing threat to freshwater wetlands. *Ecosphere* 6(10):206. <http://dx.doi.org/10.1890/ES14-00534.1>
- Weyhenmeyer, G.A., Müller, R.A., Norman, M. et al. Sensitivity of freshwaters to browning in response to future climate change. *Climatic Change* 134, 225–239 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1514-z>
- Jeppesen, E., Beklioglu, M., Özkan, K., Akyürek, Z., 2020. Salinization increase due to climate change will have substantial negative effects on inland waters: a call for multifaceted research at the local and global scale. *Innovation* 1, 100030.
- Christensen Emil A. F., Grosell Martin and Steffensen John F. Maximum salinity tolerance and osmoregulatory capabilities of European perch *Perca fluviatilis* populations originating from different salinity habitats Volume 7. 2019 *Conservation physiology*.
- Метелев В.В. Методы взятия крови у рыб // *Ветеринария*. 1965 № 8. С. 80-81.
- Мартемьянов В.И. Оценка острого и хронического стресса у пресноводных рыб по показателям водно-солевого обмена // *Успехи современной биологии*. 2014, том 134, № 3. С. 249–256

ВИДЫ РОДА *PARDOSA* (C. L. KOCH, 1847) В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ПГНИУ

Плакхина Е. В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация: исследования проводились на территории Ботанического сада ПГНИУ в 2012 и 2021 годах на четырех участках. Сбор материала осуществлялся при помощи почвенных ловушек Барбера. Всего было собрано 420 пауков рода *Pardosa*, относящихся к 8 видам. Самым многочисленным видом стала *P. amentata*, а самым малочисленным *P. prativaga*. Доминант парков, садов и других урбанизированных ландшафтов *P. lugbris* также имеет достаточно высокую численность.

Ключевые слова: ботанический сад, *Pardosa*, сезонная активность.

SPECIES OF THE GENUS *PARDOSA* (C. L. KOCH, 1847) IN THE BOTANICAL GARDEN OF PERM STATE UNIVERSITY

Plakkhina E. V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. 4 sites were studied on the territory of PSU's Botanical Garden in 2012 and 2021. The material was collected using pitfall traps. 420 spiders of the genus *Pardosa* belonging to 8 species were collected in total. The most numerous species was *P. amentata*, and the least numerous was *P. prativaga*. The dominant of parks, gardens, and other urban landscapes, *P. lugbris*, also has a fairly high abundance.

Keywords: botanical garden, *Pardosa*, seasonal activity.

Для ботанических садов характерна высокая мозаичность растительных сообществ, когда участки культивируемой растительности соседствуют с некультивируемыми областями. Эти некультивируемые зоны могут являться естественными резерватами для аборигенных видов беспозвоночных животных, как вредных, так и полезных. Изучение животного населения таких участков, а также и влияние на его структуру эффекта мозаичности окружающей среды представляет определенный интерес.

На территории ботанического сада ПГНИУ было выявлено 50 видов, относящихся к 11 семействам, основу ареноокомплекса составляют пауки семейства *Lycosidae* (68,9 %), а наиболее широко в видовом отношении на некультивируемых участках представлен род *Pardosa* C.L. Koch, 1847 [1].

Цель работы – описать видовое разнообразие пауков рода *Pardosa* на четырех различных участках с некультивируемой растительностью, а также предоставить некоторые данные по фенологии отдельных, наиболее массовых видов.

Материалы и методы. Исследования проводились на территории ООПТ регионального значения Ботанический сад ПГНИУ [2] на протяжении бесснежных периодов 2012 (с 13 апреля по 20 ноября) и 2021 (с 23 апреля по 12 ноября) годов. Для отлова животных использовались ловушки Барбера (пластиковые стаканы высотой 8,5 см, диаметром 7 см, объемом 150 мл, заполненные на треть 4% раствором формалина). Ловушки экспонировались на четырех участках на расстоянии 2 м друг от друга по 10 суток в 2012 году и по 14 суток в 2021. В 2012 году учеты проводились на участке с естественным травостоем (I), находящемся под рядом крупных берез в хорошо освещаемом месте, и на участке с рудеральной растительностью (II), который располагался вдоль проходящей по территории ботанического сада ПГНИУ магистрали теплоснабжения. В 2021 году ловушки были установлены на участках, расположенных рядом с оранжерейным комплексом: злаковый газон позади фондовой оранжереи (III) и рудеральная растительность позади мемориальной оранжереи (IV). Кроме того, 12 ноября 2021 года были установлены ловушки на весь зимний период (до 8 апреля 2022 года). Определение пауков производилось на кафедре зоологии беспозвоночных и водной экологии ПГНИУ по определительным таблицам, размещенным на сайте Spiders of Europe [3].

Фенологические сезоны были выделены по Котюкову и Ковязину [4]: предвесенье (8- 23.IV), ранняя весна (24.IV-23.V), разгар весны (24.V-22.VI), раннее лето (23.VI-13.VII), полное лето (14.VII-17.VIII), ранняя осень (18.VIII-2.IX), глубокая осень (3.IX-3.X), зима (3.X– 17.III).

Результаты. Всего за период исследований на четырех площадках было собрано 420 особей рода *Pardosa*, относящиеся к 8 видам (Таблица 1).

Наибольшим видовым разнообразием пауков рода *Pardosa* характеризуется участок с рудеральной растительностью (7 видов), на всех остальных участках количество видов равно 5. Наибольшее количество пауков также было собрано на участке с рудеральной растительностью (197 экз.), самым малонаселенным стал газон за фондовой оранжерей (31 экз.). Самым редким видом явилась *P. prativaga*, а самым многочисленным – *P. amentata*.

Таблица 1 – Видовой состав пауков рода *Pardosa* и количество отловленных особей на исследованных участках Ботанического сада ПГНИУ

Участок	I	II	III	IV
<i>Pardosa agrestis</i> (Westring, 1861)	4	14	4	
<i>Pardosa amentata</i> (Clerck, 1757)	7	65	18	62
<i>Pardosa fulvipes</i> (Collett, 1876)		24	1	
<i>Pardosa lugubris</i> (Walckenaer, 1802)	35	18		8
<i>Pardosa paludicola</i> (Clerck, 1757)	11	8		
<i>Pardosa palustris</i> (Linnaeus, 1758)	4	9	1	16
<i>Pardosa plumipes</i> (Thorell, 1875)		3	1	8
<i>Pardosa prativaga</i> (L. Koch, 1870)				2
<i>Pardosa sp.</i> неполовозрелые	22	56	6	13
Всего	83	197	31	109

Хотя пауки рода *Pardosa* попадали в ловушки на протяжении всего бесснежного периода и даже зимой (Таблица 2), по-настоящему значительный рост попадаемости на всех площадках наблюдается ранней весной и достигает максимума в разгар весны. Ранним летом

наблюдается снижение показателей, а в полное лето они снова возрастают за счет появления в учетах неполовозрелых особей.

Таблица 2 – Попадаемость (экз/100лс) пауков рода *Pardosa* на исследованных участках Ботанического сада ПГНИУ

	Фенопериод	ПВ	РВ	РЗВ	РНЛ	ПЛ	РО	ГО	З
I	<i>Pardosa agrestis</i>			1.0	2.2				
	<i>Pardosa amentata</i>			7.6					
	<i>Pardosa lugubris</i>		16.0	20.6	1.1	1.1			
	<i>Pardosa paludicola</i>		11.0	2.1					
	<i>Pardosa palustris</i>				1.1	3.3			
	<i>Pardosa sp.</i> неполовозрелые			1.0	6.7	14.3	1.3	1.0	
II	<i>Pardosa agrestis</i>			12.0	2.0				
	<i>Pardosa amentata</i>	7.0	20.0	28.0	7.0	2.0			
	<i>Pardosa fulvipes</i>		1.6	20.0	3.0				
	<i>Pardosa lugubris</i>		1.8	3.0	2.0	11.0			
	<i>Pardosa paludicola</i>	2.0	2.0	4.0					
	<i>Pardosa palustris</i>			5.0		4.0			
	<i>Pardosa plumipes</i>			1.0		1.0	1.0		
<i>Pardosa sp.</i> неполовозрелые				6.0	43.0	4.0	3.0		
III	<i>Pardosa agrestis</i>		5.6						
	<i>Pardosa amentata</i>		25.2						
	<i>Pardosa fulvipes</i>		1.4						
	<i>Pardosa palustris</i>			1.4					
	<i>Pardosa plumipes</i>			1.4					
IV	<i>Pardosa amentata</i>		7.8	24.2	3.5	2.8	0.7		5.0
	<i>Pardosa lugubris</i>			4.2	1.4				
	<i>Pardosa palustris</i>		4.2	5.0	0.7		0.7	1.0	
	<i>Pardosa plumipes</i>			5.7					
	<i>Pardosa prativaga</i>				0.7	0.7			

Наиболее ярко эта тенденция проявляется на участке с рудеральной растительностью, который в целом характеризуется большей численностью и разнообразием пауков [1]. Как показано в российских [8, 9, 10] и зарубежных [5, 6, 7] исследованиях доминантами на урбанизированных территориях (парках, садах, деиндустриализированных ландшафтах) часто являются пауки рода *Pardosa*. В ботанических садах России [11, 12] и ближнего зарубежья [13] наиболее многочисленным видом является *P. lugubris*.

На площадках Ботанического сада ПГНИУ в структуре доминантного комплекса присутствует *P. lugubris*, однако она уступает по численности *P. amentata*. Данные по отловленным особям, а также особенности круглогодичного сбора материала, позволяют сделать выводы о фенологии этих видов. Всего было отловлено 61 экземпляр *P. lugubris*: из них 43 самца, 7 самок 11 неполовозрелых особей. На рис. 1 показана динамика попадаемости самцов и самок *P. lugubris* в ловушки на протяжении бесснежного периода 2012 года на участке с естественным травостоем (I).

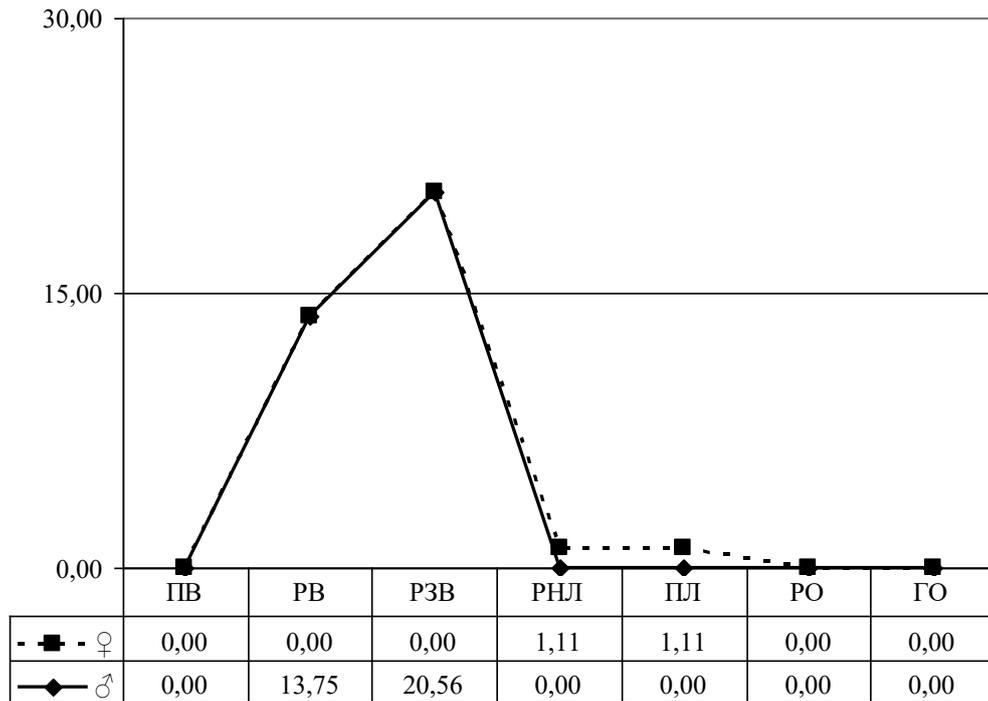


Рисунок 1 – Фенология *P. lugubris* на участке с естественным травостоем (экз/100лс).

Первые особи обоих полов отмечаются в ловушках ранней весной, максимальная попадаемость отмечена в разгар весны, ранним летом наблюдается резкий спад показателей (до нуля в случае самцов, которые до конца сезона в ловушках больше не были зафиксированы). Отдельные экземпляры самок отмечены ранним и полным летом.

Хотя, согласно данным сайта «Spiders of Europe» [3], представители обоих полов *P. lugubris* активны с марта по сентябрь, на всех исследованных площадках Ботанического сада ПГНИУ особи не попадали в ловушки уже с середины августа (ранняя осень).

Вид *P. amentata* влаголюбив и встречается как в лесах, так и на открытых местах [14], на влажных лугах, по берегам рек и ручьев [15]. Из четырех исследованных площадок ботанического сада наибольшее количество особей *P. amentata* было зарегистрировано на участке с рудеральной растительностью (II и IV). Всего было отловлено 152 особи, из которых 90 самцов, 39 самок и 23 неполовозрелых особи. Фенология самцов и самок *P. amentata* показана на рис. 2. и рис. 3.

Данные об активности *P. amentata* (самки активны с февраля по октябрь, а самцы – с марта по октябрь), представленные на сайте «Spiders of Europe» [3], не находят своего подтверждения в условиях Урала ввиду более длительного снежного периода.

В 2012 году первые особи *P. amentata*, как самки, так и самцы, отмечаются в ловушках уже в предвесенье (середина апреля). Попадаемость самцов в ловушки резко возрастает ранней весной и достигает пика в разгар весны. Ранним и полным летом присутствие самцов в пробах незначительное. Попадаемость самок постепенно возрастает с ранней весны и выходит на продолжительное плато, затрагивающее два сезона, разгар весны и раннее лето. Уже полным летом самки попадали в ловушки эпизодически. Таким образом, период активности *P. amentata* на данном участке: с апреля по август.

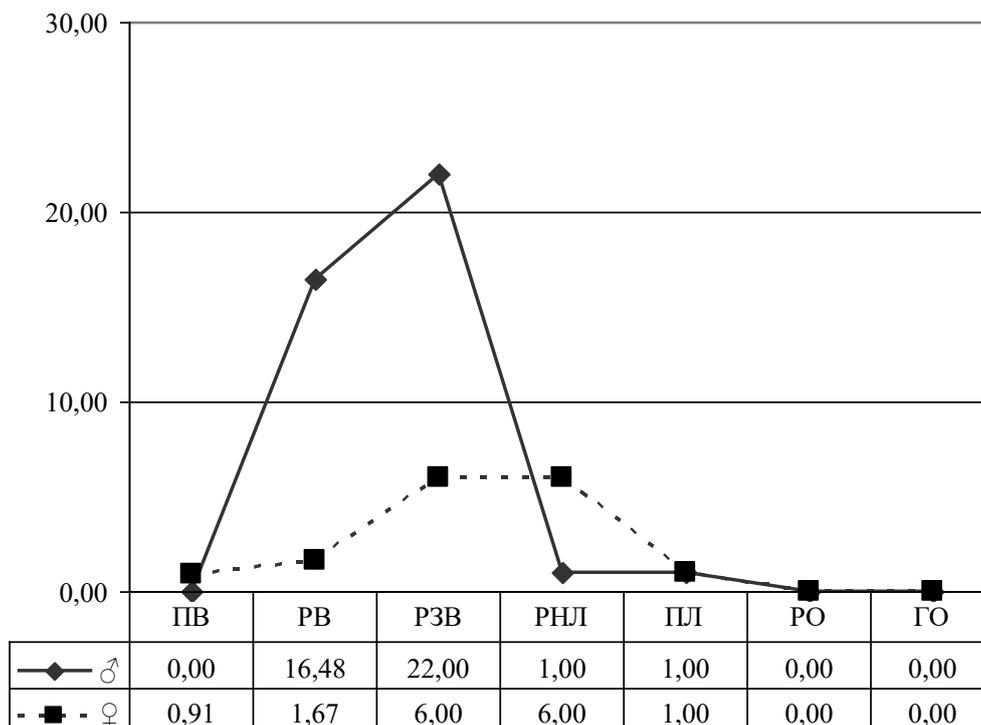


Рисунок 2 – Фенология *P. amentata* на участке с рудеральной растительностью (экз/100лс).

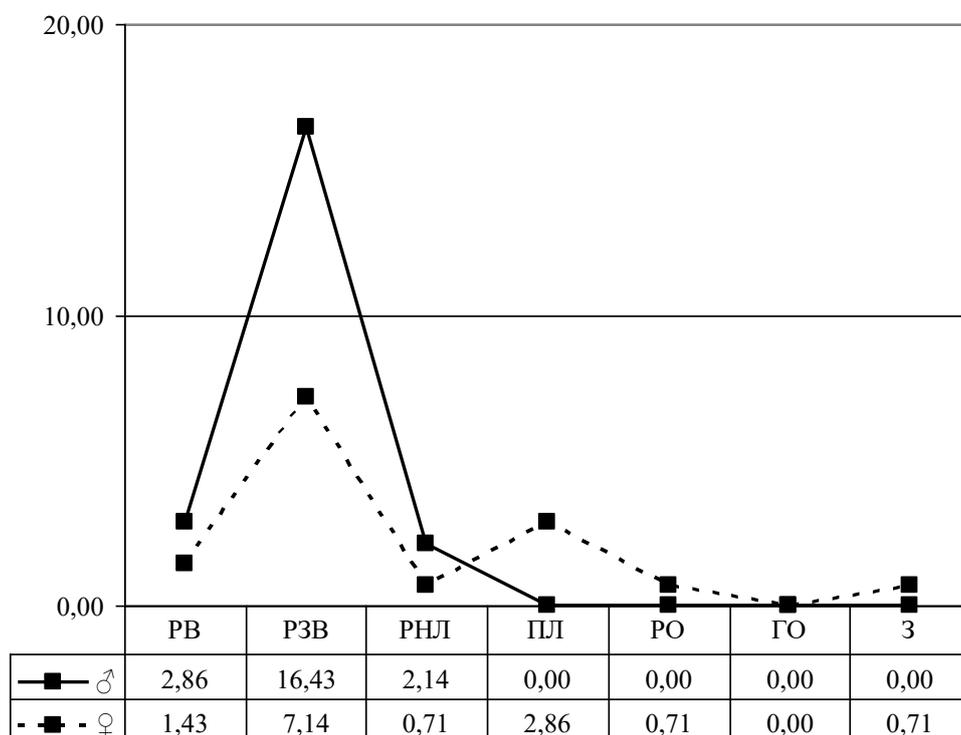


Рисунок 3 – Фенология *P. amentata* на некультивируемом участке за мемориальной оранжерей (экз/100лс).

В 2021 году, первые особи *P. amentata* обоих полов отмечены ранней весной. Резкое увеличение количества самцов и самок в ловушках в разгар весны связано с периодом размножения, после которого, в период раннего лета попадаемость быстро снижается.

Самцов *P. amentata* до конца сезона более не было отмечено. Количество самок, попадающих в ловушки, вновь возрастает полным летом, что связано с активным распространением ими молоди. Некоторое количество самок отмечено ранней осенью, а также зимой (в конце октября – начале ноября). В ловушках, установленных под снежный покров, отмечено два неполовозрелых самца и одна неполовозрелая самка. Таким образом, можно сказать, что на данном участке фенология самок, в целом совпадает с литературными данными.

Библиографический список

1. Плакхина Е.В. Общая характеристика сообщества герпетобионтных пауков некультивируемых участков ООПТ Ботанический сад ПГНИУ // Экологическая безопасность в условиях антропогенной трансформации природной среды. – Пермь. – 2022. – С. 126-130.
2. Экологическая концепция Учебного ботанического сада в рамках научно-инновационного комплекса ПГНИУ // Пермский государственный национальный исследовательский университет: подразделения. URL: <http://www.psu.ru/podrazdeleniya/podrazdeleniya-obespecheniya/botanicheskij-sad/ekologicheskaya-kontseptsiya-uchebnogo-botanicheskogo-sada-v-ramkakh-nauchno-innovatsionnogo-kompleksa-pgniu> (дата обращения 9.10.2022).
3. Nentwig W., Blick T., Bosmans R., Gloor D., Hänggi A., Kropf C. Spiders of Europe. Version 9.2021 // Online version. URL: <https://www.araneae.nmbe.ch> (дата обращения: 9.10.2022).
4. Котюков Б.Н., Ковязин Н.Я. Погода Пермского края. Местные признаки. Фенология. Прогноз. – Пермь: Денор, – 2009. – 92 с.
5. Burkman С.Е. Gardiner М.М. Spider assemblages within greenspaces of a deindustrialized urban landscape // Urban Ecosystems. 2015. – Vol.18. – P.793–818.
6. Dipsikha B., Phalgun Ch. A checklist of spiders in the Botanical garden of Dibrugarh University, Assam, India. 20 // Journal of Life Sciences. – 2022. – Vol.20. – P.29-43.
7. Varet M., Pe´tillon J., Burel F. Comparative responses of spider and carabid beetle assemblages along an urban-rural boundary gradient // Journal of Arachnology. – 2011. – Vol.39. – P.236-243.
8. Белослудцев Е.А. Доминантные виды напочвенных пауков (Arachnida: Aranei) парковых зон г. Самара // Эколого-географические проблемы регионов России. – Самара: Изд-во Самарского государственного социально-педагогического университета, 2017. -С.141-145.
9. Прокопенко Е.В. Структура населения пауков (Aranei) древесных насаждений Донецка // Біологічний вісник МДПУ. – 2013. – № 2. – С. 180–195.
10. Маслова А.А., Прокопенко Е.В. Герпетобионтные пауки ЦПКИО им. Щербакова (г. Донецк) // Охрана окружающей среды и рациональное использование природных ресурсов. Сборник материалов XIII междун. научн. конф. аспирантов и студентов. – Донецк: Изд-во Донецкого политехнического ун-та, 2019. – С.152-155.
11. Пономарев А.В., Шаповалов М.И., Лаптева Л.О. Материалы к изучению фауны пауков (Arachnida: Aranei) ботанического сада Адыгейского государственного университета // Биоразнообразие. Биоконсервация. Биомониторинг. – Майкоп: Изд-во Адыгейского государственного ун-та, 2017. – С. 67-70.

12. Смокотин, Д.И. Структура населения и динамика численности пауков учебного участка Сибирского ботанического сада Томского государственного университета // Молодой ученый. – 2016. – №12 (116). – С. 466-471.
13. Лапаева Н.В. Фауна пауков (Arachnida: Aranei) ельника лещиново-кисличного (*Piceetumcoryloso-oxalidosum*) в ботаническом саду НАН Беларуси // Біорізноманіття та роль зооценозу в природних і антропогенних екосистемах. – Дніпропетровськ, 2005. – С.197-198.
14. Ажеганова Н.С. Пауки-волки (Lycosidae) Пермской области: учебн. пособие. – Пермь, 1971. – 21 с.
15. Тыщенко В.П. Определитель пауков европейской части СССР. – Л.: Издательство «Наука», 1971. – 283 с.

ЗИМОВКА КРЯКВЫ (*ANAS PLATYRHYNCHOS*) В ГОРОДЕ САРАТОВ: ФОРМИРОВАНИЕ, СОСТОЯНИЕ, АДАПТАЦИИ

Пушкова А.Е., Мосолова Е.Ю.

*Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени
Н. Г. Чернышевского, Саратов, Россия*

Аннотация. Приводятся данные по формированию и состоянию зимовок кряквы на территории городского парка им. М. А. Горького г. Саратов и незамерзающих участках акватории Волгоградского водохранилища. Освещаются адаптации вида к жизни на антропогенных территориях.

Ключевые слова: кряква, ООПТ, зимовка, синантропизация.

WINTERING MALLARD (*ANAS PLATYRHYNCHOS*) IN THE CITY OF SARATOV: FORMATION, CONDITION, ADAPTATIONS

Pushkova A.E., Mosolova E.Yu.

FSEI HPE «Saratov National State University named after N.G. Chernyshevsky», Saratov, Russia

Abstract. Data on the formation and condition of mallard wintering grounds on the territory of the city park named after M. A. Gorky, Saratov and non-freezing areas of the water area of the Volgograd reservoir are presented. Adaptations of the species to life in anthropogenic territories are highlighted.

Keywords: mallard, protected areas, wintering, synanthropization.

Птицы – неотъемлемый компонент животного населения городов, вступая в процессы синантропизации и урбанизации, приобретают ряд новых экологических особенностей и адаптаций [1]. Среди водоплавающих птиц, одним из немногих видов, хорошо адаптирующихся к антропогенным факторам и проявляющих склонность к урбанизации, является кряква [2-5]. Данный вид является перелетным видом, но постепенно она уходит от данного образа жизни, оставаясь почти на постоянное время на территории городов [6].

На территории Саратовской области практически отсутствуют постоянные зимние орнитокомплексы [5]. Исключение составляют техногенные водоёмы и участки рек, куда открываются стоки тёплых вод в пределах городской черты. В пределах г. Саратов имеется несколько незамерзающих участков акватории Волгоградского водохранилища, а также небольшие по площади участки открытой воды на прудах в городском парке. Постоянное обилие и стабильность корма, наличие мест для отдыха на воде, привлекает значительное количество уток в городской парк.

По данным Саратовского отделения Союза охраны птиц России, впервые кряквы были встречены на зимовке в г. Саратове в 2011 году, за 11 лет их численность стремительно

увеличивается. Сходные увеличения зимующих уток наблюдается во всех крупных городах европейской части России. Рост городских зимовок связан главным образом с феноменом потепления, усиленным рассеиванием использованной тепловой энергии, а также с подкормкой птиц жителями [7].

Исследования по изучению зимовок кряквы проводились нами в зимние периоды 2020-2022 гг. В ходе проведения исследования осуществлен маршрутный и точечный учет зимующих крякв в Городском парке г. Саратова, на незамерзающих участках акватории Волгоградского водохранилища. При учете в городском парке отмечались места скопления крякв, которые наносились на карту, производилась фотосъемка для дальнейшего точного подсчета особей и изучения половой структуры в стаях. Наблюдения за численностью проводились раз в пентаду, а также внеплановые посещения в дни резкой смены температурного режима и выпадения осадков с фиксацией погодных условий. Оценивалась интенсивность питания, выраженная в количестве людей, кормящих птиц в час [8, 9]. Статистическую значимость связи различных показателей оценивали методами корреляционного анализа, а также методом множественной регрессии с применением пакета программ для анализа данных – Past 4.0.

В 2020 г. окончательное формирование зимовки в парке произошло во третьей декаде ноября.

В марте, несмотря на отлет птиц для гнездования и размножения, с понижением температуры до -15°C 11.03.2020 г., численность уток резко возросла, составив 1066 особей, а затем вновь стабилизировалась.

На протяжении всего зимнего периода прослеживается изменение численности уток в след за изменением температурных показателей. При длительном периоде минусовых температур число особей увеличивается, а при оттепели – снижается.

В осенне-зимний период 2021-2022 гг. численность кряквы в Городском парке значительно увеличилась по сравнению с сезоном предыдущего года. Отметку в 1000 особей удалось зафиксировать уже в октябре, а к февралю максимальное число уток составило порядка 1300 особей, при этом ощутимого понижения температуры воздуха (ниже -10°C) не наблюдалось. Вероятно, данный вид водоплавающих более активно стал переходить к оседлому образу жизни и зимовать на территории с постоянной подкормкой. Обеспечение со стороны человека постоянным кормом оказывает влияние как на распределение уток по территории парка, так и на их количество в общем. Так, в будние дни утки преимущественно концентрируются в местах с наибольшей проходимостью человека: у входов в городской парк и по постоянным маршрутам людей, в то время как в выходные дни распределение кряквы больше зависит от наличия открытой воды, что связано с тем, что в это время посещаемость парка выше, и люди не просто следуют через городской парк, а приходят сюда специально, в том числе кормить птиц. В зимний период 2020-2021 гг. наибольшее количество крякв (1262 особи) зафиксировано 23.02.21. Температурный показатель в этот день достиг отметки в -23°C , в то время как зимой 2021-2022 гг. максимальный показатель составил 1310 особей в декабре после длительного периода минусовых температур. В январе численность уток менялась незначительно – не более чем на 30 особей, а в феврале в связи с более частым появлением положительных температур, численность стала сокращаться.

Расчет коэффициента корреляции и регрессионный анализ показали, что численность отрицательно коррелирует с морозами и осадками, вероятно это связано с уменьшением площадей открытой воды и количеством посетителей парка, оказывающих подкормку птицам. А также указали на статистически значимую положительную связь между количеством людей, подкармливающих уток и численностью крякв. Места концентрации уток при низких

температурах (-15-20°C) располагаются на участках, прилегающих к выходам и местам с наибольшей подкормкой от населения. Птицы размещаются небольшими группами, в которых преобладают самцы или парами, некоторые из которых переходят к оседлому образу жизни.

Адаптации кряквы к жизни в городе, рядом с человеком, разнообразны. Прежде всего, изменение типа питания. В естественной среде обитания в их рационе преобладает растительная пища, с периодическим увеличением доли животного корма в определенные периоды. В городских условиях всеядность крякв резко возрастает: они питаются пищевыми отходами, зерном, хлебопродуктами, часто поглощая пищу большими кусками и без воды, что также доказывается встречаемостью нескольких особей крякв на территории детского парка г. Саратова, где водоемы отсутствуют. Сезонные, а также суточные перелеты, переход к дневному образу жизни, более раннее размножение также считаются адаптациями к городской среде.

Фактор беспокойства является одной из причин, по которой численность крякв в их среде обитания колеблется. Однако на территории городских водоемов, с частым посещением людей, утки способны приближаться к человеку на очень короткие дистанции, брать корм из рук, а отдыхают чаще в местах доступности человека, что свидетельствует о том, что данный вид птиц с каждым годом все больше привыкает к людям. Однако, летом кряквы, особенно самки с утятами, становятся более осторожными, но часто способны подплывать к людям.

Дистанция вспугивания зимой составляет 0,5-3 метра, в то время как летом расстояние увеличивается до 10 метров, в естественной среде, где человек появляется крайне редко, дистанция вспугивания составляет 100-150 м. Однако, часть птиц ведет себя куда более осторожно, вероятнее всего именно данные особи являются пролетными [10, 11].

Библиографический список

1. Рахимов, И. И. Авифауна Среднего Поволжья в условиях антропогенной трансформации естественных природных ландшафтов: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.16. – М., 2002. – 42 с.
2. Авилова К.В. История формирования городской группировки кряквы в Москве // Казарка. 2005. №7. С. 240-255.
3. Соловьев А.Н. Зимовки перелетных видов птиц в средних широтах востока Русской равнины // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2012. Т. 117, вып. 3. С. 3 – 16.
4. Kelcey J.G., Rheinwald G. Ed. Birds in European Cities. / GINSTER Verlag. St.Katharinen, 2005. P. 1– 450.
5. Шляхтин Г.В., Завьялов Е.В., Табачишин В.Г., Птицы Саратова и его окрестностей: состав, охрана и экологическое значение. Саратов: Изд-во Сарат. ун-та., 1999. 124 с.
6. Шеварева, Т. П. Популяционные особенности миграции птиц / Т. П. Шеварева // Орнитология. – 1965. – Вып. 7. – С. 318-327.
7. Авилова К.В., Полежанкина П.Г. Зимовки водоплавающих птиц в городах России (по материалам акции «Серая Шейка») // Сборник материалов Второй международной орнитологической конференции. – Москва. 2021. С. 12-16.
8. Polakowski M., Skierczyński M., Broniszewska M. Effect of urbanization and feeding intensity on the distribution of wintering Mallards *Anas platyrhynchos* in NE Poland // *Ornis svecica*. 2010. V. 20. P. 76–80.
9. Hammer O., Harper D. A. T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics software package for education and data analysis // *Paleontologia Electronica*. 2001. Vol. 4, No 1. P. 1 – 9.
10. Харченко, Н. Н. Охотоведение / Н. Н. Харченко. – М: МГУЛ. – 2002. – 370 с.
11. Клипперт, К. К. Материалы по размножению кряквы *Anas platyrhynchos* // Русский орнитологический журнал. – 2002. – Экспресс выпуск. – №191. – С. 687-689.

ОЦЕНКА УРОВНЕЙ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ТРЕСКЕ ТИХООКЕАНСКОЙ (*GADUS MACROCEPHALUS*) ИЗ БЕРИНГОВА МОРЯ

Ржечицкая К.Е., Цыганков В.Ю.

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

Аннотация. Исследованы уровни содержания хлорорганических пестицидов (ХОП) в треске тихоокеанской (*Gadus macrocephalus*) из Берингова моря. Наиболее часто встречаемые соединения – *n,n'*-ДДЕ в мышцах и *n,n'*-ДДД в печени, β -ГХЦГ в обоих органах – говорят о давнем поступлении токсикантов в среду. Метаболиты ДДТ преобладают над изомерами ГХЦГ. Наблюдается следующая тенденция накопления: мышцы > печень. По сравнению с другими районами уровни содержания ХОП в Беринговом море можно считать «условно-фоновыми».

Ключевые слова: ДДТ, ГХЦГ, треска, *Gadus macrocephalus*, Берингово море.

ASSESSMENT OF LEVELS OF ORGANOCHLORINE PESTICIDES IN PACIFIC COD (*GADUS MACROCEPHALUS*) FROM BERING SEA

Rzhechitckaia K. E., Tsygankov V. Yu.

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

Abstract. Levels of organochlorine pesticides (OCPs) were studied in Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) from Bering sea. The most common compounds were *n,n'*-DDE in muscles, *n,n'*-DDD in liver, β -HCH in both organs, which meant toxicants had infiltrated into environment long time ago. The concentration of DDT metabolites was higher than of HCH isomers. There was tendency of accumulation: muscles > liver. Compared to other regions, levels of OCPs in Bering sea may be considered as «conditionally background».

Keywords: DDT, HCH, cod, *Gadus macrocephalus*, Bering sea.

Введение. К числу стойких органических загрязнителей (СОЗ) относятся хлорорганические пестициды (ХОП), известные своим токсичным воздействием. Их наличие в окружающей среде является результатом хозяйственной деятельности человека [1]. Они обладают высокой стойкостью и способностью циркулировать в окружающей среде в течение длительного времени. ХОП могут преодолевать большие расстояния, так как важную роль в процессах миграции играет перенос воздушных масс [1,2]. Особое значение имеют изомеры гексахлорциклогексана (ГХЦГ), дихлордифенилтрихлорэтан (ДДТ) и его метаболиты – дихлордифенилдихлорэтилен (ДДЕ) и дихлордифенилдихлорэтан (ДДД). ДДТ ранее применялся для борьбы с насекомыми, переносящими малярию и брюшной тиф [3].

В настоящее время ДДТ включен в «грязную дюжину» Стокгольмской конвенции и запрещен для производства и использования. Исключение составляют ряд стран Азии (Индия, Китай) и Африки [4].

Берингово море является самым северным и крупным по площади среди всех дальневосточных морей [5]. На юге море отделено от Тихого океана грядой Алеутских и Командорских островов, на севере – от Северного Ледовитого океана Беринговым проливом. Площадь моря составляет, по разным оценкам, от 2,26 до 2,31 млн км², а объем вод – от 3,69 до 3,80 млн км³ [6]. Наличие ХОП в экосистеме Берингова моря обусловлено глобальным атмосферным переносом, морскими течениями, биотранспортном мигрирующих организмов, поскольку акватория удалена от источников загрязнения [7].

Треска тихоокеанская – один из важных промысловых объектов дальневосточных морей, в том числе и Берингова моря. Ее мышцы богаты белками и аминокислотами. Она является потенциальным объектом мониторинга из-за образа жизни – это пелагическая рыба, которая может проникать на глубину до 500–600 м в поисках пищи [8]. Для нее характерно широкое видовое разнообразие пищевого спектра, который включает до 120 видов [9]. В отличие от атлантической трески, тихоокеанская ведет более оседлый образ жизни, ее икра развивается над грунтом [10]. Постоянный мониторинг концентраций ХОП в ее органах способен дать целостную характеристику о загрязнении морской среды Берингова моря.

В связи с этим, целью работы явилась оценка уровней содержания хлорорганических пестицидов (ХОП) в треске тихоокеанской *Gadus macrocephalus* из Берингова моря.

Материалы и методы. Сбор материала осуществлен в ходе комплексной морской экспедиции, реализуемой Тихоокеанским филиалом Всероссийского научно-исследовательского института рыбного хозяйства и океанографии (ТИНРО) в 2020 году. У особей проанализированы образцы мышц и печени. Длина тела составила от 445 до 680 мм, приблизительный возраст – от 4 до 6–7 лет. Процент жира в мышцах варьировал от 0,19 до 1,77%, в печени – от 13,50 до 28,42%. Для определения содержания хлорорганических пестицидов (ХОП) использовалась стандартная методика пробоподготовки [11]. Определение проводилось при помощи газового хроматомасс-спектрометра Shimadzu GC MS-QP 2010 Ultra.

Результаты и обсуждение. Средняя суммарная концентрация ХОП (Σ ДДТ + Σ ГХЦГ) в треске тихоокеанской составила $2367,1 \pm 4747,1$ нг/г липидов и находилась в пределах от 1,6 до 13704,9 нг/г липидов. В мышцах суммарные уровни содержания ХОП варьировали от 6,4 до 13704,9 (средняя величина – $4969,2 \pm 6018,9$) нг/г липидов, в печени – от 1,6 до 201,8 (средняя – $25,2 \pm 62,1$) нг/г липидов. В мышцах суммарная концентрация ГХЦГ составила от 0,4 до 220,9 (средняя – $54,4 \pm 66,5$) нг/г липидов. В печени общая концентрация ГХЦГ варьировала в пределах от 0,4 до 6,1 (средняя – $2,7 \pm 1,7$) нг/г липидов. Концентрации ДДТ в каждой особи были ниже пределов обнаружения. Общая концентрация ДДД и ДДЕ в мышцах находилась в диапазоне 7810,9–13679,4 (средняя величина – $11058,3 \pm 2534,1$) нг/г липидов. Суммарный уровень содержания ДДЕ и ДДД в печени варьировал от 0,5 до 195,7 (средняя – $22,5 \pm 60,9$) нг/г липидов.

Берингово море удалено от источников загрязнения стойких органических веществ, поэтому наличие ХОП в треске обусловлено глобальным загрязнением Мирового океана. В особях обнаружены все исследуемые соединения, кроме ДДТ. Из его метаболитов наибольшую концентрацию имел *n,n'*-ДДЕ.

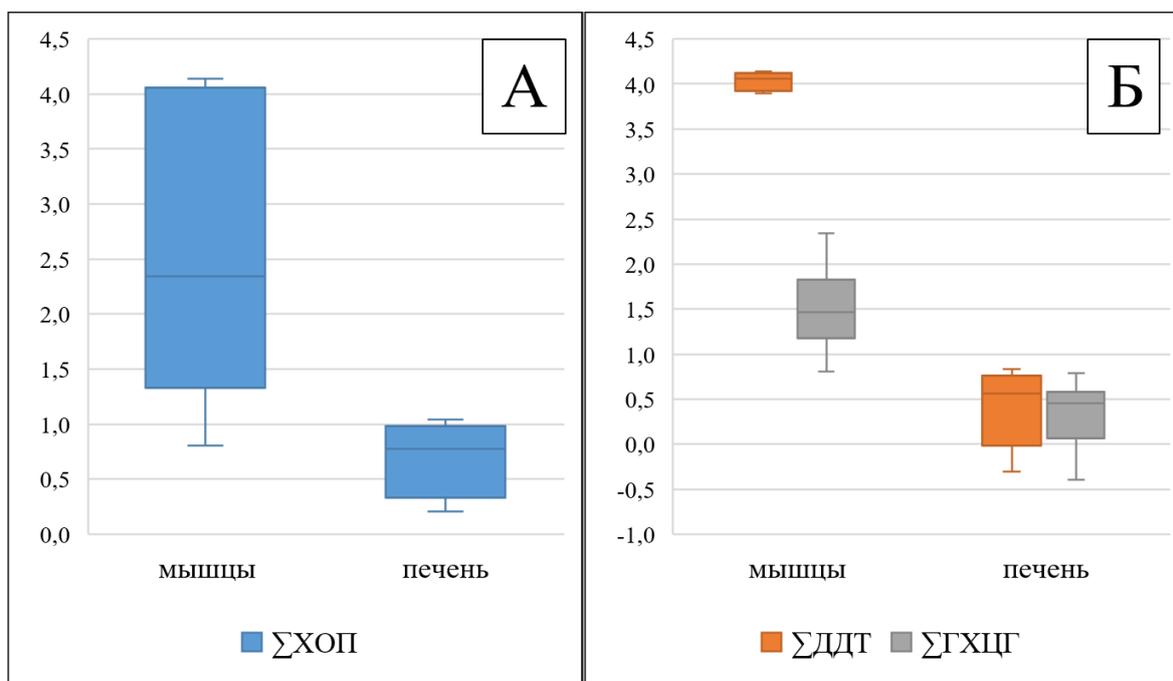


Рисунок 1 – логарифмы суммарных концентраций: А – ХОП (Σ ДДТ + Σ ГХЦГ); Б – метаболитов ДДТ и изомеров ГХЦГ.

Наиболее часто встречаемыми соединениями стали n,n' -ДДЕ в мышцах и n,n' -ДДД – в печени. В мышцах и печени из изомеров ГХЦГ преобладал наиболее стойкий в среде – β -ГХЦГ. Линдан и α -ГХЦГ обнаружены в небольшом количестве. Накопленные концентрации являются следствием давнего поступления токсикантов в экосистему Берингова моря.

Для гидробионтов существенную роль играет непосредственный контакт с окружающей средой [2]. Кроме того, икра трески тихоокеанской развивается над грунтом, куда ДДТ и продукты его трансформации постепенно оседают в процессе циркуляции. В составе органов трески метаболиты ДДТ имели большую концентрацию, чем изомеры ГХЦГ (рис. 1, б) – возможно, ДДД и ДДЕ проникли в органы в результате соприкосновения трески с внешней средой, где они находились в большом количестве. Другой причиной может быть поступление вместе с пищей. Треска тихоокеанская является хищником, поедающим как донных, так и пелагических животных – более зрелые особи способны проникать на большую глубину в поисках пищи [12]. Треска находится на вершине трофической цепи – вполне вероятно, что ДДД и ДДЕ накопились в органах и вследствие биомагнификации.

Исходя из данных, можно сказать, что наблюдалась следующая тенденция накопления ХОП: мышцы > печень (рис. 1, а). Ведущая роль печени, в отличие от мышц, заключается в метаболизме веществ. Стоит предположить, что ХОП в органах давно аккумулируют, так как в мышцах обнаружены большие концентрации определенных метаболитов, а печень могла их вывести со временем. И это объясняет давнее загрязнение экосистемы.

Ранее проводилась оценка содержания ХОП в треске атлантической (*Gadus morhua*) из других районов Мирового океана (рис. 2). Наибольшее количество ГХЦГ, ДДТ и его метаболитов найдено в Балтийском море [13]. В Баренцевом море отмечается низкий уровень загрязнения – по норвежской классификации, концентрации ХОП соответствовали категории «незначительное загрязнение» [14]. В акваториях вблизи восточных берегов США и Канады отмечается большое количество ДДТ и его метаболитов вследствие высокого уровня

урбанизации. Суммарная концентрация ХОП в печени трески из Берингова моря, в целом, ниже, чем в остальных районах. В мышцах уровень содержания ГХЦГ ниже, чем в других акваториях, однако общая концентрация ДДТ и его метаболитов выше, чем в Баренцевом море. В целом, концентрации ХОП в Беринговом море можно считать «условно-фоновыми».

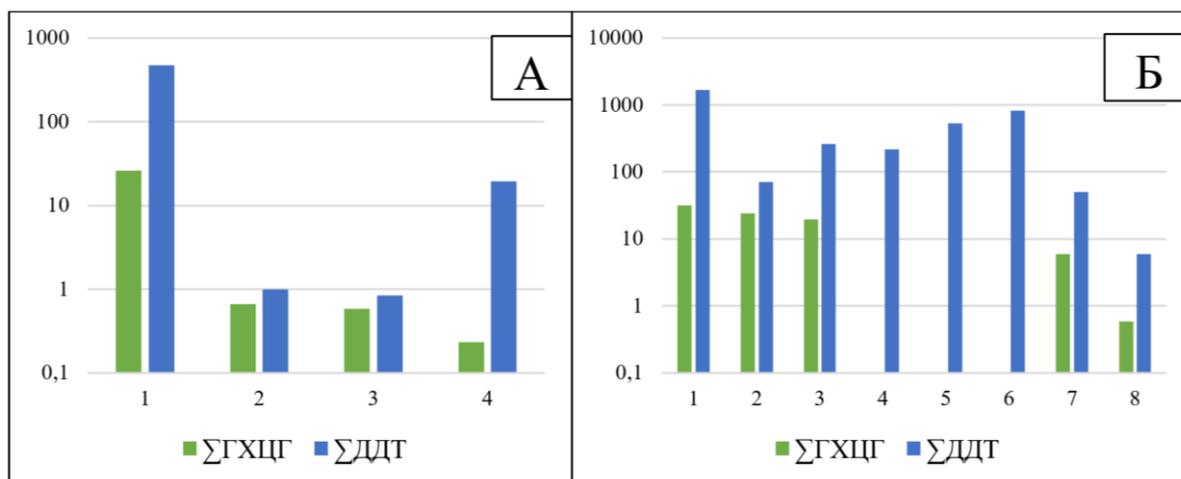


Рисунок 2 – суммарные концентрации ДДТ и ГХЦГ в органах (А – в мышцах; Б – в печени) трески из разных районов Мирового океана, нг/г сырой массы:

А) 1 – 2003 год, юг Балтийского моря [13]; 2 – 2016 год, Баренцево море [14]; 3 – 2018 год, Баренцево море [15]; 4 – Берингово море (эта работа);

Б) 1 – 2003 год, юг Балтийского моря [13]; 2–3 – 2003–2004 год, George’s Bank, Gulf of Maine, женские (2) и мужские (3) особи; 4 – 2003–2004 год, Stellwagen Bank, Gulf of Maine; 5–6 – 2003–2004 год, Wilkinson Basin, женские (5) и мужские (6) особи [16]; 7 – 2016 год, Баренцево море [14]; 8 – Берингово море (эта работа).

Выводы. Таким образом, исследовано содержание хлорорганических пестицидов (ХОП) в треске тихоокеанской (*Gadus macrocephalus*) из Берингова моря. Наличие ХОП в организмах рыб говорит о влиянии глобального загрязнения Мирового океана. Треска тихоокеанская, наиболее вероятно, подвергалась «старому» хроническому загрязнению. В ее органах преобладали метаболиты ДДТ, которые могли попасть при непосредственном контакте с окружающей средой, либо в процессе питания. По сравнению с другими районами Мирового океана, в треске Берингова моря ХОП обнаружены в меньшем количестве, в связи с чем их уровни содержания можно считать «условно-фоновыми».

Библиографический список

1. Цыганков, В.Ю. "Грязная дюжина" Стокгольмской конвенции. Химия и токсикология стойких органических загрязняющих веществ (СОЗ): обзор литературы // Стойкие органические загрязняющие вещества (СОЗ) в Дальневосточном регионе: моря, организмы, человек: коллективная монография. – Владивосток: Дальневосточный федеральный университет, 2020. – С. 12–61.
2. Ровинский Ф.Я. Фоновый мониторинг загрязнения экосистем суши хлорорганическими соединениями: монография. / Ф.Я. Ровинский, Л.Д. Воронова, М.И. Афанасьев [и др.]. – Гидрометеиздат, 1990. – 270 с.

3. DDT and its derivatives: environmental aspects // International program on chemical safety. – Geneva: World Health Organization, 1989. – 98 p.
4. Van den Berg, H. Global Status of DDT and Its Alternatives for Use in Vector Control to Prevent Disease // Environmental Health Perspectives, 2009. – Vol. 117 – pp. 1656–1663.
5. Добровольский А.Д. Моря СССР / А.Д. Добровольский, Залогин Б.С. – М.: Изд-во Московского ун-та, 1982. – 192 с.
6. Шунтов В.П. Биология дальневосточных морей России: монография – Владивосток: ТИНРО–центр, 2001. – Т. 1. – 580 с.
7. Tsygankov, V.U. Organochlorine pesticides in marine ecosystems of the Far Eastern Seas of Russia (2000–2017) // Water research, 2019. – Vol. 161 – pp. 43-53.
8. Савин, А.Б. Нерестилища тихоокеанской трески *Gadus macrocephalus* в северо–западной части Тихого океана // Известия ТИНРО, 2016. – № 187 – С. 48–71.
9. Токранов А.М. Питание восточнокамчатской трески // Тресковые дальневосточных морей. Владивосток: ТИНРО. 1986. – С. 102-111.
10. Треска тихоокеанская – представитель семейства... – [эл. ресурс] – Режим доступа: <http://www.npacific.ru/np/library/encicl/19/0017.htm>. Дата обращения – 05.10.2022 г.
11. Патент № 2741367 С1. Российская Федерация, МПК G01N33/483, G01N30/04, G01N1/28. Способ подготовки пробы для газохроматографического определения хлорорганических соединений в биоматериале: № 2020130043: заявл. 14.09.2020: опубл. 25.01.2021 / Ю.П. Гумовская, А.Н. Гумовский, В.Ю. Цыганков [и др.]. 9 с.
12. Напазаков, В.В. Питание и некоторые черты экологии тресковых рыб западной части Берингова моря в летне–осенний период / В.В. Напазаков, В.И. Чучукало, Н.А. Кузнецова [и др.] // Известия ТИНРО, 2001. – № 128 – С. 907–928.
13. Szlinder–Richert, J. Organochlorine pesticides in fish from the southern Baltic Sea: levels, bioaccumulation features and temporal trends during the 1995–2006 period / J. Szlinder-Richert, I. Barska, J. Mazerski, Z. Usydus // Marine Pollution Bulletin, 2008. – № 56 – pp. 927–940.
14. Лаптева, А.М. Хлорированные углеводороды и микроэлементы в промысловых рыбах Баренцева моря / А.М. Лаптева, Н.Ф. Плотыцина // Природные ресурсы, их современное состояние, охрана, промысловое и техническое использование: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию рыбохозяйственного образования на Камчатке. – Петропавловск-Камчатский, 2017. – С. 132-136.
15. Жилин, А.Ю. Мониторинг персистентных хлорированных углеводородов в промысловых рыбах Баренцева моря / А. Ю. Жилин, Н. Ф. Плотыцина, Т. А. Зимовейскова // Экологические проблемы северных регионов и пути их решения: Тезисы докладов VII Всероссийской научной конференции с международным участием, посвященной 30-летию Института проблем промышленной экологии Севера ФИЦ КНЦ РАН и 75-летию со дня рождения доктора биологических наук, профессора В.В. Никонова. – Апатиты, 2019. – С. 123-125.
16. Monosson, E. Comparison of PCBs, organochlorine pesticides, and trace metals in cod liver from Georges Bank and Stellwagen Bank, USA and Canada / E. Monosson, D. Lincoln // Marine Pollution Bulletin, 2006. – №52 – pp. 572–597.

АНАЛИЗ ТЕРМОФИЛЬНОСТИ МИКСОМИЦЕТОВ ГОРОДА КАЗАНИ И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ

Садыков Р.Э.¹, Потапов К.О.¹, Садыкова Ю.Р.²

¹ *Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия*

² *Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации», Пермь, Россия*

Аннотация. В статье приведены результаты изучения разнообразия миксомицетов города Казани и его окрестностей в зависимости от температурного фактора. Описана методика сбора и анализа систематической принадлежности миксомицетов. На географических территориях с большим количеством валежной древесины обнаружено 75 морфовидов миксомицетов. Наибольшее разнообразие отмечено при температурах от 10°C до 15°C.

Ключевые слова: миксомицеты, температура окружающей среды, Казань и окрестности.

THERMOPHILICITY ANALYSIS OF MYXOMYCETES DISTRIBUTION IN KAZAN CITY AND ITS SURROUNDINGS

Sadykov R.E.¹, Potapov K.O.¹, Sadykova Y.R.²

¹ *Kazan (Volga-region) Federal University, Kazan, Russia*

² *Perm National Institute of National Guard Troops of the Russian Federation, Perm, Russia*

Abstract. The article presents result of studying of myxomycetes in Kazan city and its surroundings depending on the temperature factor. Described the technique of collecting and systematic analyzing of myxomycetes. Seventy-five species recorded on different localities with deadwood as a main microhabitat for it. The most of diversity noted at a temperature from 10°C to 15°C.

Ключевые слова: myxomycetes; environment temperature; Kazan and surroundings.

Миксомицеты – узкая группа почвенных сапротрофов, сочетающих в себе представителей наиболее поздней эволюционной ветки амебодных простейших [1]. Первые данные по изучению этой группы организмов приводятся в конце XIX века, однако активное исследование биоразнообразия и экологических характеристик миксомицетов по отношению к факторам среды и другим организмам началось только в 90-х годах XX века посредством совместной работы биологов-экологов Новожилова Ю.К. в России, М. Шниттлера в ФРГ и С. Стефенсона в США [2]. В настоящий момент интерес к изучению и биоразнообразия, и экологии миксомицетов усиливается по мере развития экологического и математического подхода в общебиологических исследованиях, в том числе, и в нашей стране.

Одним из важнейших внешних лимитирующих факторов для существования биоты, в том числе, для миксомицетов, является температура окружающей среды. В рамках

лонгитюдного исследования биоразнообразия миксомицетов в Республике Татарстан на территориях лесных и заболоченных экосистем города Казани и его окрестностей был проанализирован фактор влияния температуры на распространенность миксомицетов.

Объекты и методы. Картограмма исследуемых территорий представлена на рисунке 1. Зоны 1-3 относятся к бореальным и бореально-неморальным, а зоны 4-7 – к неморальным территориям республики Татарстан. Материалом для исследования были образцы спороношений (плодовые тела миксомицетов), отобранные маршрутно-площадным методом путем визуального осмотра потенциальных микроместообитаний миксомицетов с мая 2020 по ноябрь 2021 года. Выбор географических локалитетов не случаен, – на всех обследуемых территориях встречается большое количество валежной древесины, – основного местообитания миксомицетов.

Пробные площадки закладывались в размерах 50 х 50 метров. При обнаружении спороношения срезались ножом вместе с кусочком субстрата и помещались на клей «Момент Кристалл» в этикетированные контейнеры, сделанные из спичечных коробков. Для каждого отобранного образца указывалась дата сбора, тип растительной ассоциации, микроместообитание миксомицета, географический объект, координаты точки сбора, проводилась фотофиксация спороношений. Каждые 3 часа в дни сбора регистрировалось значение температуры воздуха.

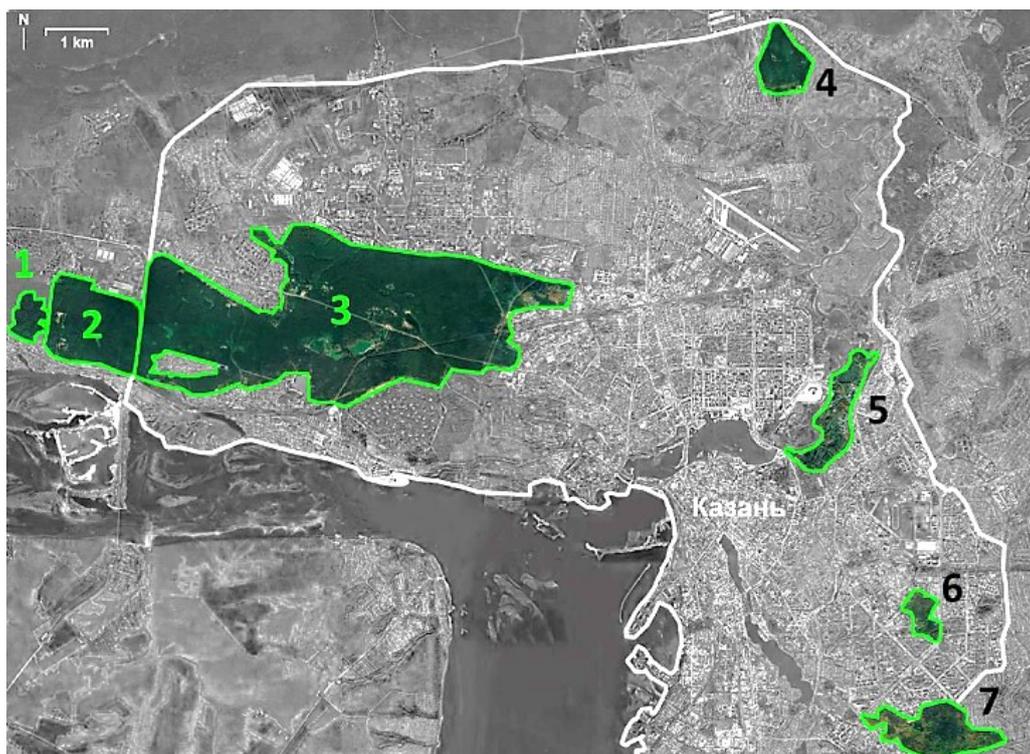


Рисунок 1 – Изучаемые территории города Казани и его окрестностей:

1. Овражные системы в окрестностях ст. «Обсерватория»; 2. Лесной массив в окрестностях МУБ «Займище»; 3. ООПТ «Лесопарк Лебяжье»; 4. ООПТ «Голубые озера»; 5. ООПТ «Русско-Немецкая Швейцария»; 6. Горкинско-Ометьевский лес; 7. Лесопарк «Дубрава».

Видовой состав отобранных образцов миксомицетов определялся бинокулярным осмотром морфологической структуры спороношений и после микроскопии микропрепаратов, путем которой изучалась характеристика микроструктур миксомицетов (размер и

орнаментация спор, капиллиция, орнаментация перидия и т.п.) [3]. Использовали ключ [4- 6; 7]. Оценку редких видов давали в соответствии описаниям, приведенным в научной литературе последних лет [8]. Актуальность номенклатуры вида устанавливали по мировой базе данных eumycetozoa.com. Всего было обработано 374 полевых объекта. Полученные образцы переданы на хранение в гербарную коллекцию на кафедре общей экологии ИЭиП КФУ.

Анализ термофильности проводился на основе распределения видов вдоль температурного градиента. Большинство видов, обнаруженных 1-3 раза, исключались из анализа из-за малой выборки, не позволяющей дать оценку в градиенте. Распределение оценивалось по частотам встречаемости видов в различные температуры, в интервале от -2°C до $+40^{\circ}\text{C}$. Построение точечной диаграммы проводилось в М. Excel 2013, а затем методом сплайновой интерполяции на основе векторной графики в Adobe Photoshop CC 2019 строились кривые температурных оптимумов наиболее распространенных видов, по которым происходила их классификация по температурной приуроченности.

Результаты и обсуждение. При обследовании территорий города Казани и его окрестностей было обнаружено 75 морфовидов, в том числе зарегистрированы редкие для мира вида. Так, в работах И.В. Землянской и Ю.К. Новожилова (2022) также отмечается насыщенность исследуемого экотона миксомицетами [9].

В основе нашего анализа лежал важнейший аспект аутоэкологии миксомицетов, связанный с влиянием температуры на их жизненную активность, так как возможность формирования спороношения определяется тем, что плазмодий миксомицетов представляет собой слизевую форму, практически полностью состоящую из воды, а гидратация прямо зависит от окружающей температуры.

В ходе работы получен массив усредненных суточных температур спороношения обнаруженных миксомицетов. На основании построения сплайнов были составлены кривые частот температурного существования наиболее распространенных видов и, соответственно, определены температурные оптимумы для каждого из них (рис. 2).

По характеру расположения оптимумов были выделены психрофильные, мезофильные и термофильные группы спороношения миксомицетов. В рамках мезофильных видов могут быть рассмотрены две подгруппы. По характеру выраженности пессимальных областей определялась облигатность и факультативность психро- и термофилов.

К психрофильным миксомицетам (рис. 2: а) относятся виды, оптимальное время спороношения которых находится в условиях относительно холодного климата, при температурах от -5°C до $+7^{\circ}\text{C}$. Для формирования плодовых тел в таких условиях, плазмодию необходимо обладать набором определенных адаптаций, среди которых повышенная скорость передвижения, характерная фанероплазмодиям типа *Trichiales*, преимущественно представляющих эту группу (6 видов). Или обладать морфологией, позволяющей перемещаться у поверхности потенциальной области спороношения, изолированно от внешней среды. Возможно, это послужило распространению *C. vulgaris*, обладающего микроскопическими протоплазмодиями, функционирующими глубоко в складках коры.

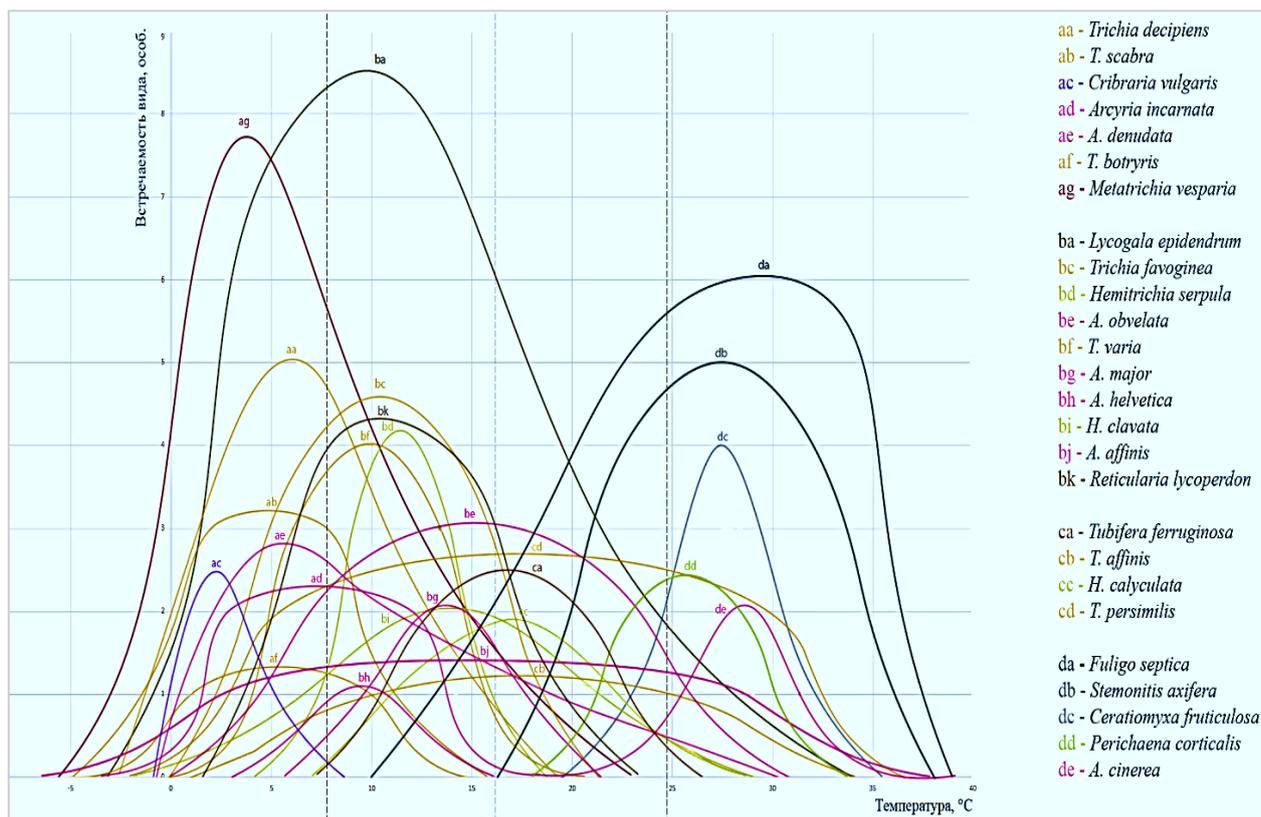


Рисунок 2 – Частоты спороношения наиболее распространенных миксомицетов в градиенте температур: aa-ag – психрофилы; ba-bk, ca-cd – мезофилы; da-de – термофилы.

Облигатными психрофилами, на основе имеющихся данных, можно считать *T. scabra*, *C. vulgaris* и *T. botrytis* (рис. 3: а). Факультативными: *T. decipiens*, *A. incarnata*, *A. demudata*, *M. vesparia*.

Мезофильные миксомицеты (рис. 2: b, c) – виды, распространенные в условиях средних температур, с 7°C до 24°C. Наибольшие пики приходятся на температурные пределы 10-15°C, наиболее благоприятные для поддержания гидростатики плазмодиев и приемлемой влажности атмосферы для жизнедеятельности организмов-зоохоров [10].



а – *T. scabra*
 масштаб 5 мм



б – *H. Serpula*
 масштаб – 5 мм



с – *A. cinerea*
 масштаб – 5 мм

Рисунок 3 – Миксомицеты – представители психро-, мезо- и термофилов (фото авторов).

Такие температуры в условиях умеренного пояса выступают косвенным фактором при наиболее высоком осадочном увлажнении местообитаний. В результате в этих условиях распространились 14 видов-доминантов из порядков *Trichiales* и *Reticulariales* (рис. 3: b). Внутри группы выделяются непосредственно мезофилы (рис. 2: b), занимающие порядка 80% группы и термомезофилы (рис. 2: c), представленные только четырьмя видами.

Термофильные миксомицеты (рис. 2: d) представлены видами, в естественных условиях, ассоциированных с повышенными температурами в границе от 25°C до 40°C. Такие виды должны обладать специфическими адаптациями плазмодия. Так, в рамках этой группы рассматриваются представители *Stemonitidales*, обладающие афаноплазмодием, у которого отсутствует слизевый чехол на поверхности, то есть, нет необходимости в существовании постоянного увлажнения. Помимо этого, формирование спорангиев у этих видов происходит субгипоталлически без образования конечного перидия, что говорит о структуре спор, эволюционно слагаемой при относительно высоких температурах. Также, широкое распространение в таких условиях получили представители *C. fruticulosa*, вообще образующие споры экзогенно и поддерживающие гидростатическую неслизевую форму при формировании спор. Из обнаруженных миксомицетов *P. corticalis*, *A. cinerea* и *C. fruticulosa* являются облигатными термофилами (рис. 3: c), *F. septica* и *S. axifera* – факультативными.

Таким образом, установлено, что температурный фактор является важным экологическим критерием распространенности и разнообразия миксомицетов. В результате проведенного исследования на территориях распространения миксомицетов на территории города Казани и его окрестностей за период с мая 2020 года по ноябрь 2021 года был собран и обследован обширный биологический материал, установлена систематическая принадлежность обнаруженных образцов миксомицетов. При анализе влияния температуры окружающей среды на спороношения миксомицетов на обследуемых локациях было выделено три группы миксомицетов: психрофильные, мезофильные и термофильные, при этом наибольшее их разнообразие приурочено к температурному интервалу 10-15°C. Подтверждено, что для существования в холодных и жарких условиях миксомицеты обладают определенными адаптациями плазмодия и онтогенеза.

Библиографический список

1. Gray W.D., Alexopoulos C.J. Biology of the Myxomycetes. – New York: The Ronald Press Company, 1968.
2. Novozhilov, Y.K., Schnittler, M., Stephenson, S.L. Myxomycetes of the Taimyr Peninsula (north-central Siberia). – Karstenia 39. – 1999. Pp. 77-97.
3. Новожилов Ю.К. Определитель грибов России: Отдел Слизевики. Класс Миксомицеты. Вып. 1. – СПб: Наука, 1993. – 288 с.
4. Neubert H., Nowotny W., Baumann K. Die Myxomyceten und des angrenzten Alpenraumes unter besonderen Berücksichtigung Österreichs, Band 1: Ceratiomyxales, Echinosteliales, Liceales, Trichiales. – Bauman, Gomaringen, 1993.
5. Neubert H., Nowotny W., Baumann K. Marx H. Die Myxomyceten und des angrenzten Alpenraumes unter besonderen Berücksichtigung Österreichs, Band 2: Physarales. – Bauman, Gomaringen, 1995.
6. Neubert H., Nowotny W., Baumann K., Marx K. Die Myxomyceten und des angrenzten Alpenraumes unter besonderen Berücksichtigung Österreichs, Band 3: Stemonitales. – Bauman, Gomaringen, 2000.

7. Poulain M., Meyer M., Bozonnet J., Les Мухомycetes. Fed. Mycol. Bot. Dauphine- Savoie. – 2011.
8. Vlasenko et al. Echinostelium microsporum (Echinosteliaceae, Мухомycetes), a new epiphytic corticolous species from Russia // Phytotaxa, 2019. – 416 (1). – Pp. 67-72.
9. Zemlyanskaya I.V., Novozhilov Y.K. New data on myxomycete diversity of the Republic of Tatarstan (Russia) // Novosti sistematiki nizshikh rastenii, 2022. – 56 (1): 71–84.
10. Власенко А.В., Новожилов Ю.К., Щепин О.Н., Власенко В.А. Гидрохория как способ распространения миксомицетов пойменных лесов юга Западной Сибири // Микология и фитопатология, 2016. – 50. – С. 14-23.

СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСА У СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА

Садыкова Ю.Р., Норов А.И.

*Пермский военный институт войск национальной гвардии Российской Федерации»,
Пермь, Россия*

Аннотация. Исследованы параметры кислотно-щелочного статуса у ремонтных служебных собак породы немецкая овчарка в зависимости от сезона года. По рН крови, гемоглобину, щелочному резерву крови и микроскопии осадка мочи обнаружены нормативные показатели, с некоторым защелачиванием внутренней среды, весной и зимой, ацидозные сдвиги – летом. Более изменчивы кислотно-щелочные показатели крови у самок старше двух лет. Мочевой осадок дифференциально меняется у самцов, менее качественный – летом и к зиме. Рекомендовано синхронизировать оценку показателей крови и мочи при изучении кислотно-основного равновесия у служебных собак.

Ключевые слова: немецкая овчарка; кислотно-щелочное состояние; гомеостаз; сезонные изменения.

SEASONAL ACID BASE BALANCE CHANGES IN SERVICE GERMAN SHEPHERD DOGS

Sadykova Y.R., Norov A.I.

Perm Military Institute of National Guard Troops of the Russian Federation, Perm, Russia

Abstract. The parameters of acid-base status in repair service German Shepherd dogs were investigated depending on the season of the year. According to blood pH, hemoglobin, alkaline blood reserve and urine sediment microscopy, normative indicators were found, with some latching of the internal environment, in spring and winter, acidic shifts were found in summer. More variable acid-base blood parameters were found in females older than two years. Urinary sediment differentially changes in males, less high-quality – in summer and by winter. It is recommended to synchronize the blood assessment and urine parameters when studying acid-base equilibrium in service dogs.

Keywords: German Shepherd; acid-base state; homeostasis; seasonal changes.

Основу жизнедеятельности и эффективного функционирования организмов составляют биохимические процессы, протекающие в водной, строго регулируемой, внутренней среде. Состав ее, благодаря множеству сложных гомеостатических механизмов, поддерживается постоянным, изменяясь лишь в узких пределах. Одним из важных факторов поддержания гомеостаза является кислотно-щелочной баланс внутренней среды организма, от которого зависит работа ферментов, а, следовательно, и все биохимические процессы [1; 2].

Представителям вида Собака домашняя, применяемым в силовых структурах России и подвергаемым высоким служебным нагрузкам, для обеспечения здоровья и высокой работоспособности, необходим метаболический гомеостаз, даже при меняющихся условиях окружающей среды. В связи с этим, актуально изучить показатели кислотно-основного гомеостаза у служебных собак в разные сезоны года.

Целью исследования была оценка параметров кислотно-щелочного статуса служебных собак породы немецкая овчарка в разные периоды года в условиях Среднего Приуралья.

Объектом исследования служили 12 особей служебных собак породы немецкая овчарка ремонтного назначения специализированного войскового питомника возрастом от одного года до шести лет вольерного содержания. Кормление служебных собак было организовано согласно нормативным документам, рацион представлял собой приготовляемый корм из натуральных продуктов: круп овсяной и пшена, овощей, субпродуктов или мяса. На момент исследования все животные имели удовлетворительный анамнез. В изучаемой выборке в апреле, июле и декабре с соблюдением биоэтических принципов производилось получение венозной крови. Синхронно при свободном выгуле осуществлен сбор мочи. В цельной крови сразу после взятия определяли параметры кислотно-щелочного статуса: щелочной резерв крови – титриметрией по Неводову [3], рН крови – при создании вакуума потенциометрическим методом с использованием портативного рН-метра «Checher», количество гемоглобина – унифицированным гемиглобинцианидным методом с использованием набора готовых реактивов фирмы «Микроген» (Россия) со стандартным образцом гемиглобинцианида (ГСО), кат. № теста 50304. В пробах мочи провели экспресс-анализ с помощью тест-полосок «Пентафан» для полуколичественного определения рН, уровня кетоновых тел, белка, сахара и крови (гемоглобина). Микроскопию осадка свежей мочи осуществляли согласно рекомендациям, определяя клеточные элементы и элементы неорганизованного осадка [4]. Результаты обрабатывались методами вариационной статистики в сравнении с референтными нормами, приводимыми в литературе [5].

В результате проведенного исследования были установлены значимые отличия кислотно-щелочного статуса крови ремонтных немецких овчарок в зависимости от сезонных условий. Достоверно различался показатель рН, составив в среднем в выборке весной $7,44 \pm 0,027$ ед., летом – $7,18 \pm 0,007$ ед. и зимой – $7,4 \pm 0,028$ ед. Однако у отдельных особей были зафиксированы как ацидозные, так и алкалозные сдвиги во все изучаемые этапы исследования (рис. 1-3). Так, в весенний период года, после активизации дрессировочного процесса в связи с положительными температурами и таянием снежного покрова, у 19% изучаемого поголовья показатель был ниже, а у 14% – выше нормативной величины 7,35-7,55 (рис. 1). Этому сопутствовали высокие концентрации гемоглобина, и у некоторых собак – повышение и щелочного резерва крови, но в корреляции с низким рН.

Важно заметить, что зимой количество полевых занятий с собаками снижено, рацион при низких температурах, напротив, дополняется с двухкратной дачи корма до трехкратной, основной обмен работает на теплообеспечение, регистрируется увеличение массы тела. Подобное снижение подвижности может создавать условия метаболического алкалоза. Кроме того, как нам видится после анализа пищевого рациона собак в этот период года животные, недополучали белковых компонентов, а испытывали значительную нагрузку крупяным углеводным кормом, а это, как известно, всегда способствует защелачиванию внутренней среды организма.

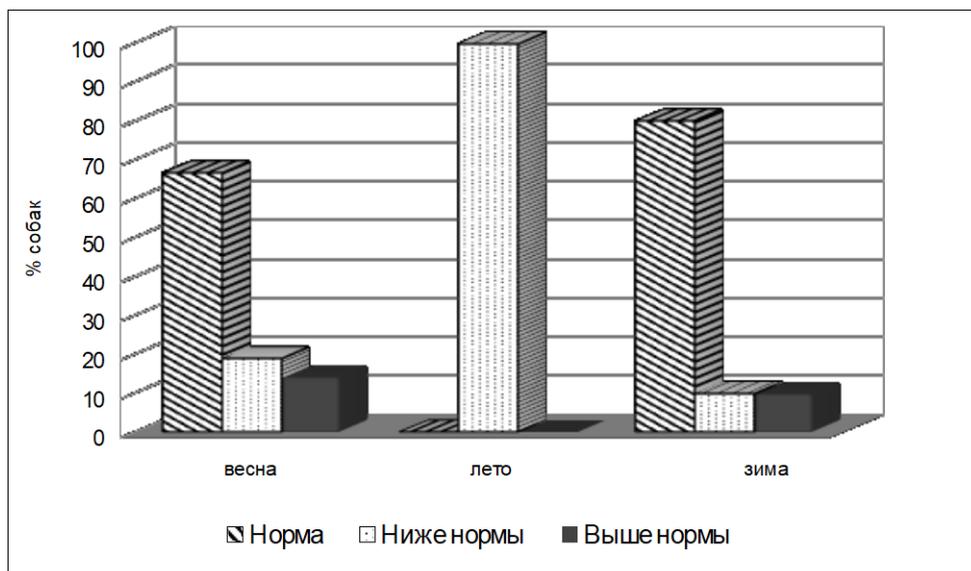


Рисунок 1 – Доля собак в выборке немецких овчарок ремонтного использования с нормативными рН крови и с отклонениями от нормы в разные сезоны года.

Отмеченное в июле у 100% собак резкое падение рН сопрягалось с превышающим референтные границы у 82% животных щелочным резервом крови ($665 \pm 18,2$ мг%) (рис. 2). Наиболее вероятной причиной этого могут служить как увеличение физических нагрузок, так и температурная нагрузка на дыхательную систему, что в комплексе способствует респираторному ацидозу. Известно, что при интенсивной мышечной работе наблюдаются кратковременные ацидотические сдвиги, связанные с накоплением метаболитов после нагрузок, прежде всего, с уровнем молочной кислоты. Наряду с этим, у 36% собак летом отмечен низкий уровень гемоглобина (111,7 г/л) (рис. 3).

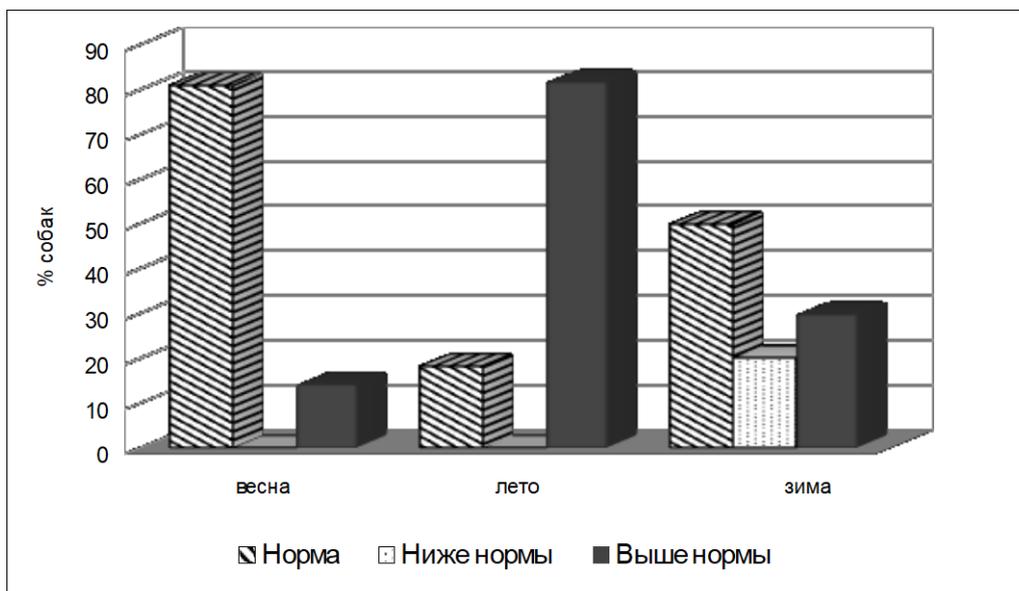


Рисунок 2 – Доля собак в выборке немецких овчарок ремонтного использования с нормативными щелочным резервом крови и с отклонениями от нормы в разные сезоны года.

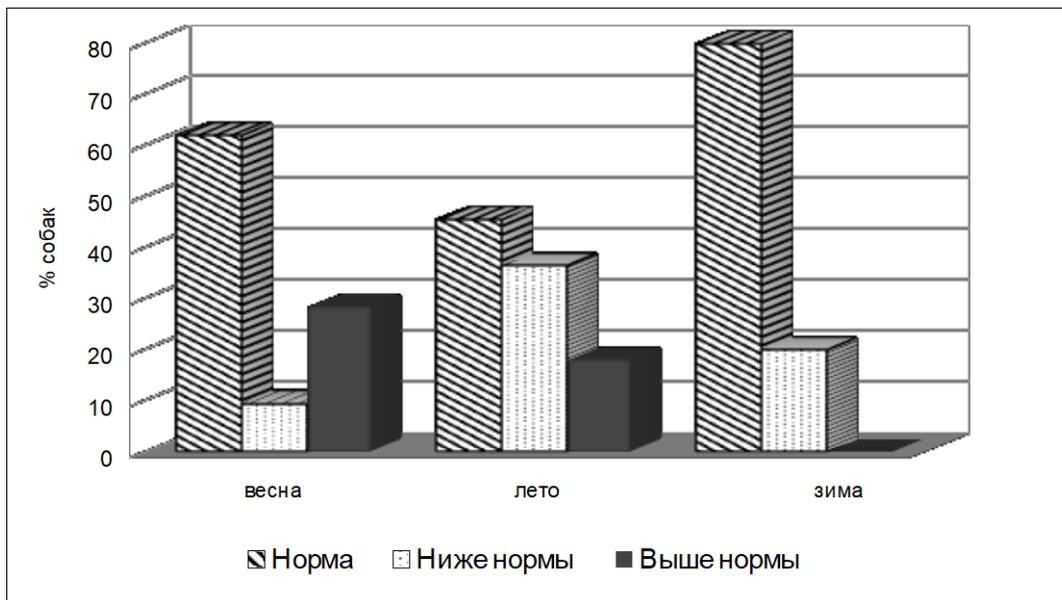
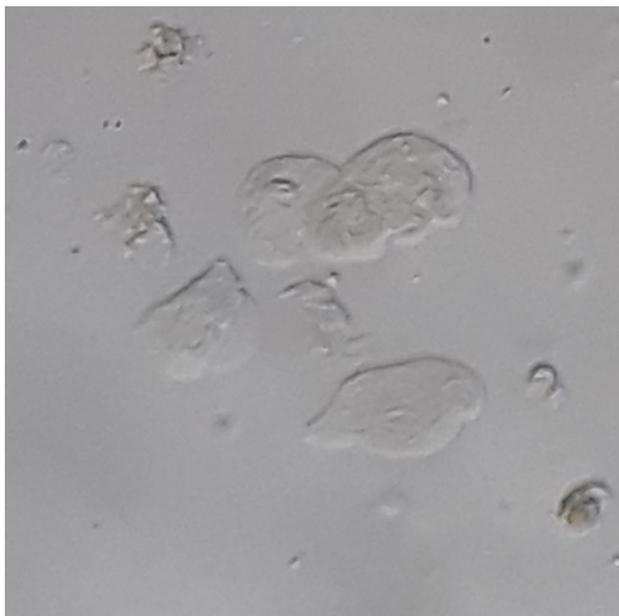


Рисунок 3 – Доля собак в выборке немецких овчарок ремонтного использования с нормативным уровнем гемоглобина в крови и с отклонениями от нормы в разные сезоны года.

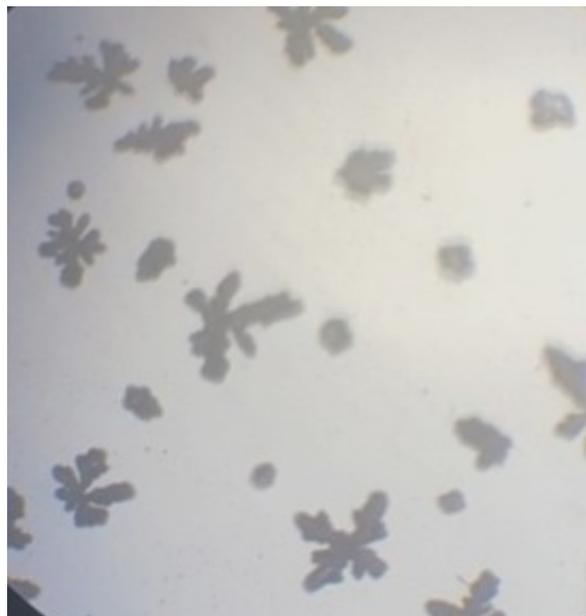
По данным некоторых авторов, это сопутствует ацидозным сдвигам [6]. Очевидно, что подобные сдвиги в показателях крови отражает компенсаторную роль бикарбонатной и гемоглобиновой буферных систем в поддержании кислотно-основного гомеостаза в жаркое время года. Доказательством этого стала положительная динамика к началу зимнего периода (рис. 1). В целом, отмечена тенденция более значимых изменений в зависимости от сезона года всех трех показателей кислотно-основного состояния у самок старше двух лет, но у самцов, независимо от возрастной категории, наибольшие сдвиги летом по снижению рН крови.

Как известно, мочеобразовательная функция почек тесно связана с их способностью регулировать осмотическое давление, водно-солевой баланс и кислотно-щелочное равновесие крови. Выделение с мочой более кислых или более щелочных продуктов обмена способствует сохранению в целом рН внутренней среды организма. Состав выводимых солей может быть оценен на основе изучения осадка мочи, так как определенный элемент осадка характерен для кислой, нейтральной и щелочной мочи, а проведение экспресс-анализа позволяет оценивать фильтрационную и реабсорбционную функцию почек и наличие в моче некоторых продуктов обмена [7]. Выявлено, что рН мочи у большинства собак весной, летом и зимой не отклонялся от нормы, кроме 24% выборки весной, рН мочи которых составила 8 ед., что с учетом рН крови подтверждает алкалозные сдвиги. В моче не обнаружено кетонов. При этом у 60% собак весной и зимой, у 54% – летом, были обнаружены в пограничной концентрации 0,33 г/л белки, но обычно эти значения принимаются за норму. Глюкозы и крови в моче не обнаружено. Более дифференцирована в соответствии с сезонными условиями картина мочевого осадка. Физиологическое количество солей осадка, – углекислой извести, аморфных кислых солей встречалось у большинства собак весной. Летом и зимой повысилась доля животных, у которых в осадке преобладали клетки эпителия мочевых путей и ураты (рис. 4, А). Нетипичные для плотоядных кристаллы обнаружены у отдельных самцов, – фосфорнокислая аммиак-магнезия (трипель-фосфат) весной и зимой, а весной и летом – щавелевокислая известь (рис. 4, Б), в корреляции со значениями щелочного резерва крови 600 мг% и более.

Такие сдвиги, особенно с учетом половой принадлежности, могут свидетельствовать о первичных признаках уролитиаза [8].



А – эпителий мочевых путей



Б – трипельфосфат

Рисунок 4 – Элементы неорганизованного осадка мочи немецких овчарок в летний период года (фото авторов).

Следовательно, для оценки здоровья служебных собак, учитывая значимость контроля работы мочевыделительной системы и ее важнейшие функции в поддержании гомеостатических параметров, в том числе и кислотно-основного равновесия, необходимо синхронизировать в оценке метаболических показателей и изучении влияния различных экологических факторов (включая сезонные климатические изменения, изменения рациона кормления, смена режима физических нагрузок) проведение исследования мочи с клиническими исследованиями крови.

Таким образом, сравнительное изучение кислотно-щелочных параметров у служебных собак породы немецкая овчарка специализированного войскового питомника позволяет сделать вывод о четкой зависимости показателей кислотно-щелочного статуса внутренней среды организма от условий в разные сезоны года – весной, летом и зимой. Величина рН крови собак менялась от нормальных средних величин весной, к ацидотическим – летом, и возвращалась к норме к зиме. Это отрицательно коррелировало с щелочным резервом крови, отражающим работу бикарбонатной буферной системы.

Следовательно, в организме собак осуществляются метаболические реакции, связанные с компенсацией сдвигов рН крови. Этому сопутствовало изменение микроскопической картины осадка мочи: весной отмечались соли щелочной мочи, а летом и зимой – большое количество уратов, элементов эпителия и нетипичных солей, которые, по нашему мнению, у самцов, при хронизации, способны приводить к обструкции мочевыводящих путей в виде уролитов. Учитывая степень нагрузок служебных собак ремонтного назначения в разные сезоны года, климатические сезонные факторы, считаем необходимым проведение мероприятий контроля кислотно-щелочного статуса служебных собак для оценки уровня

обменных процессов, определяющих работоспособность и эффективность применения собак в служебно-боевой деятельности.

Библиографический список

1. Бикхардт К. Клиническая ветеринарная патофизиология / Пер. с нем. В. Пулинец. – М.: ООО «Аквариум Принт», 2005. – 400 с.
2. Pitts R.F., Alexander R.S., Lotspeich W.D., Giebisch G. Two classic papers in acid-base physiology: contributions// *Am. J. Physiol Renal Physiol.* – 2004. – № 287. – Pp.864-865.
3. Маслен Г.В. и др. О титриметрическом методе определения щелочного запаса цельной крови // *Казанский медицинский журнал.* – 1971. – № 1. – С. 82-83.
4. Исследование мочи у мелких домашних животных и его клиническое значение. Методические указания / сост. Васильев М. Ф., Васильев Р. М., С-ПБ.: Санкт – Петербургская государственная академия ветеринарной медицины, 2001. – 39 с.
5. Уиллард М.Д., Тведтен Г., Торнвальд Г. Лабораторная диагностика в клинике мелких домашних животных (пер. с англ.). – М.: Аквариум, 2004. – 431 с.
6. Дементьева И. Н. Клинические аспекты состояния и регуляции кислотно-основного гомеостаза. – М: Юнимед-Пресс, 2002. – 80 с.
7. Osborne C.A., Finco D.R. *Canine and Feline Nephrology and Urology* / C. A. Osborne. – Philadelphia: Williams and Wilkins, 1995. – Pp. 100-121, 136-205, 211-299, 798-888.
8. Громова О.В., Челночников Д.Ю. Ранняя диагностика мочекаменной болезни у кошек и собак // *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные.* –2005. – № 2. – С. 15-16.

СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ ПЕРЕД РАЗМНОЖЕНИЕМ У ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ *RANA TEMPORARIA*

Семухина А. С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Исследовано содержание гликогена в печени у травяной лягушки после выхода с зимовки. Материал был собран в черте города Перми в период размножения лягушек перед непосредственно оплодотворением. Полученные данные сравнивались с материалами из Финляндии. Также проводилось сравнение между содержанием гликогена у самцов и самок в исследуемой популяции.

Ключевые слова: травяная лягушка, *Rana temporaria*, гликоген.

GLYCOGEN CONTENT IN THE LIVER BEFORE REPRODUCTION IN THE COMMON FROG *RANA TEMPORARIA*

Semukhina A. S.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The content of glycogen in the liver of common frogs after leaving wintering was studied. The material was collected in the city of Perm during the period of frog reproduction before fertilization. The data obtained were compared with materials from Finland and it was found that the glycogen content in the liver of common frogs in Perm before spawning corresponds to the same indicator in Finnish populations of this species during breeding. A comparison was also made between the glycogen content of males and females in the studied population – the differences were reliable.

Keywords: common frog, *Rana temporaria*, glycogen.

Введение

Подготовка к зимовке у земноводных является достаточно важным процессом, без которого они не смогли бы выжить в столь суровых условиях. Этот процесс настолько сложен, что амфибии летнего и зимнего периодов отличаются морфологически и физиологически [1]. В летний период происходит так называемый нагул, во время которого лягушки интенсивно растут, восстанавливают энергетические запасы, а также формируют половые продукты. В осеннее время подготовка к зимовке завершается: в печени накапливается гликоген, а гаметогенез должен быть полностью закончен. Перед непосредственно размножением содержание гликогена минимально, поскольку все или практически все ресурсы потрачены на поддержание жизнедеятельности животного во время гипобриоза [2].

Печень является депо для гликогена, в большей степени, и для жира в меньшей, а значит, что размеры этого органа напрямую связаны с содержанием в нем гликогена. Вес печени меняется в течение активного периода жизнедеятельности лягушки, что говорит о том, что содержание гликогена также меняется. У половозрелых лягушек максимальный вес печени приходится на август-сентябрь, у молодых – на сентябрь; минимальный вес органа зафиксирован в мае и начале июля соответственно [2]. До сих пор не было написано или опубликовано ни одной работы, касающейся биохимических исследований *Rana temporaria* в Пермском крае. Цель данной работы – изучить содержание гликогена печени травяной лягушки перед размножением, тем самым положив начало для изучения биохимических адаптаций у данного вида на упомянутой выше территории.

Материалы и методы

Перед размножением (26-27 апреля 2022 г.) было отловлено 70 травяных лягушек (30 самок и 40 самцов). Животные были отловлены из нерестовых водоемов при помощи сачка. Все животные, находившиеся в амplexусе, были разъединены руками. Затем животные помещались в намоченный хлопковый мешок, после чего уже в помещении перемещены каждое в индивидуальный полиэтиленовый пакет и заморожены сперва при температуре – 18°C, а после при – 80°C.

Исследование на содержание гликогена проводилось по следующей методике [3, 4]: навеску ткани печени помещались в 10 мл центрифужную пробирку с 2 мл 30% КОН. Пробирки плотно закрывались фольгой и ставились на кипящую водяную баню на 1 ч. По истечении данного времени пробирки остужали и в них добавляли 0,2 мл насыщенного раствора Na_2SO_4 , затем пробирки закрывали фольгой и помещали на водяную баню еще на 30 мин. Далее пробирки остужались, добавляли двойной объем (4,4 мл) спирта 95°, закрывали крышками и встряхивали (образовывался осадок). Оставляли на час. По истечении часа пробирки центрифугировали при 3000 оборотов/мин 15 минут. Надосадочную жидкость отбрасывали, пробирки осушали до осадка салфеткой, добавляли 2 мл дистиллированной воды, размешивали стеклянной палочкой осадок до растворения и оставляли на 15 мин. Далее центрифугировали 15 минут и переливали жидкость в чистые пробирки, осадок выбрасывали, а в жидкость добавляли двойной объем (4 мл) 95° этилового спирта.

Снова встряхивали, центрифугировали, надосадочную жидкость отбрасывали, пробирки осушали до осадка салфеткой, а осадок растворяли уже в 2 мл 2Н H_2SO_4 , накрывали пробирки фольгой и помещали на водяную баню на 2 ч 30 мин. В это время подготавливали такое же количество пробирок с такими же номерами для того, чтобы поместить в них 0,2 мл пробы на следующем этапе. По истечении 2,5 часов отбирали по 0,2 мл пробы в заранее подготовленные пробирки и добавляли к пробам 1,8 мл ортотолуидинового реактива. Для создания эталона сравнения готовили: 0,2 мл дистиллированной воды+1,8 мл ортотолуидинового реактива. Открытые пробирки с пробами и с холостой пробой ставили на водяную баню на 10 минут. При этом в пробирках с образцами происходило изменение цвета содержимого от голубого до темно-синего. Чем темнее был полученный цвет, тем выше концентрация гликогена в образце.

Затем исследовали пробы на спектрофотометре при длине волны 325 нм в кюветах объемом 3,090 мл. Отдельно готовились стандарты глюкозы, просматривались на спектрофотометре и на основании полученных значений строился калибровочный график, по которому определялось содержание гликогена в органах и тканях.

Результаты и обсуждение

Для того что бы оценить получившиеся результаты, необходимо сравнить их с показателями в других публикациях. Одной из немногих работ, в которой исследовано

содержание гликогена в печени в весенний период, является работа S. Pasanen, P. Koskela [5]. Единственное, в чем может заключаться проблема при сравнении, это единицы измерения, в которых представлены данные. В данной работе единица измерения гликогена – мг/1 г ткани печени, а в работе S. Pasanen, P. Koskela – мг/г тела. Путем простого пересчета можно избавиться от данной проблемы и сравнить данные.

В вышеупомянутой статье представлено множество данных за различные периоды жизненного цикла травяных лягушек. Наиболее подходящими для сравнения периодами, описанными в указанной работе, являются периоды Emerging (апрель у половозрелых, май у молодых) и Spawning (начало мая). Данные для сравнения представлены в таблице.

Таблица – Содержания гликогена в печени травяной лягушки (мг/г веса тела)

Пол	Наши данные	S. Pasanen, P. Koskela, 1974	
		Emerging	Spawning
Самцы	1,2±0,19 n = 40	3,96±0,64 n = 3	1,66±0,55 n = 6
Самки	0,7±0,14 n = 30	2,39±0,36 n = 3	0,59±0,23 n = 6

Проведя анализ различий между выборками, можно отметить, что различия между нашими данными и данными из группы Emerging в работе S. Pasanen, P. Koskela, статистически достоверны как для самцов, так и для самок ($t = 4,12$ и $t = 4,52$, $p < 0,001$), что может свидетельствовать о том, что данные группы животных находились в различных физиологических состояниях и не похожи друг на друга по данным показателям. Различия между нашими данными и данными из группы Spawning недостоверны и для самцов, и для самок ($t = 0,79$ и $t = 0,44$ соответственно, $p > 0,05$), что может говорить нам либо о том, что объем выборок мал, либо о том, что наши показатели и показатели в работе S. Pasanen, P. Koskela одинаковы, поскольку условия сбора материала и климатические особенности регионов схожи. Различия между самками и самцами по нашим данным достоверны ($t = 2,24$, $p < 0,05$), что может говорить о том, что либо за время зимовки самки тратят больше энергии на поддержание жизнедеятельности и подготовку половых продуктов к размножению, чем самцы, либо гликогена у самок еще до зимы было меньше, чем у самцов.

Таким образом данная работа может послужить основой для дальнейших биохимических исследований травяной лягушки в Пермском крае, поскольку было исследовано минимальное содержание гликогена в печени.

Хотелось бы выразить благодарность коллективу лаборатории биоценологии «Института биологических проблем Севера» ДВО РАН и особенно Нине Антоновне Булаховой за предоставленную возможность проведения исследований и неоценимый опыт.

Библиографический список

1. Банников А. Г., Денисова М. Н. Очерки по биологии земноводных //М.: Учпедгиз. – 1956. – Т. 166.
2. Кутенков А. П. Экология травяной лягушки (*Rana temporaria* L., 1758) на северо-западе России. – 2009.

3. Tárnoky K. et al. Spectrophotometric determination of glycogen with o-toluidine //Clinica Chimica Acta. – 1963. – Т. 8. – С. 627-628.
4. Северин С. Е., Соловьева Г. А. Практикум по биохимии //М.: МГУ. – 1989. – Т. 125. – С. 3.
5. Pasanen S., Koskela P. Seasonal and age variation in the metabolism of the common frog, Rana temporaria L. in northern Finland //Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology. – 1974. – Т. 47. – №. 2. – С. 635-654.

КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОДАХ

Тельнова Т.Ю., Моргунова М.М., Шашкина С.С., Власова А.А., Мишарина Е.А., Имидоева Н.А., Дмитриева М.Е., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Аксенов-Грибанов Д.В.

Иркутский государственный университет, Иркутск, Россия

Аннотация. В ходе проведенного исследования показано, что эндемичные амфиподы озера Байкал способны накапливать в себе активные фармацевтические субстанции, что может негативно сказываться как на самой экосистеме, так и на ее обитателях при миграции загрязнителей по трофическим цепям.

Ключевые слова: загрязнение, амфиподы, лекарственные препараты, озеро Байкал.

QUALITATIVE ANALYSIS OF PHARMACEUTICAL ACCUMULATION IN BAIKAL ENDEMIC AMPHIPODS

Telnova T. Yu., Morgunova M. M., Shashkina S. S., Vlasova A. A., Misharina E. A., Imidoeva N. A., Dmitrieva M. E., Malygina E. V., Belyshenko A. Yu., Axenov-Gribanov D. V.

Irkutsk State University, Irkutsk, Russia

Abstract. This research shows that the endemic amphipods of Lake Baikal are capable of accumulating active pharmaceutical substances. It can negatively affect both the ecosystem itself and its inhabitants as pollutants migrate through the trophic chains.

Keywords: pollution; amphipods; medicinal preparations; Lake Baikal.

Загрязнение водных экосистем является одной из ключевых проблем. Основными источниками загрязнения и засорения являются недостаточно очищенные сточные воды промышленных и коммунальных предприятий, крупных животноводческих производств и т.д. Загрязняющие вещества, попадая в природные водоемы, приводят к качественным изменениям воды – изменяются ее свойства и химический состав. Одними из опасных веществ являются ксенобиотики, пестициды, диоксины, а также лекарственные препараты [1]. На сегодняшний день лекарственные препараты являются как неотъемлемой составляющей медицинской практики, так и характерными загрязнителями окружающей среды. Фармацевтические препараты обнаружены в таких экосистемах, как Восточно-Китайское море [2], водоемы европейских стран, США [3], в Марианской впадине [4] и озере Байкал [5].

Озеро Байкал является крупнейшим резервуаром пресной воды и входит в перечень всемирного наследия ЮНЕСКО [6]. Нами предполагается, что подобно иным водоемам, лекарственные вещества вместе со сточными водами попадают и в озеро Байкал. Попадая в

водоем, они могут серьезно влиять на огромное число эндемичных организмов, обитающих в оз. Байкал [7].

Примечательно, что мониторинговых наблюдений по выявлению лекарственных препаратов в представителях зообентоса до настоящего времени не проведено, тогда как изучение экосистемы озера Байкал на предмет наличия следовых концентраций лекарственных препаратов и их метаболитов в компонентах зооценоза представляется актуальной и неизученной задачей.

В связи с этим, мы выдвинули гипотезу, что амфиподы, как представители зообентоса озера Байкал, могут накапливать в себе лекарственные препараты, часто используемые человеком в профилактических целях и при терапии инфекционных заболеваний. Целью настоящего исследования являлось качественное и селективное выявление действующих веществ лекарственных препаратов в амфиподах оз. Байкал с помощью методов высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС).

Объектами исследования были выбраны байкальские амфиподы родов *Eulimnogammarus*, *Brandtia* и *Pallasea*. Амфипод гомогенизировали с помощью шаровой мельницы с добавлением ацетонитрила и центрифугировали. Полученную надосадочную жидкость пропускали через шприц-фильтр. Измерения первичного скрининга лекарственных препаратов в образцах байкальских амфипод были выполнены на базе хромато-масс-спектрометрического комплекса Agilent Infinity II с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6470B(QQQ).

В ходе первого этапа исследования было показано, что образцы амфипод рода *Eulimnogammarus*, отобранные в пос. Большое Голоустное, содержали лекарственные препараты, такие как: ацетилсалициловая кислота, парацетамол, тетрациклин, азитромицин и ибупрофен. Выявлено, что максимальную частоту контаминации отмечали для парацетамола и тетрациклина. Также выявлено, что доля амфипод, не загрязненных лекарственными препаратами, составляет не более 20%.

В ходе второго этапа исследования в образцах амфипод роды *Eulimnogammarus* были обнаружены следующие вещества, как окситетрациклин, доксициклин, хлортетрациклин, амикацин, диметридазол, метронидазол и спирамицин. Данные лекарственные препараты контролируются в составе пищевой продукции в рамках, действующих ГОСТ. Вместе с тем в образцах не выявлены такие искомые вещества, как эритромицин, кларитромицин, тилозин, линкомицин, ампицилин, амоксицилин, флорфеникол, тиамфеникол, сульфаметазин, сульфапиридин, гентамицин, гигромицин Б, апрамицин и демеклоциклин.

На третьем этапе проведен качественный селективный анализ содержания ибупрофена и азитромицина с контролем стандартных образцов в различных популяциях амфипод (рис. 3). Как следует из полученных материалов, в образцах амфипод родов *Eulimnogammarus*, *Brandtia* и *Pallasea*, отобранных в пос. Листвянка и р. Ангара в черте г. Иркутск, контаминация азитромицином отсутствует. Контаминация ибупрофеном, в среднем, составляет 86%. Отсутствие контаминации ибупрофеном выявлено только в пробах амфипод, отобранных в р. Ангара.

Таким образом, в ходе настоящего исследования показан факт загрязнения беспозвоночных обитателей озера Байкал фармацевтическими препаратами в следовых количествах, а для определения степени загрязненности и межвидовых особенностей компонентов зообентоса требуется организация комплексных межпопуляционных исследований.

Исследование проведено при финансовой поддержке проекта Минобрнауки РФ в рамках создания лабораторий под руководством молодых ученых при научно – образовательных центрах (проект 075-03-2021-141/4, НОЦ Байкал) и Гранта Президента РФ (МК-1245.2021.1.4).

Библиографический список

1. Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Ю. Ю. Лурье. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
2. Human and veterinary pharmaceuticals in the marine environment including fish farms in Korea / Hee-Young Kim, In-Seok Lee, Jeong-Eun Oh. // *Science of the total environment*. – 2017. – P. 940 – 949.
3. Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries / M. S. U. Rehman [et al.] // *Chemosphere*. – 2015. – Т. 138. – P. 1045-1055.
4. Qiu J. Man-made pollutants found in Earth's deepest ocean trenches / J. Qiu // *Nature*. – 2016.
5. A unified dataset of colocated sewage pollution, periphyton, and benthic macroinvertebrate community and food web structure from Lake Baikal (Siberia) / M. F. Meyer [et al.] // *Limnology and oceanography letters*. – 2022. – Т. 7. – №. 1. – P. 62-79.
6. Беркин Н. С. Байкаловедение: учеб. пособие / Н.С. Беркин, А.А. Макаров, О. Т. Русинек. – Иркутск: Изд-во Ирк. гос. ун-та, 2009. – 291 с.
7. Павлович Т. В. Загрязнение окружающей среды лекарственными средствами / Т. В. Павлович // *Культура и экология – основы устойчивого развития России. Человеческий капитал как ключевой ресурс зеленой экономики: Сб. ст.* – Екатеринбург, 2018. – С. 304-307.

ЭКОЛОГО-ОРНИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА В АЭРОПОРТУ «ХАТАНГА»

Харин Р.В.^{1,2}

¹ *Общество с ограниченной ответственностью «Малое инновационное предприятие «Бюро охраны природы», Пермь, Россия*

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет», Пермь, Россия*

Аннотация. Представлены результаты эколого-орнитологического обследования в аэропорту «Хатанга» и на прилегающей территории в осенний и весенний периоды. Включая описание методов проведения работ, характер орнитологической обстановки по сезонам и в разное время суток, особенности сезонных и суточных перемещений птиц, список зарегистрированных видов птиц, особенности территории, осложняющие орнитологическую обстановку на аэродроме.

Ключевые слова: авиационная орнитология, безопасность полетов, аэропорт, аэродром, Хатанга.

ECOLOGICAL AND ORNITHOLOGICAL SITUATION OF THE AIRPORT KHATANGA

Kharin R. V.^{1,2}

¹ *Ltd. MIP Bureau of Conservation of Nature, Perm, Russia*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Abstract. Data on the assessment of the ornithological situation at the Magadan (Sokol) aerodrome are presented: quantitative characteristics, daily and seasonal activity, species diversity and features of bird stays.

Keywords: aviation ornithology, flight safety, airport, khatanga.

Аэродром расположен около п. Хатанга, в восточной части полуострова Таймыр, на правом берегу р. Хатанга, в Таймырском Долгано-Ненецком районе Красноярского края. Весенний этап исследований проводился в период с 09 по 15 июня 2020 г., осенний – с 07 по 14 сентября 2020 г. В 2020 г. была ранняя весна, и фенологические даты сдвинулись в среднем на 2 недели. За это время обследован аэродром и прилегающая территория (рис.1.).

Для количественной характеристики напряженности орнитологической обстановки на аэродроме использовали методику В.А. Юдкина и М.А. Грабовского [1]. Вблизи торцов взлетно-посадочной полосы (ВПП) закладывается два постоянных наблюдательных пункта (ПНП), по одному с каждой стороны ВПП.

Регистрировались все птицы, перемещающиеся через ППП в границах видимости от наблюдателя. Если птица не была определена до вида, то определялось наиболее близкое таксономическое положение птицы и (или) указывалось ее сходство по размеру с одним из широко распространенных видов.

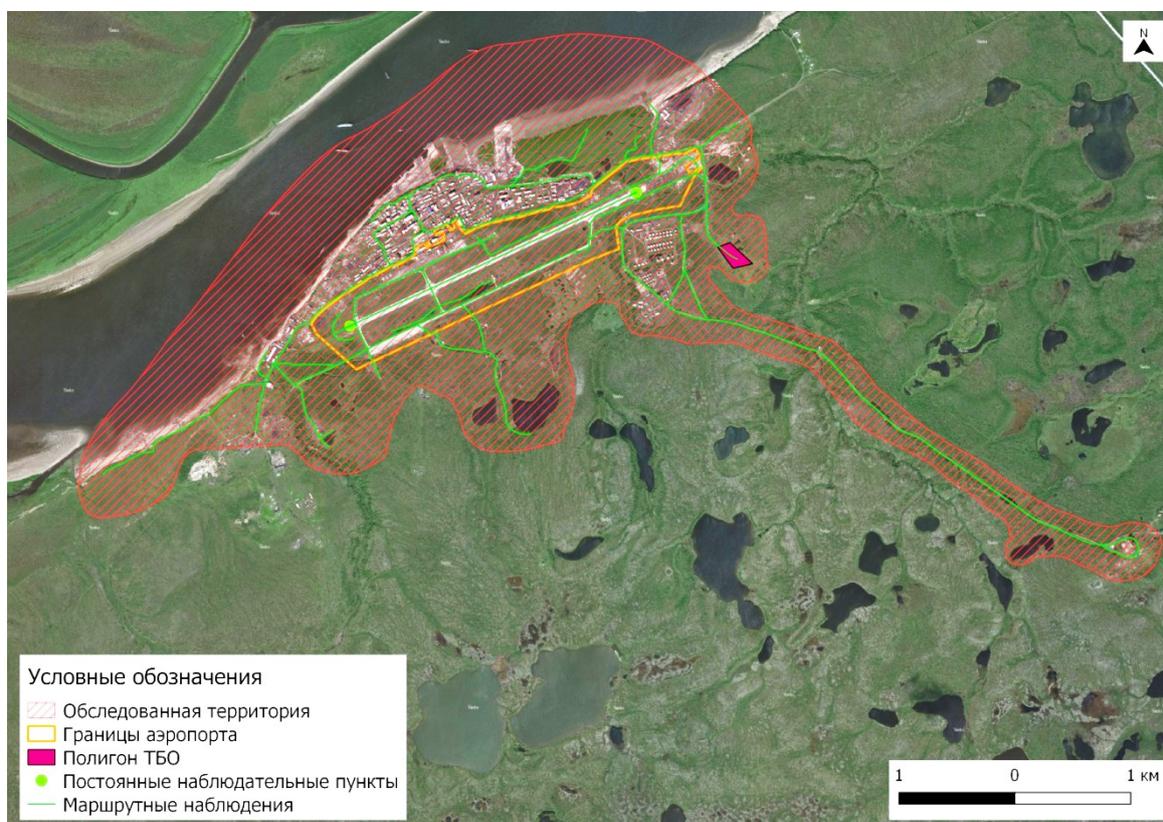


Рисунок 1 – Обследованная территория.

Оценивалась высота и направление перемещения, отмечались особенности поведения встреченных птиц, характер пребывания, по возможности, пол и возраст. Отмечались пересечения ВПП и перемещения птиц вдоль ВПП, кружащие и сидящие на летном поле особи. Учеты проводились в разное время суток (утром, днем, вечером) и в разные сезоны года (осень и весна). Норма учета для каждого торца и отрезка времени суток составляла минимум 2 часа. В качестве интегральной характеристики напряженности орнитологической обстановки на аэродроме используется величина суммарной биомассы птиц, находящихся в зоне движения воздушных судов. Эта характеристика имеет размерность $\text{кг/час}\cdot\text{км}^2$. Кроме того, авторы методики предлагают таблицу критериев оценки напряженности орнитологической обстановки в пяти градациях, в зависимости от значения интенсивности перемещений ($\text{кг/час}\cdot\text{км}^2$): спокойная, удовлетворительная, умеренно-напряженная, чрезвычайно напряженная, критическая [1].

Для выявления мест скоплений, мигрирующих птиц и путей миграции, определения численности и видового состава птиц, характера их пребывания и поведения на аэродроме и прилегающей территории, а также выявления особенностей территории способствующих концентрации птиц, проведены маршрутные учеты и точечные наблюдения. Учитывали рекомендации по проведению маршрутных и точечных учетов птиц, особенности учетов для разных групп птиц и в разные сезоны года, особенности обеспечения безопасности полетов

[2,3,4,5,6,7,8,9]. Руководствовались приказом «Об утверждении руководства по орнитологическому обеспечению полетов в гражданской авиации» [10]. Порядок перечисления видов приведен по Л.С. Степаняну [11].

Согласно критериям использованной методики [1] в весенний период орнитологическая обстановка характеризовалась, как удовлетворительная. На юго-западном торце интенсивности перемещений птиц была выше, чем на северо-восточном, разница почти двукратная (табл. 1,2). В течение суток наибольшая интенсивность перемещений через ВПП отмечалась вечером на обоих торцах ВПП (табл. 2). Основной вклад в биомассу птиц, перемещающихся через ВПП, внесли: белая куропатка, восточносибирская чайка и полярная крачка.

В осенний период орнитологическая обстановка характеризовалась как умеренно-напряженная. Это связано в первую очередь суточными перемещениями серых и черных ворон, восточносибирских чаек с реки на свалку и обратно. Отмечена повышенная интенсивность перемещений птиц на северо-восточном торце ВПП (табл. 1,3). Основной вклад в биомассу птиц, перемещающихся через ВПП, внесли: серая и черная вороны, восточносибирская чайка.

Таблица 1 – Интенсивность перемещений птиц во всех направлениях через ВПП, кг/час*км²

Период исследований \ Биомасса	Северо-восточный торец, кг/ч*км ²	Юго-западный торец, кг/ч*км ²	Среднее по аэропорту, кг/ч*км ²	Значения min – max, кг/ч*км ²
Весенний период	7,1	14,4	10,7	3,4 – 12,4
Осенний период	41,9	3,3	22,6	0,3 – 54,6
Среднее за два сезона	24,5	8,8	16,7	0,3 – 54,6

Таблица 2 – Интенсивность перемещений птиц во всех направлениях через ВПП в разное время суток в весенний период, кг/час*км²

Период суток \ Биомасса	Северо-восточный торец, кг/ч*км ²	Юго-западный торец, кг/ч*км ²
Утро	3,4	9,7
День	5,3	3,6
Вечер	12,4	29,2
Среднее	7,1	14,2

Таблица 3 – Интенсивность перемещений птиц во всех направлениях через ВПП в разное время суток в осенний период, кг/час*км²

Период суток \ Биомасса	Северо-восточный торец, кг/ч*км ²	Юго-западный торец, кг/ч*км ²
Утро	16,8	5,8
День	54,2	3,8
Вечер	54,6	0,3
Среднее	41,9	3,3

Сезонные перемещения птиц представляют большую опасность для авиации. И не обязательно птицы должны быть в больших стаях, чтобы создать угрозу для воздушных судов. Даже одиночные особи видов крупного размера могут представлять серьезную угрозу [6,9]. Основную опасность для воздушных судов весной и осенью представляли мигрирующие и кочующие восточносибирские чайки, а также черная и серая вороны, крупные стаи которых регистрировались на аэродроме регулярно. Есть вероятность появления мигрирующих стай гусей. Определенные помехи и опасность могут представлять мигрирующие и кочующие птицы средних и мелких размеров, образующие большие скопления в период миграций – утки, кулики, воробьинообразные. Потенциальную опасность могут представлять крупные хищники. Так, весной на территории аэродрома и прилегающей территории отмечались две стаи гусей, пролетающие в северо-восточном направлении 12 и 16 июня (рис.2). В прошлые годы весной на территории аэродрома регистрировались крупные скопления восточносибирских чаек. Их привлекает открытая, свободная от снега, хорошо прогреваемая бетонная поверхность ВПП, где птицы отдыхают во время миграций, могут скапливаться в большом количестве. Весной на территории аэродрома два раза отмечался зимняк, осенью залетал орлан-белохвост. В осенний период на аэродроме и прилегающей территории отмечались кочующие стаи свиристелей, чечеток. Вблизи аэродрома в пойме реки отмечались пролетающие стаи уток от 10 до 100 особей, основного направления движения не выявлено.

Опасность могут представлять и суточные перемещения птиц. Наиболее массовые суточные перемещения птиц отмечались для серых и черных ворон, а также восточносибирских чаек. Эти перемещения происходили между полигоном ТБО и побережьем реки Хатанга, часть птиц залетала на территорию аэродрома, который расположен между ними (рис.2). Такая ситуация является самой неблагоприятной, когда аэродром расположен на пути перемещения птиц с мест гнездования/отдыха/ночевки к местам кормежки.

Также, опасность могут представлять гнездящиеся на территории аэродрома птицы. Такие птицы постоянно присутствуют на аэродроме. Например, отмечено гнездование белой куропатки и полярной крачки, которые могут устраивать гнезда в непосредственной близости и периодически пересекать ВПП. Крачки активно защищают свои гнезда и постоянно пересекают ВПП, куропатки токуют и кормятся около ВПП. Опасность могут представлять вероятно гнездящиеся на аэродроме утки (чирок-свистун, свиязь, хохлатая чернеть, морянка) и кулики (азиатский бекас, бекас, белохвостый песочник, турухтан). Очень заметны токовые полеты куликов – азиатский бекас, бекас, белохвостый песочник, которые во время токования залетают на ВПП. Птицы летают кругами или по прямой. Потревоженные утки также могут пересекать ВПП. Отмечались регулярные перелеты турухтанов в группах по 5-10 особей. Высоты таких перемещений куликов и уток 10-50 м. Определенной направленности эти перемещения не имеют, но точкой притяжения являются заболоченные участки и небольшие водоемы около центральной и юго-западной части летного поля. Зарегистрированы залеты городских ласточек из поселка на аэродром. Городские ласточки гнездятся вблизи аэродрома, в поисках корма они иногда залетают на территорию аэродрома. Весной после существенного потепления наблюдался массовый вылет насекомых, и ласточки в поисках корма начали залетать и долго летать на аэродроме в стаях до 40 особей.

Близость полигона ТБО, а также расположение аэродрома на пути перемещений птиц между рекой и полигоном ТБО является существенным фактором усложнения орнитологической обстановки.

Сложный рельеф, наличие водоемов, разнообразие типов местообитаний на территории аэропорта создают благоприятные условия для гнездования многих видов птиц, наличие кормовых и защитных условий, мест для отдыха, привлекают птиц с прилегающей территории на аэродром.



Рисунок 2 – Некоторые массовые суточные и сезонные перемещения, места скопления птиц.

В период наблюдений основные высоты перемещений птиц на территории аэродрома не превышали 50 м.

За период исследований на рассматриваемой территории встречено 45 видов птиц (табл.4). Из них на территории аэродрома отмечалось 35 видов (табл.4). На аэродроме найдены гнезда белой куропатки, полярной крачки, белой трясогузки, ворона, серой или черной вороны, обыкновенной чечетки. Кроме того, отмечались токующие и поющие самцы, птицы, сидящие на гнездах и с другим гнездовым поведением: чирок-свистунок, свиязь, хохлатая чернеть, морянка, белая куропатка, золотистая ржанка, галстучник, турухтан, белохвостый песочник, азиатский бекас, бекас, полярная крачка, рогатый жаворонок, краснозобый конек, беренгийская желтая трясогузка, белая трясогузка, черная ворона, серая ворона, ворон, пеночка-весничка, пеночка-зарничка, обыкновенная каменка, варакушка, обыкновенная чечетка, овсянка крошка.

Таблица 4 – Видовой состав птиц, зарегистрированных в аэропорту и на прилегающей территории

№	Таксономическая единица	Аэропорт	Прилегающая территория
1.	Чернозобая гагара <i>Gavia arctica</i>	-	+
2.	Белолобый гусь <i>Anser albifrons</i>	-	+
3.	Чирок-свиистунок <i>Anas crecca</i>	+	+
4.	Свиззь <i>Anas penelope</i>	+	+
5.	Шилохвость <i>Anas acuta</i>	-	+
6.	Широконоска <i>Anas clypeata</i>	+	+
7.	Хохлатая чернеть <i>Aythya fuligula</i>	+	+
8.	Морская чернеть <i>Aythya marina</i>	-	+
9.	Морянка <i>Clangula hyemalis</i>	+	+
10.	Турпан <i>Melanitta fusca</i>	-	+
11.	Орлан-белохвост <i>Haliaeetus albicilla</i>	+	+
12.	Белая куропатка <i>Lagopus lagopus</i>	+	+
13.	Золотистая ржанка <i>Pluvialis arcticaria</i>	+	+
14.	Галстучник <i>Charadrius hiaticula</i>	+	+
15.	Фифи <i>Tringa glareola</i>	+	+
16.	Щеголь <i>Tringa erythropus</i>	+	+
17.	Турухтан <i>Philomachus pugnax</i>	+	+
18.	Белохвостый песочник <i>Calidris temminckii</i>	+	+
19.	Азиатский бекас <i>Gallinago stenura</i>	+	+
20.	Бекас <i>Gallinago gallinago</i>	+	+
21.	Длиннохвостый поморник <i>Stercorarius longicaudus</i>	-	+
22.	Восточносибирская чайка <i>Larus vegae</i>	+	+
23.	Сизая чайка <i>Larus canus</i>	+	+
24.	Полярная крачка <i>Sterna paradisaea</i>	+	+
25.	Рогатый жаворонок <i>Eremophila alpestris</i>	+	+
26.	Краснозобый конек <i>Anthus cervinus</i>	+	+
27.	Беренгийская желтая трясогузка <i>Motacilla tschutschensis</i>	+	+
28.	Белая трясогузка <i>Motacilla alba</i>	+	+
29.	Серый сорокопут <i>Lanius excubitor</i>	+	+
30.	Черная ворона <i>Corvus corone</i>	+	+
31.	Серая ворона <i>Corvus cornix</i>	-	+
32.	Ворон <i>Corvus corax</i>	+	+
33.	Свиристель <i>Bombycilla garrulus</i>	+	+
34.	Пеночка-весничка <i>Phylloscopus trochilus</i>	+	+
35.	Пеночка-зарничка <i>Phylloscopus inornatus</i>	-	+
36.	Обыкновенная каменка <i>Oenanthe oenanthe</i>	+	+
37.	Варакушка <i>Luscinia svecica</i>	+	+
38.	Рябинник <i>Turdus pilaris</i>	+	+
39.	Белобровик <i>Turdus iliacus</i>	-	+
40.	Сероголовая гаичка <i>Parus cinctus</i>	-	+
41.	Обыкновенная чечетка <i>Acanthis flammea</i>	+	+
42.	Полярная овсянка <i>Schoeniclus pallasii</i>	+	+
43.	Овсянка-крошка <i>Emberiza pusilla</i>	+	+
44.	Лапландский подорожник <i>Calcarius lapponicus</i>	+	+
45.	Пуночка <i>Plectrophenax nivalis</i>	+	+

Библиографический список

1. Юдкин В.А., Грабовский М.А. Количественный метод оценки орнитологической обстановки на аэродроме // Научный Вестник МГТУ ГА, Том 21, № 04. – М.: 2018. – С. 48 – 59.
2. Новиков Г.А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных. – М. : Сов. наука, 1953. – 503 с.
3. Благодклонов К.Н., Осмоловская В.И., Формозов А.Н. Учет численности воробьиных, дятловых и ракшеобразных птиц // Методы учета численности и географического распределения наземных позвоночных. М., 1952. С. 315-328.
4. Исаков А.Ю. Методы количественного учета водоплавающих птиц // Методы учета численности и географического распределения наземных позвоночных. М.: изд-во АН СССР, 1952. – С. 280–294.
5. Рогачева Э.В. Методы учета численности лесных воробьиных птиц / Э.В. Рогачева // Организация и методы учета птиц и вредных грызунов. – М. : Изд-во АН СССР, 1963. – С. 117 – 129.
6. Якоби В.Э. Биологические основы предотвращения столкновений самолетов с птицами. – М.: Наука, 1974. – 166 с.
7. Гаврилов Э.И. Методика сбора и обработки материалов по количественной характеристике видимых миграций птиц // Методы изучения миграций птиц. М.: Наука, 1977. – С. 96–117.
8. Кузякин А.П. Метод учета лесных птиц // География и экология наземных позвоночных Нечерноземья. Птицы. – Владимир, 1981.– С. 38 – 48.
9. Рогачев А.И., Лебедев А.М. Орнитологическое обеспечение безопасности полетов. – М.: Спорт, 1984. – 126 с.
10. Приказ Министерства Гражданской Авиации СССР от 26.12.1988 N 209 «Об утверждении Руководства по орнитологическому обеспечению полетов в гражданской авиации (РООП ГА-89)».
11. Степанян Л.С. Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий (в границах СССР как исторической области). М.: Академкнига, 2003. – 808 с.

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

doi:10.17072/simbioz-2022-791-795

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТРОПА И ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МАРШРУТ КАК СПОСОБЫ РАЗВИТИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ТУРИЗМА

Стоянова В.И., Кондратов Н.А.

*Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск,
Россия*

Аннотация. В статье рассмотрены общие признаки и принципы экологического туризма, названы основные цели. Туризм объединяет человека и природу, помогает сохранить культурное и природное наследие, уменьшает антропогенный фактор воздействия на окружающую среду. Экологический маршрут и экологическая тропа представлены как наиболее эффективные способы такого туризма.

Ключевые слова: экологический туризм, экологический маршрут, экологическая тропа, экологическое просвещение.

ECOLOGICAL TRAIL AND ECOLOGICAL ROUTE HOW WAYS TO DEVELOP ECO-FRIENDLY TOURISM

Stoyanova V.I., Kondratov N.A.

Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk, Russia

Abstract. The article considers the general features and principles of ecological tourism; the main goals are named. Tourism unites man and nature, helps to preserve the cultural and natural heritage, and reduces the anthropogenic impact on the environment. Ecological route and ecological path are presented as the most effective ways of such tourism.

Keywords: ecological tourism, ecological route, ecological path, ecological education.

В современном мире остро стоит вопрос оптимального сосуществования человека и природы. Глобальные масштабы принимает воздействие антропогенного фактора [4].

Туризм – это путешествие, совершаемое человеком в свободное от основной работы время в оздоровительных, познавательных, профессионально – деловых, спортивных, религиозных и иных целях. Можно утверждать, что туризм – один из самых «экологических природопользователей» [2]. Современная туристская отрасль становится всё более «зеленой», всё большее количество туристов уделяют внимание вопросам сохранности естественной природы, которая во многом зависит от экологически ответственного мировоззрения, поведения, экологической культуры человека.

Экологический туризм (экотуризм) как самостоятельный вид туризма практически без вреда для окружающей среды и с пользой для местных сообществ объединяет человека и природу. В 1980-е годы во многих странах мира для туризма стала характерна «экологическая направленность». В 1990-е годы появился термин «экологический туризм» как название одного из функциональных типов туризма. Экотуризм и экологичное путешествие часто считают взаимозаменяемыми понятиями. Они исходят из идеи, что путешествия должны оказывать положительное влияние на общество и окружающую среду. В обоих случаях все сводится к принятию осознанных решений о путешествии более экологичным, эффективным и этичным способом.

В 2002 году, в Международный год экологического туризма, Всемирная туристская организация дала следующее определение экологического туризма: «это такие формы и виды туризма, при которых главной мотивацией туриста к совершению путешествия является наблюдение и общение с природой и которые способствуют сохранению окружающей среды, а также культурного и природного наследия, оказывая на них минимальное воздействие». Определяющим признаком экотуризма часто рассматривается путешествие рекреанта с научно-познавательными целями. Сферой интересов экотуристов является окружающая среда. Особый интерес представляют туризм в особо охраняемых природных территориях [3].

Экологический туризм называют «мягким» туризмом, противопоставляют остальным видам туризма, часто именуемых «жесткими», главной целью которых является часто только извлечение прибыли. Для «мягкого» туризма характерны не только извлечение экономической выгоды (что не является главным при таком виде туризма), но комплексное развитие территорий и местных сообществ, забота о культурном благополучии туристских районов, щадящем использовании и воспроизводстве природных ресурсов, минимизация ущерба окружающей среде. Экотуризм делает вклад в экологическое образование и просвещение местного населения [4,5].

Экотуризму присущи принципы, которые составляют его концепцию, известную как три столпа устойчивости: экономическое воздействие, социально-культурное воздействие и воздействие на окружающую среду. Эти принципы ориентированы на то, чтобы у потребителя была возможность сделать экологически устойчивый выбор во всех аспектах и на всех этапах своего путешествия, от выбора маршрута, мест ночлегов, досуга (активного отдыха в природе) и до возвращения домой [6].

Турист может отправиться в отпуск в рамках экотуризма, при этом большинство аспектов его поездки вращаются вокруг концепции экотуризма, или он может включить в свой отпуск некоторые элементы экотуризма. На рисунке 1 приведены некоторые виды экологического туризма.

Основные цели таких туров могут быть следующие:

1. Отдых в окружении природы
2. Изучение, наблюдение за дикой природой
3. Лечение природными факторами
4. Спортивные цели и др.

Одной из универсальных форм экологического туризма и экологического просвещения широких слоев населения, где возможно комплексное осуществление физического, патриотического, краеведческого и экологического воспитания и образования являются экологическая тропа и экологический маршрут [5].

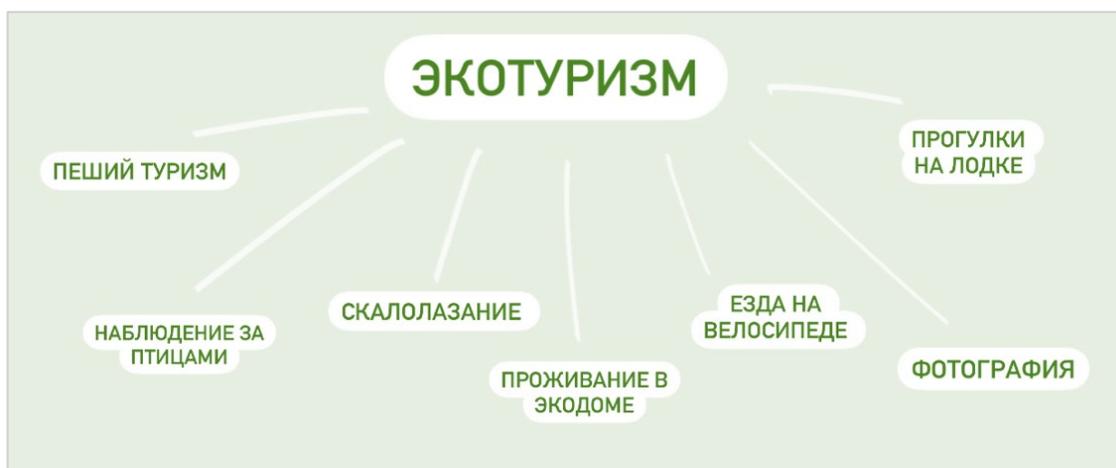


Рисунок 1 – Виды экотуризма. Составлено автором.

Универсальной формой экопросвещения, где объединяется воспитание краеведческого, патриотического, экологического и физического образования является именно экологическая тропа или маршрут. Экологическая тропа представляет собой туристический маршрут, который разработан и оборудован для проведения экологических или других видов экскурсий. Основная цель создания экотроп заключается в формировании мировоззрения, экологического воспитания, культуры и образования, а также совмещение активного отдыха посетителей экологической тропы с просветительской. Экологические тропы могут называться по-разному: тропа природы, научная трасса, естествоведческая тропа. Обычно подобные тропы прокладываются в зонах организованного туризма, в национальных парках или в ландшафтных заказниках [6]. На рисунке 2 приведен пример такого маршрута, а именно аншлаг экологической тропы в Архангельской области под названием «Ганькина Кулига» (Карась-озеро, Карасеро).

Рисунок 2 – Аншлаг экотропы «Ганькина Кулига». Составлено автором.

Экологический маршрут – это место диалога человека с природой, средство пропаганды экологически грамотного поведения. Он необходим для сохранения, восстановления и изучения естественных и благоустройства естественно-антропогенных экосистем.

Экомаршрут позволяет вести длительные наблюдения. Экологический маршрут и топа должны быть доступны для посетителей, а значит, находиться неподалеку от транспортных магистралей, стоянок машин, населенных пунктов. Такой маршрут должен обходить места обитания и произрастания редких видов флоры и фауны, не затрагивать хрупких природных объектов. Также очень важна привлекательность для посетителей. Лесные чащи должны чередоваться с полянами, ручьями и родниками, лугами, озёрами, болотами.

Важный компонент – это информативность, что определяется сочетанием уникальности и типичности. Разные объекты могут показать рациональное или нерациональное природопользование, например, напомнить посетителям, как долго возобновляется нарушенная человеком природная территория. Образовательная часть такого процесса является одним из основных принципов экологического туризма. Он должен привносить новую, кратко-изложенную и интересную, познавательную информацию для туристов, которые посещают данную местность, и природную составляющую. Также такой туризм должен начать обучать стейкхолдеров в сфере туризма [8].

Маршрут должен иметь форму петли или выходить в населенный пункт, от которого посетители смогут добраться до автомобильной трассы. Выбрав расположение маршрута, его необходимо согласовать с землевладельцем (лесничество и т.п.). Затем начинается его детальная разработка [5,3].

Основные требования, которые нужно учитывать при выборе своего будущего маршрута:

1. Привлекательность
2. Доступность
3. Информативность
4. Безопасность

Привлекательность возникает из следующих частей, а именно: разнообразие, индивидуальность тропы и изящность природы. Живые и насыщенные ландшафты, уникальность маршрута, своеобразие территории, эстетическая привлекательность вовлекут большое количество туристов, по сравнению с монотонными и однообразными территориями [1].

Библиографический список

1. Андреева В.Л. Экотропа в пространстве природно-культурных ландшафтов – 2021, с 5-11.
2. Макаренко С.Н., Саак А.Э. История туризма: Таганрог: Изд-во ТРТУ, 2003, 94 с.
3. Андреева В.Л. Экотропа в пространстве природно-культурных ландшафтов – 2021, с 5-11.
4. Могильнер А.А., Яхонтов Е.Л., УСЫНОВИ ЗАКАЗНИК: методическое пособие для юных защитников природы. Москва: Издательство Центра Охраны дикой природы, 2006. 55с.
5. Трухачев А.В., Таранова И.В. Туризм. Введение в туризм – ФГБОУ ВПО Ставропольский государственный аграрный университет, 2013.
6. Экологический туризм и экология туризма: учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений/Е.Ю. Колбовский. – М.: Издательский центр «Академия», 2006. – 256 с.
7. Экологическая тропа в Псковском модельном лесу А. Т. Загидуллина, Ю. Н. Бубличенко, А. Г. Бубличенко, С. В. Андреева, Н. Б. Глушковская, Е. В. Кушневская, Е. С. Попов. СПб., 2006. 76 с.
8. Штебнер С. В., Ерлыгина Е.Г. // Развитие экологического туризма – 2022.

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИГОНА ТКО НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Волкова Е.Н.^{1,2}

¹ *Агрофизический научно-исследовательский институт, Санкт – Петербург, Россия*

² *Санкт-Петербургский государственный университет промышленных технологий и дизайна, Высшая школа технологии и энергетики, Санкт – Петербург, Россия*

Аннотация. Преобладающая часть ТКО направляется на захоронение на полигоны и свалки, которые после окончания жизненного цикла продолжают негативно воздействовать на окружающую среду и должны быть рекультивированы. В работе проведен анализ инженерно-экологических изысканий состояния окружающей среды на полигоне и окружающих его территориях, предложен оптимальный комплекс технических мероприятий, направленных на максимальное снижение негативного воздействия полигона ТКО на окружающую среду.

Ключевые слова ТКО, полигон, инженерно-экологические изыскания, рекультивация, дегазация.

CUUGUO GP V'QH'VJ G'Ю RCEV'QH'VJ G'O UY 'NCPF HKN'QP 'VJ G'GP XKT'QPO GP V''
Ю 'VJ G'O QUEQY 'TGI QP

Volkova E.N.^{1,2}

¹ *FBGNU Agrophysical Research Institute, St. Petersburg, Russia*

² *St. Petersburg State University of Industrial Technologies and Design, Higher School of Technology and Energy, St. Petersburg, Russia*

Abstract. The predominant part of MSW is sent to landfills and landfills, which after the end of the life cycle continue to have a negative impact on the environment and must be reclaimed. The paper analyzes the engineering and environmental surveys of the state of the environment at the landfill and the surrounding territories, proposes an optimal set of technical measures aimed at minimizing the negative impact of the MSW landfill on the environment.

Keywords: MSW, landfill, engineering and environmental surveys, reclamation, degassing.

По данным Всемирного банка примерно 19% бытовых отходов подвергается рециклингу или компостированию, 11% сжигается, остальные отходы направляются на захоронение. Именно полигоны и свалки ТКО относятся к наиболее распространенным и масштабным объектам накопленного экологического вреда. Они занимают огромные территории, которые приходится исключать из хозяйственного оборота, а присутствие свалки снижает кадастровую стоимость земли во много раз. Свалки являются источником многочисленных социальных и экологических проблем, вызывают протесты населения, могут стать причиной возникновения

многих опасных заболеваний. Однако закрытие полигона не означает мгновенного решения проблемы. Так, время разложения органического субстрата тела свалки с выделением свалочного газа продолжается более ста лет, тяжелые металлы, присутствующие в теле свалки переходят в растворимую форму и выщелачиваются также в течении всего жизненного цикла свалки. Таким образом, в течении всего жизненного цикла полигона может продолжаться негативное воздействие на компоненты окружающей среды [1,2]. По подсчетам представителей Счетной Палаты на 2021 год в России используется около 384 тыс. га земли под полигоны ТКО [3]. Многие полигоны уже закрыты на прием отходов очень давно, но данная площадь не может быть использована для других целей, поскольку не было оказано надлежащих мероприятий по рекультивации земель и снижению негативного воздействия на окружающую среду вокруг полигона.

Объект исследования: полигон ТКО, расположенный в городском округе Серпухов Московской области (закрыт на прием отходов в 2014 г.). Продолжительность эксплуатации полигона – 40 лет, объем размещенных отходов – 451473 м³. Общая площадь объекта составляет 61698 м² и представляет собой насыпь, частично заросшую сорной растительностью. Участок не попадает в водоохранную зону, а также в береговую полосу и прибрежную защитную полосу. Расстояние от полигона ТКО до ближайших нормируемых объектов составляет 180 м. Полигон имеет подъездную дорогу площадью 0,79 га, окруженную лесным массивом. Территория вокруг полигона преимущественно занята лесными массивами. С юго-восточной стороны находится шлакоотвал. С юго-западной стороны располагается садовое товарищество. Поверхностные воды представлены небольшим искусственным прудом со стоячей водой рядом с дорогой на въезде на полигон.

Цель наших исследований: провести анализ состояния окружающей среды на полигоне и окружающих его территориях по данным инженерно-экологических изысканий, предложить оптимальный комплекс технических мероприятий, направленных на максимальное снижение воздействия полигона ТКО на окружающую среду.

Для оценки влияния полигона на окружающую среду в 2020 году был проведен ряд исследований и лабораторных испытаний: отбор образцов грунта ненарушенной и нарушенной структуры, комплекс лабораторных исследований физико-механических свойств грунтов и химического состава подземных вод, была выполнена оценка качества поверхностной воды (обводненная канава на теле полигона и противопожарный пруд рядом с полигоном) исследования фильтрата. А также была проведена оценка качества атмосферного воздуха на полигоне и вблизи него, выполнены газогеохимические исследования свойств грунтового массива.

Основными факторами, влияющими на генерацию свалочного газа из полигонов, являются: климатические условия, сроки эксплуатации полигона, количество захороненных отходов, морфологический состав завезенных отходов, влажность отходов, содержание органической составляющей, жироподобных, углеводородных и белковых веществ в органике. Правильно организованная дегазация полигонов ТКО позволяет решить одновременно две задачи: повысить экологическую безопасность полигона и обеспечить его необходимыми энергоресурсами [5]. Согласно расчетам, максимальный выход биогаза составляет 184,186 м³ /час, валовый выброс 100,357 м³ /час. Расчетный метановый потенциал для полигона ТКО составляет 21,71 м³ /час.

Объем образующегося фильтрата до осуществления мероприятий по его снижению равен: 31716,12 м³ /год или 86,89 м³ /сут или 3,61 м³ /час.

Годовой объем поверхностных сточных вод, образующихся на территории водосбора, определяется как сумма поверхностного стока за теплый период (апрель-октябрь) и холодный (ноябрь-март) периоды года с общей площади водосбора объекта.

Результаты анализа протоколов инженерно-экологических изысканий на соответствие СанПиН 2.1.3684-21 [4] показали, что:

- почвы и грунты на полигоне и прилегающих к нему территориях имеют категории загрязнения почв «умеренно опасную» и «допустимую»;
- донные отложения из противопожарного пруда и обводненной канавы, находящихся на территории полигона, имеют «опасную» категорию загрязнения почв;
- концентрация веществ в атмосферном воздухе соответствует требованиям гигиенических нормативов;
- поверхностная вода из пруда, обводненной канавы, а также фильтрат от полигона по физико-химическим показателям не соответствуют гигиеническим требованиям;
- на территории объекта выявлены газогенерирующие грунты, относящиеся к категории «пожаро- и взрывоопасные».

Основными факторами, влияющими на генерацию свалочного газа из полигонов, являются: климатические условия, сроки эксплуатации полигона, количество захороненных отходов, морфологический состав завезенных отходов, влажность отходов, содержание органической составляющей, жироподобных, углеводородных и белковых веществ в органике. Согласно расчетам, максимальный выход биогаза составляет 184,186 м³ /час, валовый выброс 100,357 м³ /час. Расчетный метановый потенциал для полигона ТКО составляет 21,71 м³ /час. Правильно организованная дегазация полигонов ТКО позволяет решить одновременно две задачи: повысить экологическую безопасность полигона и обеспечить его необходимыми энергоресурсами [5].

Объем образующегося фильтрата до осуществления мероприятий по его снижению равен: 31716,12 м³ /год или 86,89 м³ /сут или 3,61 м³ /час.

Годовой объем поверхностных сточных вод, образующихся на территории водосбора, определяется как сумма поверхностного стока за теплый период (апрель-октябрь) и холодный (ноябрь-март) периоды года с общей площади водосбора объекта.

По результатам выполненных экономических расчетов, расчетов количеств образующихся побочных продуктов предложенных альтернативных вариантов, анализа протоколов лабораторных исследований полигона были определены оптимальные мероприятия по модернизации полигона.

В части обращения со свалочным газом предлагается установить на полигоне ТКО систему дегазации, состоящую из отводящих скважин (пассивная система дегазации). Такая система позволит снизить риск возникновения пожаро – и взрывоопасных ситуаций на полигоне. В части обращения с фильтрационными водами предлагается обустроить водоотводящую сеть из кольцевого дренажа, которая будет собирать образующийся фильтрат и аккумулировать его в контейнере для сбора фильтрата. Далее предполагается передавать его для дальнейшей утилизации сторонней организации, имеющей лицензию на обращение с такого рода отходами. В части обращения с поверхностными стоками предложена система сбора и очистки их непосредственно на полигоне. ЛОС поверхностного стока обеспечат очистку по всем показателям до ПДКр.х.. Очищенная вода может применяться для пылеподавления дорожных покрытий и полива зеленых насаждений. Финальное перекрытие полигона – из геосинтетических материалов. Данные мероприятия этапа технической

рекультивации позволят снизить негативную нагрузку на окружающую среду и подготовить полигон к биологическому этапу рекультивации.

Библиографический список

1. Аржанцева З.Ю. Рекультивация полигонов ТКО//Метеорологический вестник. -2018. - т.10.-№2.-с.50-64.
2. Бабина Ю.В. Эксплуатация, закрытие и рекультивация полигонов ТКО//Твердые бытовые отходы. -2019.-№12 (162).-с.34-38.
3. Площадь объектов размещения ТКО в России достигла размеров Греции: (интервью вице-премьера Абрамченко В.В.) // Твердые бытовые отходы. Новости отрасли. – Текст: электронный. Изображения: электронные. URL: <https://news.solidwaste.ru/2021/05/ploshhad-obektov-razmeshheniya-tko-vrossii-dostigla-razmerov-gretsii/>. – Дата публикации: 28 мая 2021. (дата обращения 08.10.2022).
4. Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий: СанПиН 2.1.3684-21: (утверждены Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28 января 2021 года №3) – Москва. 2021. – Текст: электронный. Электронный фонд правовых и нормативных документов. URL: <https://docs.cntd.ru/document/573536177?marker=7DI0K8> (дата обращения 08.10.2022).
5. Садчиков А.В. Проблемы дегазации полигонов твердых коммунальных отходов//Успехи современной науки и образования. -2017. -т. 5.-№2.-с.28-30.

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ РЕКИ ДОН В СТАНИЦЕ МЕЛИХОВСКАЯ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Гречка Е.А.

*Институт сферы обслуживания и предпринимательства (филиал) ДГТУ в г. Шахты,
Шахты, Россия*

Аннотация. В статье рассмотрено экологическое состояние участка реки Дон Ростовской области, расположенного на станице Мелиховская. Представлены результаты исследования качественного состава водного объекта, проведённые в 2022 году. Осуществлена оценка экологического состояния выбранного участка реки на основе индекса загрязнённости воды взятых проб по шести показателям. Проанализированы центральные источники неудовлетворительного состояния реки и приложены мероприятия для поддержания и улучшения экологического состояния водного объекта.

Ключевые слова: поверхностные воды, экологический баланс, водопотребление, водный объект, индекс загрязнённости воды.

ECOLOGICAL ASSESSMENT OF THE WATER QUALITY OF THE DON RIVER IN THE VILLAGE OF MELIKHOVSKAYA, ROSTOV REGION

Grechka E. A.

Institute of Service and Entrepreneurship (branch) of DSTU in Shakhty, Shakhty, Russia

Abstract. The article considers the ecological state of the Don river section of the Rostov region, located in the village of Melikhovskaya. The results of a study of the qualitative composition of a water body conducted in 2022 are presented. An assessment of the ecological state of the selected section of the river was carried out on the basis of the water pollution index of the samples taken according to six indicators. The central sources of the unsatisfactory state of the river were analyzed and measures were taken to maintain and improve the ecological condition of the water body.

Keywords: surface waters, ecological balance, water consumption, water body, water pollution index.

Поверхностные воды Ростовской области ежедневно и на протяжении нескольких лет непрерывно подвергаются различного рода загрязнениям. Вода в них представляет собой основной источник для эффективного обеспечения жизни важнейших из элементов естественной среды. Основная роль воды заключается в поддержании экологического баланса, обеспечивающего сохранность и защищённость здоровья, проживающего недалеко от водного объекта населения [1].

Мониторинг параметров качества воды даёт возможность для создания устойчивого функционирования водных источников, с целью формирования эффективного водопотребления и вследствие этого обеспечения безопасности и безвредности воды [2].

Объектом исследования был выбран участок реки Дон, расположенный в станице Мелиховская, Усть-Донецкого района, Ростовской области (рис. 1).

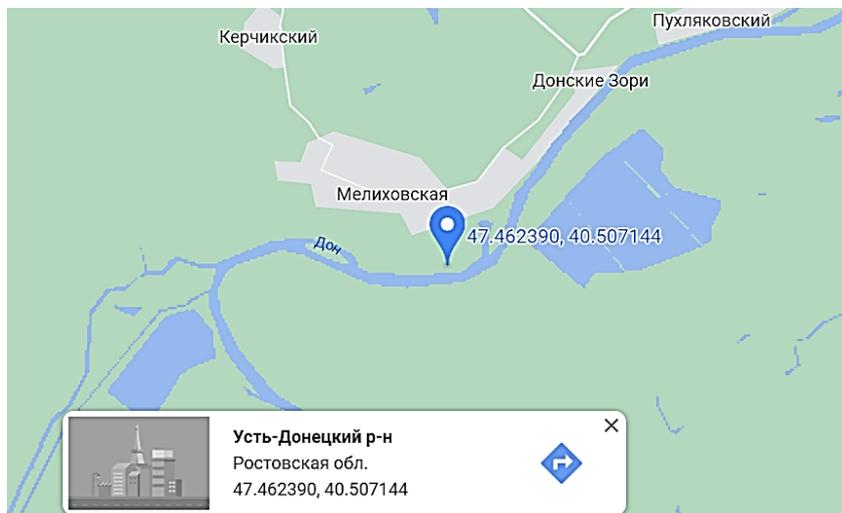


Рисунок 1 – Место отбора проб воды из р. Дон.

В соответствии с данными Экологического вестника Дона [3] по истечении многих лет вода в реке Дон находится в пределах 4 класса разряда «А» и характеризуется категорией «грязная». Превышение значений ПДК на участке от х. Поповка до р. п. Усть-Донецкий в 2021 году отмечается в 53-100% анализируемых проб. Одними из преобладающих загрязняющих веществ водного объекта являются органические вещества по БПК И ХПК, нитритный азот, соединения железа и нефтепродукты.

Динамика изменения среднегодовых концентраций отдельных загрязняющих веществ за период с 2019 по 2021 гг. в створе наблюдения участка реки Дон от х. Поповка до р. п. Усть-Донецкий представлена на рисунке 2.

Согласно статистическим данным [3] в 2020 году величина удельного комбинаторного индекса загрязнённости воды на наблюдаемом участке в сравнение с предшествующим годом увеличилась, и составила 5,13. По истечению 2021 года величина УКИЗВ в сравнении с предшествующим годом не изменилась. Качество воды в исследуемом объекте по-прежнему оценивается 4 классом разрядами «А», «Б», «В» с характеристикой «грязная» и «очень грязная» (рис. 3).

Ежегодно качество воды в реке ухудшается и демонстрирует предельные значения концентраций загрязняющих веществ. Это обусловлено ростом промышленной отрасли и объектов коммунального хозяйства городов.

Химический состав водных ресурсов бассейна р. Дон зависит преимущественно от антропогенных факторов [4], оказывающих на них непосредственное воздействие. В качестве таких аспектов выступают промышленные предприятия, находящиеся вблизи водоёмов, сточные воды которых содержат в своём составе большую долю загрязняющих веществ.

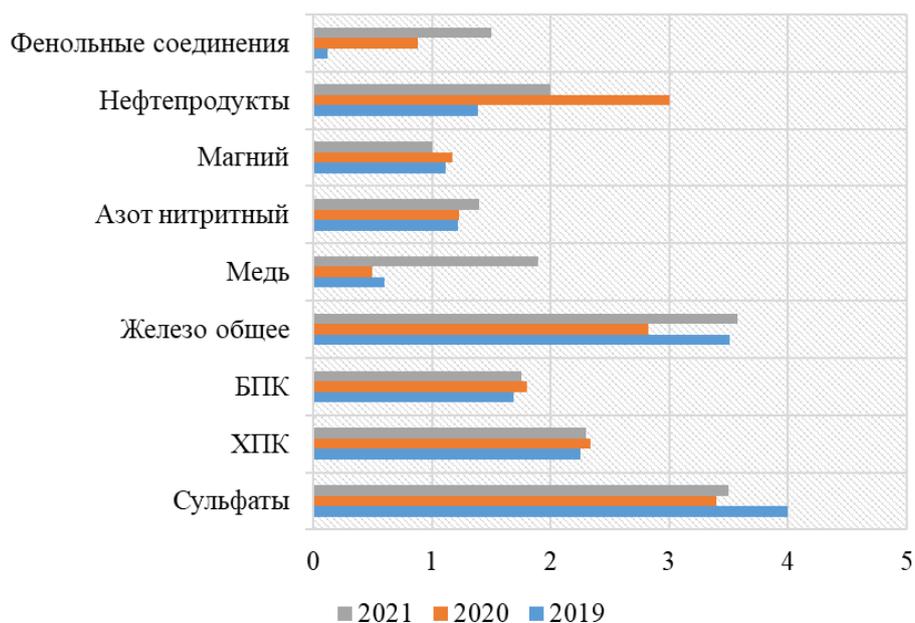


Рисунок 2 – Динамика изменения среднегодовых концентраций отдельных загрязняющих веществ за 2019-2021 гг. в створе наблюдения притока р. Дон на выбранном участке.

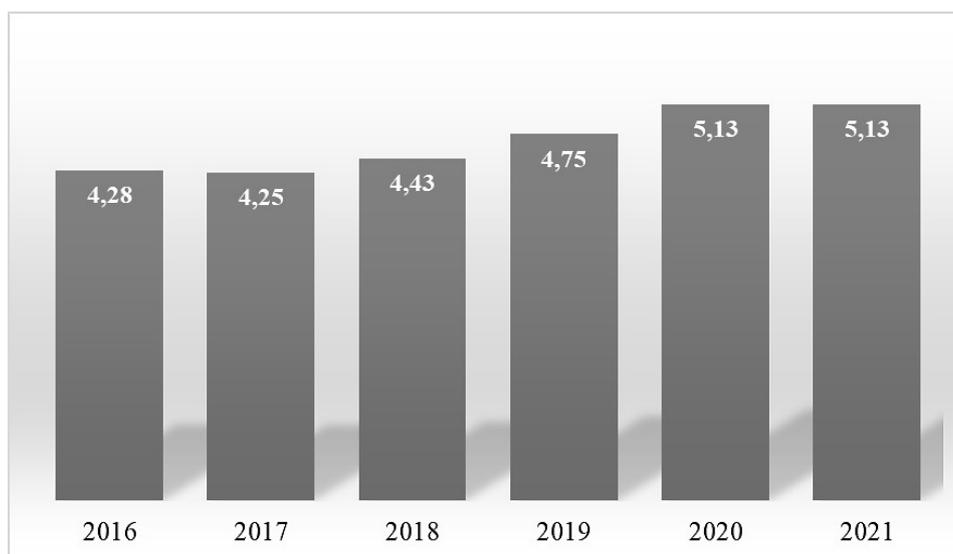


Рисунок 3 – Динамика изменений УКИЗВ р. Дон на участке от х. Поповка до р. п. Усть-Донецкий.

Кроме того, значительную долю вредных веществ в водный объект приносят сельскохозяйственная промышленность, в процессе деятельности которой поля обрабатывают различными комплексами удобрений и пестицидов. Сбрасываемые воды с плантаций попадая в водное пространство частично или полностью изменяют качественный состав воды.

Питание реки Дон происходит преимущественно за счёт вод, образующихся в процессе таяния снежных покровов, а также с дождевыми и грунтовыми стоками. Талая вода, с промышленных областей города, обуславливается максимальным количеством загрязняющих веществ, в том числе тяжелых металлов и полимеров.

Гидрохимический анализ проб воды в выбранного участка реки Дон был осуществлён при помощи комплектов оборудования производства компании ЗАО «Крисмас+».

Исследование качества воды проведено по восьми показателям: биохимическое потребление кислорода (БПК₅), растворённый кислород (РК), водородный показатель рН, хлориды, сульфат-ион, железо общее, алюминий, содержание нефтепродуктов [5]. Результаты анализа сопоставлены с СанПиН 2.1.3685-21 [6] и представлены в таблице.

Таблица – Результаты анализа качества воды участка р. Дон, расположенного на станции Мелиховской

Наименование показателя	Метод анализа	Полученный результат	ПДК
БПК ₅	Йодометрическое титрование по Винклеру	5,76 мг О ₂ /л	4 мг О ₂ /л
Растворённый кислород (РК)	Йодометрическое титрование по Винклеру	8,53 мг/л	не менее 4 мг/л
рН	Колометрический	7,5	6-9
Хлориды	Аргентометрическое титрование	0 мг/л	213 мг/л
Сульфат-ион	Титриметрический	256 мг/л	384 мг/л
Железо общее	Колометрический	0,1 мг/л	0,1 мг/л
Алюминий	Колометрический	0 мг/л	0,1 мг/л
Нефтепродукты	Экстракционный бумажно-хроматографический	5,5 мг/л	0,3 мг/л

Таким образом было выявлено несоответствие норме по двум показателям, а именно – БПК_{полн} и нефтепродукты. Источниками поступления нефтепродуктов в поверхностные водоёмы являются: перевозка нефти водным способом, сточные воды предприятий. Даже сравнительно небольшие концентрации нефтепродуктов в воде способны нанести значительный ущерб здоровью человека. Известно, что при купании в водоемах с повышенной концентрацией данных веществ существует риск возникновения и развития дерматологических заболеваний. Показатель биологического потребления кислорода характеризует основные показатели наличия органики в водных объектах. При повышенных концентрациях БПК₅ и БПК_{полн} можно судить о высокой степени загрязнённости водоёмов. Недостаточно очищенная вода, содержащая вредные токсичные соединения, способствует заиливанию и цветению водоёма, и тем самым вызывает гибель живых организмов. Также избыток кислорода в воде, создаёт условия для вымирания рыб и других живых организмов, в связи с тем, что требуемый для дыхания кислород тратится бактериями на окисление органических веществ.

Для оценки степени соответствия качества воды в исследуемом объекте за основу был взят Индекс загрязнённости воды (ИЗВ). В данном способе расчёта применяют долю превышения ПДК по строго лимитированному числу индивидуальных ингредиентов:

$$\text{ИЗВ} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{C_i}{\text{ПДК}_i},$$

где C_i – концентрация i -го загрязняющего компонента и в некоторых случаях, значение физико-химических параметров; n – число показателей, используемых для расчета, $n = 6$; ПДК _{i} – определённая величина норматива для соответствующего типа водного объекта.

Расчёт ИЗВ производится строго по шести показателям, независимо от того превышают они ПДК или нет, обязательными из которых являются водородный показатель рН,

биологическое потребление кислорода БПК₅ и содержание растворенного кислорода. По обязательным показателям находят отношения $C_i / ПДК_i$ фактических концентраций к ПДК и полученный список ранжируют.

Для расчёта ИЗВ исследуемого участка реки были взяты следующие показатели: БПК₅, РК, рН, нефтепродукты, сульфат-ион, железо общее. Значение индекса составило 4,39, следовательно, участок реки на станции Мелиховской, Усть-Донецкого района относится к V классу качества воды, характеристика состояния качества воды – «грязная».

Оценка качества воды на определённом участке реки является в глобальном смысле важной задачей, поскольку загрязнение части водотока способно повлечь за собой ухудшение качества воды реки Дон в целом.

На основании того, что река Дон является первостепенным ресурсом для забора воды по территории Ростовской области, важным является поддержание и улучшение качества воды [7]. Для снижения загрязнения следует внедрить следующие мероприятия:

- проведение образовательных проектов для проживающего возле реки Дон населения с целью формирования экологического воспитания;
- увеличение штрафов за неблагоприятное воздействие на окружающую среду;
- озеленение берегов реки, для предотвращения размывов берегов и укрепления склонов реки;
- совершенствование системы наблюдения за качеством водных ресурсов;
- улучшение систем водоочистных сооружений;
- очистка реки от заиливания и зарастания.

Водные ресурсы, находящиеся в оптимальном объёме и качественном составе, являются гарантией благоприятного водопользования. Неэффективная очистка сточных вод способна вызвать гибель флоры и фауны водных объектов, увеличение заболеваемости населения. Контроль за соблюдением качественных показателей водного объекта, позволяет выявить и оценить антропогенное воздействие и создать условия для эффективного соблюдения нормативов и требований качества окружающей среды.

Библиографический список

1. Костромина Е.И. Анализ качества поверхностных вод в г. Шахты на примере реки Грушевка / Е.И Костромина., Ю.С. Шаталова, Е.А. Гречка // Перспективные технологии в строительстве и техносферной безопасности: сборник научных трудов. Шахты: ИСОиП (филиал) ДГТУ в г. Шахты, 2020. – С. 35-43.
2. Стуженко Н.И. Теоретические основы построения региональных систем мониторинга / А.Г. Илиев, И.А. Стуженко, Е.И. Костромина, А.И. Шеметов // Инженерный вестник Дона. – 2015. – № 4 (38). – 18 с.
3. Экологический вестник Дона // Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области: информационный портал URL: <https://cloud.mail.ru/public/ynx9/gy8yarJa4/VESTNIK-inter2021.pdf> (дата обращения: 12.06.2022).
4. Кулик А.К., Власенко М.В., Бородычев В.В., Балкушкин Р.Н. Оценка качества поверхностных вод бассейна реки Дон для обеспечения устойчивого функционирования водохозяйственного комплекса // Известия НВ АУК. 2019. №2 (54). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/otsenka-kachestva-poverhnostnyh-vod-basseyna-reki-don-dlya-obespecheniya-ustoychivogo-funktsionirovaniya-vodohozyaystvennogo> (дата обращения: 15.06.2022).

5. Руководство по анализу воды. Питьевая и природная вода, почвенные вытяжки / Под ред. к.х.н. А.Г. Муравьева, Изд. 5-е, перераб. и дополн. СПб.: «Крисмас+». – 2021. – 360 с.
6. СанПиН 2.1.3685-21. Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания. М.: Постановление Главного государственного санитарного врача РФ / Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. – 01.03.2021. – 975 с.
7. Чижевская Н.А. Экологическое состояние реки Дон / Н.А. Чижевская, И.А. Приходько // Colloquium-journal. – 2021 г. – № 3 (90). – С. 19. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/ekologicheskoe-sostoyanie-reki-don/viewer> (дата обращения: 18.06.2022).

ОБЕСПЕЧЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ПРАВОПОРЯДКА ПРАВООБРАЗОВАТЕЛЬНЫМИ ОРГАНАМИ

Гуссамова А. Д.

*Казанского института (филиал) Всероссийского государственного университета
юстиции (РПА Минюста России), Казань, Россия.*

Аннотация. В статье анализируется деятельность правоприменительных органов в области экологии, как одна из важнейших в сфере борьбы с данной глобальной проблемой человечества. Даются рекомендации по совершенствованию российского экологического правопорядка.

Ключевые слова: правоприменение, экологический порядок, экологические проблемы, органы государственной власти, законодательство.

ENSURING ENVIRONMENTAL LAW AND ORDER BY LAW ENFORCEMENT AGENCIES

Gussamova A. D.

Kazan Institute (branch) VGUYU (RPA of the Ministry of Justice of Russia), Kazan, Russia

Abstract. The article analyzes the activities of law enforcement agencies in the field of ecology, as one of the most important in the fight against this global problem of mankind. Recommendations are given to improve the Russian environmental order.

Keywords: law enforcement, environmental order, environmental problems, state authorities, legislation.

В современном мире государство и общество все больше демонстрируют свою озабоченность проблемами в области экологии, а также поиском стратегических путей их решения.

Экологические проблемы – это явления нашей современной реальности мирового характера, показывающие неблагоприятное состояние окружающей среды, вызванные техногенной деятельностью людей и ставящие под угрозу существование человечества и ее стабильное развитие, устранение которых возможно только путем объединения усилий массовой общественности. На сегодняшний день вопросы улучшения экологической ситуации, стабильного развития, рационального потребления природных ресурсов, внедрение энергосберегающих технологий сформулированы как основные направления деятельности государства.

Экологические проблемы каждого региона всегда тесно связаны с его природными условиями, естественными ресурсами, а также их использованием. Решение данных вопросов

является непростым, это связано с необходимостью выявить не только накопившиеся проблемы, но и определить проблемы, связанные с будущим развитием экологической ситуации.

Задача формирования эффективных инструментов и технологий защиты окружающей природной среды была и остается одной из наиболее актуальных. Как показывает практика, основной блок проблем, касающихся обеспечения экологического правопорядка, сегодня находится в правореализационной сфере, особенно в области властной деятельности правоприменительных органов по претворению правовых норм в жизнь.

Для предупреждения и устранения этих проблем необходимо в целом повысить эффективность правового регулирования в сфере экологии, в области борьбы с современными глобальными экологическими проблемами человечества. Основными направлениями в данной сфере, на наш взгляд, являются: совершенствование экологического правотворчества, совершенствование правоприменения в экологической сфере, повышение уровня экологической и правовой культуры населения.

В связи с этим создание концепции экологического правопорядка обосновано потребностью выявления, в каком состоянии находится экологическое законодательство на нынешнем этапе его развития, формирования дальнейших направлений развития правового регулирования экологических правоотношений в Российской Федерации, а также мониторинга состояния осуществления экологического законодательства в нашей стране [1, с. 331].

Важнейшими направлениями деятельности органов государственной власти в обеспечении экологического правопорядка выступают: повышение качества работы правоприменительных органов, активизация их функционирования в области защиты экологических интересов граждан, обеспечение экологической безопасности, профилактика и борьба с экологической преступностью и правонарушениями в целом в этой сфере.

Экологическая доктрина Российской Федерации ставит задачу формирования более совершенного правового механизма обеспечения защиты окружающей нас природной среды и экологической безопасности, а также усовершенствования правоприменительной практики [2].

Экологическая безопасность и экологический правопорядок неразрывно связаны с общественной безопасностью и общественным правопорядком, реализация, поддержание, контроль за соблюдением которых осуществляют правоприменительные органы.

Например, профилактика экологических правонарушений является важным направлением деятельности органов внутренних дел в области охраны природы. Их главная задача выявление причин и условий, способствующих совершению экологических правонарушений, а потом, соответственно, разработка мер по их предупреждению.

Органы прокуратуры являются важнейшим государственным звеном в механизме надзора за исполнением экологического законодательства. Надзор за исполнением законодательства об охране окружающей природной среды – одно из главных направлений их деятельности. Он осуществляется в строгом соответствии с Федеральным законом "О прокуратуре Российской Федерации" (далее – Закон о прокуратуре РФ).

В соответствии с Законом о прокуратуре РФ, органы прокуратуры осуществляют прокурорский надзор за обязательным исполнением природоохранного законодательства органами представительной и исполнительной власти, государственного управления и экологического контроля, юридическими лицами, общественными объединениями, должностными лицами, проверку законности и полноты принимаемых ими мер по устранению выявленных нарушений и привлечению виновных к ответственности, а также защиту

конституционных прав граждан на благоприятную окружающую природную среду, достоверную информацию об ее состоянии и на возмещение ущерба, причиненного их здоровью экологическими правонарушениями [3].

Также Правительство РФ, как высший исполнительно-распорядительный орган государственной власти, осуществляет подавляющее большинство экологических полномочий, предоставленных Конституцией и федеральными законами в ведение Российской Федерации и в совместное ведение Федерации и субъектов РФ. В условиях глобализирующегося мира решение экологических проблем требует совместных усилий. Организуя реализацию внешней политики, Правительство РФ активно участвует в подготовке, подписании и выполнении европейских и иных международных конвенций и соглашений по вопросам защиты природной среды.

Резкое ухудшение экологического состояния планеты предполагает усиление внимания к единой государственной экологической политике и принятие дальнейших мер по неуклонному исполнению предписаний нормативных правовых актов в контексте с реализацией социальной и других важнейших функций российского государства.

Именно поэтому в Российской Федерации государственный экологический контроль за состоянием окружающей среды согласно ст. 65 Федерального закона «Об охране окружающей среды» осуществляется федеральными органами исполнительной власти и органами исполнительной власти субъектов РФ, а также органами местного самоуправления и другими структурами [4].

Эффективность экологического правотворчества в большой степени зависит от конкретной деятельности компетентных органов и применения ими экологических норм. Из этого следует, учитывая важность законодательной работы на профессиональном уровне, что качество правоприменения является наиболее значимым составляющим звеном.

Так, в ходе правоприменительной деятельности зачастую выявляются пробелы и коллизии в законодательстве, ошибки в его реализации, отсутствие необходимых правоконкретирующих положений, другие отрицательные явления правового регулирования, которые определяют необходимость поиска эффективных путей решения экологических проблем и установление экологического правопорядка [6].

На основании проведенного исследования, с целью совершенствования российского экологического правопорядка, предлагаем следующие рекомендации:

1. Создание в Правительстве Российской Федерации федерального органа исполнительной власти, который будет осуществлять надзор и контроль за экологическим состоянием;
2. Ужесточение наказания за совершение определенных экологических преступлений, это может послужить толчком к снижению преступлений в сфере экологии и установления экологического порядка;
3. Повышение профессиональной подготовки и квалификации работников органов правоприменительной деятельности посредством внедрения в практику их работы новых форм и методов обучения с учетом требований экологического законодательства;
4. Привлечение общественности к участию в оценке воздействия на окружающую среду через создание негосударственных социальных институтов, имевших бы возможность войти в состав экспертной комиссии государственной экологической экспертизы.

Таким образом, тенденция глобальных экологических проблем показывает недостаточную эффективность на сегодняшний день комплекса различных мер в области охраны природы, предпринимаемых правоприменительными органами, что свидетельствует о необходимости в дальнейшем разрабатывать, принимать и реализовывать стимулирующие

механизмы по совершенствованию правоприменительной практики исходя из целей обеспечения экологической безопасности и укрепления экологического правопорядка в нашей стране.

Библиографический список

1. Захаров Александр Вячеславович. Совершенствование правоприменения в экологической сфере как средство борьбы с современными глобальными экологическими вызовами человечеству // Вестник ТГУ. 2011. №1. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovershenstvovanie-pravoprimeneniya-v-ekologicheskoy-sfere-kak-sredstvo-borby-s-sovremennymi-globalnymi-ekologicheskimi-vyzovami> (дата обращения: 17.11.2020).
2. Об одобрении Экологической доктрины Российской Федерации: распоряжение Правительства РФ от 31.08.2002 г. №1225-р // СЗ РФ. 2002. № 36. Ст. 3510.
3. Федеральный закон от 17.01.1992 № 2202-1 «О прокуратуре Российской Федерации» (с изм. и доп.). URL: <http://www.consultant.ru>.
4. Федеральный закон от 10.01.2002 № 7-ФЗ «Об охране окружающей среды» (с изм. и доп.). URL: <http://www.consultant.ru>.
5. Исакова Ю.И. Экологическое право. Учеб. пособие. – Ростов н/Д: Издательский центр ДГТУ, 2015. – 152 с.

СТАРИННЫЕ УСАДЕБНЫЕ ПАРКИ НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ РФ КАК УНИКАЛЬНЫЕ ЭКОЛОГО-РЕКРЕАЦИОННЫЕ ОБЪЕКТЫ

Данилов Д.И., Гайворонская А.А., Анищенко Л.Н.

*Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского, Брянск,
Россия.*

Аннотация. В Брянской области изучены эколого-биологические особенности трёх старинных усадебных парков. В составе флоры старинных парков зарегистрированы 48 видов дендрофлоры, «сквозных», диагностируемых во всех насаждениях, из них 4 вида голосеменных. Обнаружены 129 травянистых растений и кустарничков из 95 родов. Выявлены популяции редких видов: лилии саранки, дремлика широколистного, наперстянки крупноцветковой, гомалии трихомановидной, неккеры перистой, пармелины липовой вид мониторингового списка региональной Красной книги гладыш широколистный.

Ключевые слова: старинные усадебные парки, лесные сообщества, биоразнообразие, Нечерноземье РФ.

THE OLD MANOR PARKS OF THE NON-BLACK EARTH REGION OF THE RUSSIAN FEDERATION AS UNIQUE ECOLOGICAL AND RECREATIONAL OBJECTS

Danilov D. I., Gaivoronskaya A. A., Anishchenko L. N.

Bryansk State University named after Academician I.G. Petrovsky, Bryansk, Russia

Abstract. In the Bryansk region, the ecological and biological features of three ancient manor parks were studied. As part of the flora of ancient parks, 48 species of dendroflora are registered, «through», diagnosed in all plantations, of which 4 species are gymnosperms. 129 herbaceous plants and shrubs from 95 genera were found. Populations of rare species have been identified: *Lilium martagon* L., *Epipactis helleborine* (L.) Crantz, *Digitalis grandiflora* Mill., *Homalia trichomanoides* (Hedw.) Bruch. et al., *Neckera pennata* Hedw. species of the monitoring list of the regional Red Book smooth broad-leaved.

Keywords: ancient manor parks, forest communities, biodiversity, Non-Black Earth Region of the Russian Federation.

Староосвоенный регион Нечерноземья РФ – Брянская область – богат уникальными экологическими объектами, которые имеют природоохранное, рекреационное, средообразующее и культурологическое значение: старинные усадьбы с парками различной степени сохранности [1]. Расцвет парковой культуры, охвативший всю Европейскую часть России, приходился на временной интервал с 1762 по 1865 гг. и отразился в Брянской области немногочисленными сохранившимися объектами, эколого-биологический комплекс которых изучен недостаточно.

Значительная часть старинных усадебных парков до сих пор служит удачными образцами создания искусственных ландшафтов, которые особенно бережно сохранялись в 50-70-е гг. прошлого века, так как на их территории располагались общественные парки, санаторно-курортные комплексы, некоторые получили статус ООПТ [1, 2]. По прошествии столетия усадебные парки сформировали достаточно устойчивые ценозы, композиции, подчинённые художественному, архитектурному или утилитарному замыслу [3]. В начале XXI века при отсутствии в значительной части уникальных квазинативных сообществ охранных мероприятий, незаконном строительстве и сведении лесных сообществ, установлено нарушение гомеостатического равновесия, потеря парками рекреационной привлекательности. В списки старинных усадебных комплексов области, ценных в историко-культурном и, что особенно важно, эколого-биологическом плане внесены 19 объектов, на территории значительной части из них имеются усадебные парки с лесами высокой природоохранной ценности. За десятилетний период сотрудниками университета инвентаризированы 12 усадебных парков, сформулированы некоторые рекомендации по поддержанию экологического равновесия. Цель представленной статьи – изучение фитобиоразнообразия лесов высокой природоохранной ценности в трёх старинных усадебных парках, современная экологическая оценка природного комплекса для дополнения информации мониторинговой базы.

Усадебные комплексы, впервые исследованные в эколого-биологическом аспекте, отнесены к объектам культурного наследия Брянской области: усадьба Миклашевских (Стародубский район, с. Понуровка) и усадьба Дуниных-Борковских (Мглинский район, с. Нов. Романовка) находятся в ведении региональных властей, усадьба П.В. Румянцева-Задунайского (Клинцовский район, Великая Топаль) – в федеральном перечне ценных объектов.

При исследовании применялся маршрутный метод, метод визуального обследования, методика учёта деревьев и их состояния по шкалам, рекомендованным для проведения ландшафтно-парковых изысканий [4, 5, 6]. На местности тотально вёли учёт древесной и кустарниковой флоры, а также травянистых растений, мохообразных и эпифитных лишайников. Выявляли редкие виды, виды мониторинговых списков региональной Красной книги. Видовой состав древесных видов анализировали по систематической, эколого-географической структуре, описывали эколого-хозяйственные группы. Характеризовали историю усадебных комплексов согласно классификации В.А. Топориной [7]. Для оценки историко-культурной значимости ландшафтно-парковых объектов применяли рекомендации И.А. Прониной и, дополняя методику, использовали критерии: исторической и архитектурной ценности, в том числе и парков, известность памятников, сохранность объектов усадебных комплексов, эстетической привлекательности, уровень парковой культуры. Оценка состояния насаждений (древостоя) представляли в баллах [8, 9].

Визуальные характеристики старинных усадебных парков в историко-культурных комплексах отразили следующее: усадьба Миклашевских – 18 баллов (средняя культурно-историческая значимость), Румянцева-Задунайского – 22,5 балла (высокая культурно-историческая значимость), Дуниных-Борковских – 19 баллов (средняя культурно-историческая значимость). При анализе историко-культурного наследия усадеб, современной структуры старинных парков и преобразований, которые произошли в парковых (лесных) сообществах, нами констатированы изменения, вызванные как прямыми, так и косвенными воздействиями. Все парки располагаются вблизи населённых пунктов, их напочвенный покров нарушен, претерпел значительные слитизационные нарушения, в отдельных местообитаниях

полностью вытопан. Также играет роль повышенная сомкнутость древесного яруса аллей ввиду отсутствия ухода, вызвавшая гибель газонов. Сравнительно небольшой по площади старинный парк в усадьбе Миклашевских ввиду значительного использования территории потерял практически все виды кустарников, высокодекоративные растения, встречавшиеся там по фондовым описаниям. В пространствах, ограниченных боскетами, в этом парке проводят интенсивный выпас скота и косьбу, а также складывают мусор на пространствах в аллеях с «выпавшими» деревьями. В усадебном парке Румянцевых-Задунайских имеет место другой вид антропогенного воздействия – непреднамеренный и целевой занос интродуцентов, которые вытесняют аборигенные виды и ценные травянистые растения газонов. Часть высоковозрастных деревьев вырублена для обустройства вспомогательных зданий. Также отсутствие ухода и декоративной обрезки деревьев в исследованных старинных объектах ландшафтной архитектуры привело к потере эстетического вида насаждений.

В сообществах старинных усадебных парков трёх изученных усадьбах установлены 48 видов дендрофлоры. Из хвойных видов, представленных немногочисленными особями, обнаружены: лиственница европейская, сосна веймутова, сосна обыкновенная, ель европейская, туя западная. Для сосны веймутовой и туи западной более чем вероятны современные посадки – середины XX века. Лиственных деревьев значительно больше, так как именно они в зоне хвойно-широколиственных лесов давали огромное разнообразие посадочного материала, к ним отнесли: берёзу повислую, вяз гладкий, вяз голый, дуб черешчатый, ива белая, ива козья, каштан конский обыкновенный, клён гиннала, клён татарский, клён остролистный, клён полевой, клён ясенелистный, липу сердцелистную, липу американскую, ольху клейкую и другие. Кустарники представлены: аронией черноплодной, барбарисом обыкновенным, караганой древовидной, бересклетом европейским, бересклетом бородавчатым, бузиной красной, дёренем белым, жостером слабительным, иргой ольхолистной, калиной гордовиной, крушиной ломкой, рябинником рябинолистным, сиренью обыкновенной, смородиной золотистой, розой морщинистой, снежноягодником обыкновенным, спиреей иволистной, спиреей дубравколистной, жимолостью лесной, пузыреплодником калинолистным. Парковый ассортимент составляют «сквозные» виды, такие как липа сердцелистная, отнесенная к наиболее устойчивым видам средней полосы, формирующая основу моновидовых аллеиных посадок, так как с этими видами отлично уживаются виды, включающие интродуцентов. Дуб черешчатый применялся в виде солитерных посадок, однако в усадьбе Дуниных-Борковских им сложены значительные по протяжённости аллеи. Клён остролистный также формирует моновидовые или смешанные аллеи, наиболее значительные по возрасту клёны отмечены в старинном парке Румянцева-Задунайского. Берёза повислая в трёх изученных объектах практически вся выпала, искусственная роща в старинном парке Дуниных-Борковских практически вся утрачена.

Из интродуцентов интересны лиственница сибирская, сосна веймутова (встречены в трёх парках), которые представлены в виде одиночных старовозрастных экземпляров. Орех маньчжурский возрастом более 100 лет обнаружен в парке Румянцева-Задунайского: черёмуха Мака в возрасте 65 лет – во всех трёх парках. Виды рода тополь, клён татарский, клён гиннала, клён ясенелистный – достаточно агрессивные интродуценты попали в состав объектов ландшафтной архитектуры, видимо, сравнительно недавно, благодаря неконтролируемым посадкам при использовании парковых комплексов в утилитарных целях.

Во всех старинных парках, кроме комплекса усадьбы Миклашевских, кустарники дают хороший самосев и прекрасно размножаются вегетативно. Анализ травянистых растений проводился при трёх маршрутных учётах, учитывались в основном фоновые виды.

Обнаружены 129 травянистых растений, кустарничков, которые отнесены к 95 родам. Наиболее богаты видами семейства Астровые – 15,61 %, злаковые – 11,2 %, Розоцветные – 9,10%, мотыльковые – 7,21%, Губоцветные – 3,62 %, Норичниковые – 2,87 % видов. Наименьшее число видов насчитывают Частуховые, Бальзаминовые, Маревые, Орхидные, Вьюнковые. В старинных парках представлены виды, которые по классификации Г.А. Поляковой (1992) [6] распределяли по эколого-хозяйственным группам: в первую группу хозяйственно-ценных и экологически значимых растений относятся представители Сосновых, Клёновых, Маслинных, Розовых (63, 4%). Во вторую группу растений с хорошими декоративными свойствами – представители семейства розовых (29,7%); в третью группу помещены медоносные растения – семейства липовые, мотыльковые, жимолостных (44,9%). К четвёртой, условно обозначенной как крупные древесные или «парковые» виды отнесены представители семейств липовые, клёновые, буковые (32,7 %). При диагностике экобиоморф растений по отношению к влаге и температурным условиям, установлено преобладание мезобиоморфных видов – 69,8 %, ксероморфных видов – 18,3 %, что характеризует нарушенные местообитания в парках. Также немногочисленны гигрофиты – 8,7 %. По отношению к свету распространены гелиофиты – 57,3 %, сциофиты – 4,6 %, факультативные гелиофиты – 39,1%. Гелиофиты приурочены как к аллейным посадкам, так и занимают некоторые окна, возникшие в старинных парках как естественным путём, так и во время рубок. В старинные парки привнесено при конструировании и реконструкции 22 % от всего видового состава представителей видов деревьев и кустарников из следующих природных зон: Европа – 41,67%, С.Америка – 31,25%, Кавказ – 16,67%, Сибирь – 14,58%, Дальний Восток – 11,46%, Китай – 8,33%, Японии – 7,29%, Ю.Америка – 2,08%, Крым – 2,08%, Сахалин – 1,04%.

Также в старинном усадебном парке Румянцева-Задунайского, Дуниных-Борковских обнаружены популяции редких видов, достаточно хорошо возобновляющихся вегетативным способом. Это такие виды как лилия саранка (комплекс Румянцева-Задунайского), дремлик широколистный, вид мониторингового списка региональной Красной книги – гладыш широколистный (комплекс Дуниных-Борковских) и наперстянка многоцветковая. Гладыш широколистный обнаружен в четырёх точках при обследовании старинных парков, популяции в каждой из них представлены многочисленными особями – от 25 до 40 экземпляров, интенсивно размножающихся вегетативно, это характеризует хорошую возобновляемость популяций. Популяция наперстянки многоцветковой обнаружена только в одной точке старинного парка и представлена двумя генеративными особями, а также пятью особями виргинильного состояния. Лилия-саранка обнаружена в единственном экземпляре в комплексе Румянцева-Задунайского в конце липовой аллеи, в окне от вырубленного высоко возрастного дерева.

Из эпифитных видов мохообразных и лишайников особый интерес представляют виды региональной Красной книги. В старинном парке Миклашевских на каждом из высоковозрастных деревьев зарегистрирован вид пармелина липовая, популяции которого включают все возрастные состояния, прекрасно возобновляются. Это доказывает наличие особого микроклиматического режима в парке. Также эпифитная бриофлора сформирована гомалией трихомановидной, неккерой перистой, которые образуют моно- или поливидовые сообщества. Данные сообщества внесены в международную книгу охраняемых и индикаторных сообществ, которые индицируют малонарушенные режимы с соответствующими характеристиками. На территории старинных усадебных парков сформировались близкие к естественным сообществам по видовому составу сообществам с дубом черешчатым. По классификации с использованием метода Ж. Браун-Бланке

принадлежат к союзу дуба черешчатого с липой (*Quercus robur-Tilia cordatae* Solomeschch et Laivinsh 1993 ex Bulokhov et Solomeschsh 2003), распространены на серых лесных почвах с лёгким суглинком.

В парке Румянцева-Задунайского и Миклашевского описаны сообщества инвазийных видов, интенсивно размножающихся вегетативно, занимающих площадь от 10 до 25-30 м². В составе растительности комплекса Миклашевских развиты вкраплениями три сообщества из рябинника рябинолистного, сибирского горно-дальневосточного лесного вида. Сообщество высотой в 1,9 метра, моновидовое, под пологом первого яруса травянистых растений нет. Растение привнесено в 90-х годах XX века, выброшены в парке после уничтожения зарослей на частном подворье. Общая площадь двух зарослей – 25 м². размножение исключительно вегетативное. В парке усадьбы Румянцева на площади 30 м² выявлено интенсивно развивающееся сообщество из гладианты – агрессивного вида. Сообщество одноярусное, второго яруса из разнотравья нет, так как доминирующий вид развивается под пологом высоко возрастных деревьев, лиановидные растения повисают на редком подросте липы и клёнов. Согласно опросам, гладианта была посажена в середине 80-х годов XX века местными жителями. Достаточно небольшой участок в 15 м² занимает сообщество рейнутрии японской, попавшей в результате преднамеренной интродукции для производства клумб. Сообщество площадью до 20 м² располагается в северной части парка. Высота около 2,3 м, сообщество ясно двухъярусное, среднее число видов – 8. сообщество создаёт значительную биомассу, быстро вытесняет все аборигенные виды, в том числе и кустарники, подрост деревьев аборигенных видов. При сравнении видового состава компонентов трёх усадебных парков с изученной флорой 12 старинных усадебных парков, описанных ранее на территории Брянщины, число часто встречаемых видов составляет 52 % от общего числа выявленного списочного состава. Основная отличительная черта конструктивного каркаса всех трёх усадебных парков – практически полное отсутствие хвойных видов, а также их встречаемость в ограниченном числе. Состав изученных старинных парков конструировался в основном из лиственных видов, пейзажная привлекательность в любое время года создателями не планировалась. Также видовой состав подбирался для естественного возобновления деревьев, а также частично для кустарников. Кустарники имеют как семенное, так и вегетативное возобновление, деревья – в основном семенное. Активно интродуцирующегося в Брянской области вида – клёна ясенелистного – в парках не обнаружено в количестве, необходимом для формирования обособленных сообществ. В трех объектах ландшафтной архитектуры выделены две группы интродуцентов: широко распространённые в области, давно используемые в ландшафтном дизайне, а также редко встречающиеся в озеленении.

По оценке, предложенной для насаждений В. А. Алексеевым, индексы состояния деревьев отражены в таблице 1.

Старинный усадебный парк в усадебном комплексе Дуниных-Борковских практически превратился в лесное насаждение, которое приобрело сомкнутость крон и облик смешанной дубравы, а примерно на площади в 35 % – термофильных дубрав. В связи с процессами естественного возобновления древесных сообществ по расчётному индексу насаждение относится к здоровым.

Таблица 1 – Данные о категориях насаждений в усадебных парках по состоянию на 2021 год

Старинный усадебный парк	Индекс состояния насаждений	Пояснения
Старинный парк Румянцева-Задунайского	2,76	Ослабленные насаждения
Старинный парк Дуниных-Борковских	2,30	Насаждение относится к здоровым
Старинный парк Миклашевских	3,20	Ослабленные насаждения

В других старинных парках ведутся несанкционированные работы, причём включающие вырубку здоровых деревьев и кустарников, а также 15 % деревьев поражены трутовыми грибами (трутовиком серно-желтым). Поэтому состояния насаждений парков относится к другой категории – «ослабленное».

Индексы состояния, которые предложила и обосновала группа авторов под руководством Е.Г. Мозолевской (2002 год), описаны в таблице 2.

Таблица 2 – Данные об индексах состояния насаждений в парках по состоянию на 2021 год

Старинный усадебный парк	Индекс состояния насаждений	Пояснения
Старинный парк Румянцева-Задунайского	6,72	Насаждения относятся к группе с нарушенной устойчивостью
Старинный парк Дуниных-Борковских	7,45	Насаждение относится к устойчивым
Старинный парк Миклашевских	6,83	Насаждения относятся к группе с нарушенной устойчивостью

Насаждения в старинном усадебном парке Дуниных-Борковских относится к устойчивым, остальные парки – к насаждениям с нарушенной устойчивостью. Таким образом, старинный парк усадьбы Дуниных-Борковских превратился в достаточно устойчивое лесное сообщество, поэтому требуется проводить мониторинг за его состоянием непосредственно на месте. Реконструкция парка нецелесообразна, так как требует значительных материальных затрат. Низкая декоративная характеристика парка усадьбы Миклашевских выявлена и обусловлена практически одновидовыми посадками, значительно угнетёнными деревьями, полным отсутствием кустарников в любых видах ландшафтно-архитектурного планирования. Вероятно, целесообразна работа по поддержанию жизнедеятельности старинных экземпляров парковых деревьев, защита их от болезней и вредителей, а также мониторинг их состояния. Окультуривание, вероятно, принесёт эффект не более чем на 50-60 лет, так как естественный отпад древостоя неизбежен.

Нами разработаны рекомендации по организации работ по экомониторингу в старинных усадебных парках как уникальных ландшафтных комплексах. Во-первых, необходима разработка механизмов инвентаризации растительных сообществ и определения сохранности сообществ. Во-вторых, установка правовых и защитных охранных мероприятий в определённых границах старинных парков.

В-третьих, анализ состояния любых усадебных комплексов и старинных парков в них показал, что необходимо восстанавливать и поддерживать планировку территории – эколого-

биологический каркас, который обеспечит устойчивые связи между компонентами паркового сообщества, а также восстанавливать ассортимент культурных видов, которые встраивались в планировку объектов ландшафтного комплекса изначально.

Таким образом, база комплексных данных по старинным усадебным паркам позволит планировать восстановительные работы с учётом специфики объектов природного (культурно-исторического) наследия, строить маршруты познавательного туризма, применять критерии, которые позволят оценить ценность этих объектов в системе ООПТ.

Библиографический список

1. Городков В.Н. По старинным аллеям. – Тула, 1983. – 141 с.
2. Городков В.Н. Архитектурные образы Брянщины. – Тула, 1980. – 140 с.
3. Вергунов А.П., Горохов В.А. Садово-парковое искусство России. – М.: Культура, 1996. – 432 с.
4. Швецов А.Н., Полякова Г.А. Методика обследования флоры и растительности старинных парков и музеев // Сохранение и восстановление природно-культурных комплексов Подмосковья. – 1995. – С. 155-160.
5. Маркевич И.А., Шужмов А.А., Методика эстетической оценки элементарных ландшафтов при движении по маршрутам // Известия Вузов. Лесной журнал. – 1993. – № 1. – С. 17-22.
6. Полякова Г.А. Флора и растительность старых парков Подмосковья. – М.: Наука. 1992. – 225 с.
7. Топорина В.А. Типология дворянских усадебно-парковых комплексов Центральной России по размещению в ландшафте // Экология урбанизированных территорий. – 2011. – № 1. – С. 60-66.
8. Алексеев В.А. Диагностика жизненного состояния деревьев и древостоя // Лесоведение. – 1989. – № 4. – С. 51 – 57.
9. Мозолевская Е.Г., Шарапа Т.В. Некоторые результаты применения индекса состояния насаждений при мониторинге // Лесной вестник. – 2003. – № 2. – С. 142-147.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АВТОМОБИЛЬНОГО ТРАНСПОРТА НА ЖИЗНЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДРЕВЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА МАГИСТРАЛЬНЫХ УЛИЦАХ Г. БИРОБИДЖАНА

Жучков Д.В.^{1,2}, Макаренко В.П.², Фетисов Д.М.¹

¹*Институт комплексного анализа региональных проблем ДВО РАН, Биробиджан, Россия*

²*Приамурский государственный университет имени Шолом-Алейхема, Биробиджан, Россия*

Аннотация. В статье приведены результаты оценки жизненного состояния древесных насаждений в результате влияния на них автомобильного транспорта в условиях городской застройки г. Биробиджана. Рассчитан индекс жизненного состояния (ИЖС) деревьев. Определено, что у проезжей части преобладают деревья в ослабленном состоянии (ИЖС – 50-70%), наиболее ослабленными являются хвойные виды (ИЖС – 50-60%), но с удалением от проезжей части увеличивается число здоровых деревьев. В качестве антропогенного влияния на насаждения выбран автомобильный транспорт. В ходе работы проводилось исследование интенсивности автотранспорта на перекрестках магистральных улиц. В результате рассчитаны значения максимально разовых выбросов угарного газа (СО) для 37 перекрестков. Наибольшими значениями выбросов угарного газа (СО) (от 0,035 до 0,045 гр./сек.) характеризуются перекрестки, расположенные на центральных магистралях города. Выявлена высокая корреляционная связь между выбросами СО и индексом жизненного состояния деревьев придорожных зеленых насаждений. Об этом свидетельствуют критические значения коэффициентов корреляции r -Пирсона ($p=0,2319$).

Ключевые слова: древесных насаждения, максимально разовый выброс угарный газ, жизненное состояние насаждений, индекс жизненного состояния, автомобильный транспорт.

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF ROAD TRANSPORT ON THE VITAL CONDITION OF TREE PLANTATIONS GROWING ON THE MAIN STREETS OF BIROBIDZHAN

D.V. Zhuchkov^{1,2}, V.P. Makarenko², D.M. Fetisov¹

¹*Institute for Complex Analysis of Regional Problems FEB RAS, Birobidzhan, Russia*

²*Sholom-Aleichem Priamursky State University, Birobidzhan, Russia*

Abstract. The paper presents the results of the assessment of the vital condition of tree plantations as a result of the influence of motor transport on them in Birobidzhan. The calculation of the vital status index value of trees, the total one-time emission of carbon monoxide (CO) from vehicles on different sections of the main streets of Birobidzhan was carried out. It was determined that the roadway is dominated by trees in a weakened state (vital status index value – 50-70%), the most weakened are coniferous species (vital status index value – 50-60%). With the distance from the roadway, the number of healthy trees increases. The highest values of CO emissions (from 0.035 to 0.045 gr./sec.) are characterized by intersections with heavy traffic of cargo vehicles. A high correlation was

revealed between CO emissions and the index of the vital status index value of trees of roadside green spaces. This is evidenced by the critical values of the r-Pearson correlation coefficients ($p=0.2319$).

Keywords: trees, maximum single emission of carbon monoxide, vital stats, vital status index value, road transport.

Россия в настоящее время является высоко урбанизированной страной, 74 % ее населения проживает в городах [1]. Всего в стране насчитывается 1117 городов, из которых численно преобладают малые и средние. В этих городах проживает 25% всех городских жителей России [2]. Высокие темпы роста городов приводят к нарастающему антропогенному воздействию на природные компоненты, в частности на зеленые насаждения [3-7]. В связи с этим, возникает необходимость охраны имеющегося фонда зеленых насаждений города.

Город Биробиджан относится к категории средних городов по численности населения (68,9 тыс. человек) [8]. В городе не сосредоточены крупные промышленные предприятия, которые могли бы оказать негативное воздействие на рост и развитие растений. Поэтому основным источником влияния на древесные насаждения в городской среде Биробиджана является автомобильный транспорт [4]. Проведение оценки жизненного состояния насаждений является актуальной задачей для перспективных планов по формированию зеленых пространств и подбора видов.

Цель работы – оценить влияние автомобильного транспорта на жизненное состояние древесных насаждений магистральных улиц г. Биробиджана.

Материалы и методы. Материалами исследования выступили результаты собственных полевых работ в летний период 2021 г. Ключевые участки были заложены в окрестностях 37 перекрестках автомобильных дорог в пределах городской застройки (Рис. 1). Размер каждого участка 10*10 м. [9]. Оценка состояния и расчет ИЖС деревьев насаждений проводились с использованием шкалы В.А. Алексеева [10]. Всего было заложено 222 ключевых участка. Ключевые участки были разделены на 3 группы: 1) у границы проезжей части; 2) на небольшом удалении от проезжей части (придомовые газоны); 3) внутри жилого квартала. На каждом перекрестке проводился подсчет интенсивности автотранспортного потока для дальнейшего расчета максимально разовых выбросов CO. На каждом ключевом участке проводилась оценка жизненного состояния древесных насаждений.

Здоровым деревьям соответствует ИЖС в пределах 1-0,8, поврежденным (ослабленным) – 0,79-0,5, сильно поврежденным (сильно ослабленным) – 0,49-0,2 и полностью разрушенным – 0,19 и менее.

Для расчета суммарного выброса CO учитывалась интенсивность автомобильного движения и категории транспорта на исследуемых перекрестках, в соответствии с ГОСТ Р 56162-2019.

Для оценки связи выброса CO и ИЖС применялись статистические методы.

Тематические карты выполнены с помощью программы QGIS 3.10.9.

Результаты и обсуждение. Натурное обследование древесных насаждений по ключевым участкам позволило нам определить их видовую принадлежность. Всего было обследовано 960 деревьев, относящихся к 10 видам из 38 имеющихся в городе. Преобладают лиственные посадки (85%), представленные в большей степени ясенем маньчжурским и ильмом мелколистным. Остальные 15% приходятся на хвойные.

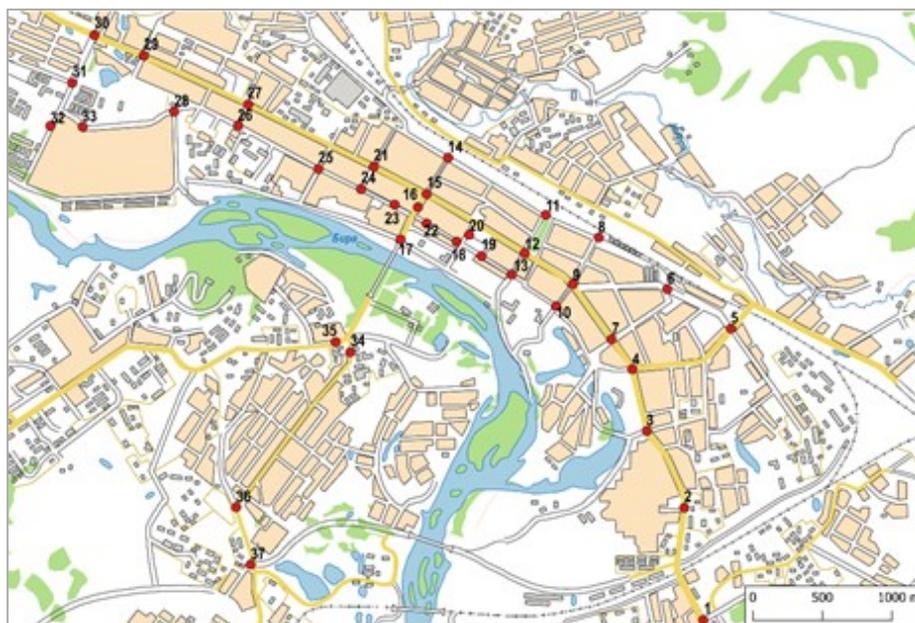


Рисунок 1 – Расположение анализируемых перекрестков в городской застройке г. Биробиджана.

Таблица – Видовой состав древесных насаждений исследуемых площадок

Насаждения у проезжей части	Насаждения придомовых газонов	Насаждения жилых кварталов
1. Ясень маньчжурский <i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr.; 2. Ильм мелколистный <i>Ulmus pumila</i> L.; 3. Ель аянская <i>Picea obovate</i> Ledeb.; 4. Береза плосколистная <i>Betula aplatyphylla</i> Sukacz.; 5. Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> L.; 6. Тополь Максимовича <i>Populus maximowiczii</i> A. Henry.; 7. Тополь душистый <i>Populus suaveolens</i> Fisch.; 8. Береза даурская <i>Betula davurica</i> Pall.	1. Ясень маньчжурский <i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr.; 2. Ильм мелколистный <i>Ulmus pumila</i> L.; 3. Ель аянская <i>Picea obovata</i> Ledeb.; 4. Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> L.; 5. Тополь Максимовича <i>Populus maximowiczii</i> A. Henry. 6. Береза плосколистная <i>Betula platyphylla</i> Sukacz. 7. Тополь дрожащий <i>Populus tremula</i> L. 8. Тополь душистый <i>Populus suaveolens</i> Fisch. 9. Яблоня ягодная <i>Malus baccata</i> (L.) Borkh.	1. Ильм мелколистный <i>Ulmus pumila</i> L.; 2. Ясень маньчжурский <i>Fraxinus mandshurica</i> Rupr.; 3. Ель аянская <i>Picea obovata</i> Ledeb.; 4. Береза плосколистная <i>Betula platyphylla</i> Sukacz.; 5. Тополь Максимовича <i>Populus maximowiczii</i> A. Henry.; 6. Ель сибирская <i>Picea ajanensis</i> (Lindl. Et Gord.) Fisch. Ex Carr.; 7. Тополь душистый <i>Populus tremula</i> L.; 8. Сосна обыкновенная <i>Pinus sylvestris</i> L.; 9. Пихта белокорая <i>Abies nephrolepis</i> (Trautv.) Maxim.; 10. Береза даурская <i>Betula davurica</i> Pall.

Была определена частота встречаемости древесных насаждений на ключевых участках. Повсеместно присутствующими на всех ключевых участках являются ясень маньчжурский, ильм мелколистный, ель аянская, береза плосколистная, тополь Максимовича, тополь

душистый. У проезжей части на придомовых территориях наиболее распространен ясень маньчжурский, а в жилых массивах преобладает ильм низкий.

Оценка жизненного состояния каждого экземпляра показала следующее. Деревья, произрастающие у проезжей части в большей степени, находятся в ослабленном состоянии, соответствуя группе индексов 50-79% (рис. 2). Сильно ослабленных не было отмечено. В результате можно отметить следующее, что у проезжей части число ослабленных деревьев составляет 92%. Особенно низкий уровень жизненности отмечен у хвойных видов (сосна обыкновенная – 50-60%, ель аянская и сибирская – 50-65%). У лиственных худшие показатели отмечены у ильма низкого (65%)

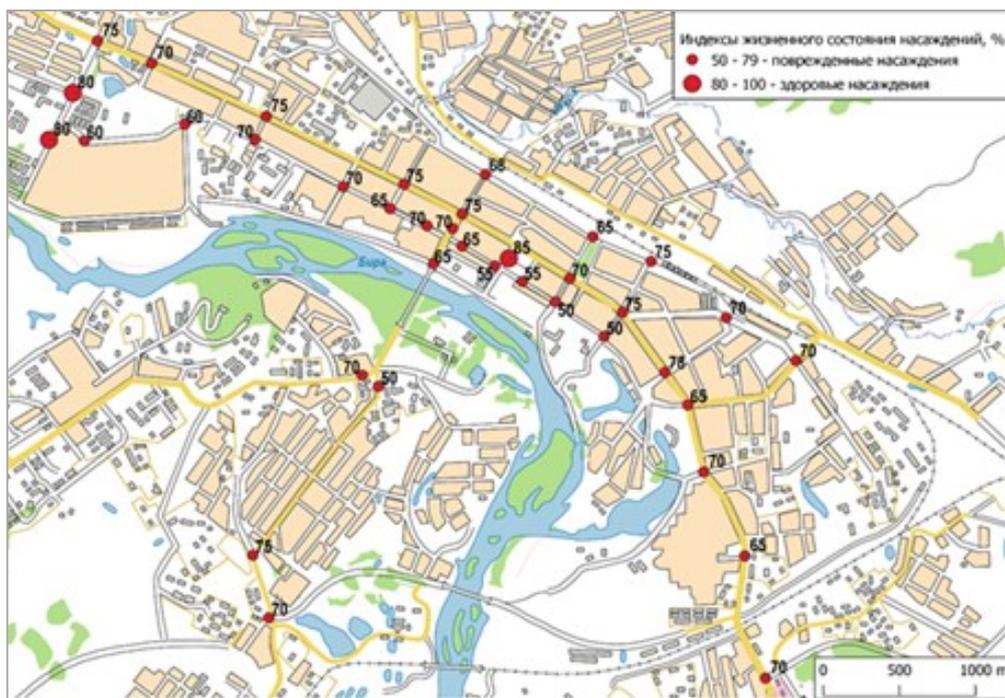


Рисунок 2 – Индексы жизненного состояния придорожных насаждений на ключевых участках первой группы.

Совсем другая ситуация с жизненным состоянием отмечается на удалении от проезжей части (придомовые газоны) (Рис. 3). Прослеживается постепенное оздоровление древесных насаждений, в большей степени лиственных, попадая в группу индексов ИЖС 80-100%. Что касается хвойных деревьев, то они по-прежнему находятся в ослабленном состоянии, имея 50-65% жизненности. В целом на участках, несколько удаленных от проезжей части 65% насаждений относятся к категории ослабленных, а 35% к категории здоровых.

Состояние внутриквартальных насаждений показало, что число здоровых деревьев явно преобладает (76%) (Рис. 4). Категории «здоровые» следует относить только лиственные посадки, хвойные в данную категорию не попадают.

Среднее значение ИЖС в группах ключевых участков наглядно отображает главную закономерность. У проезжей части улицы, где интенсивность антропогенного влияния максимальная, ИЖС деревьев самая низкая. По мере удаления от проезжей части уровень ИЖС возрастает. Эта закономерность проявляется на всех магистральных улицах города.

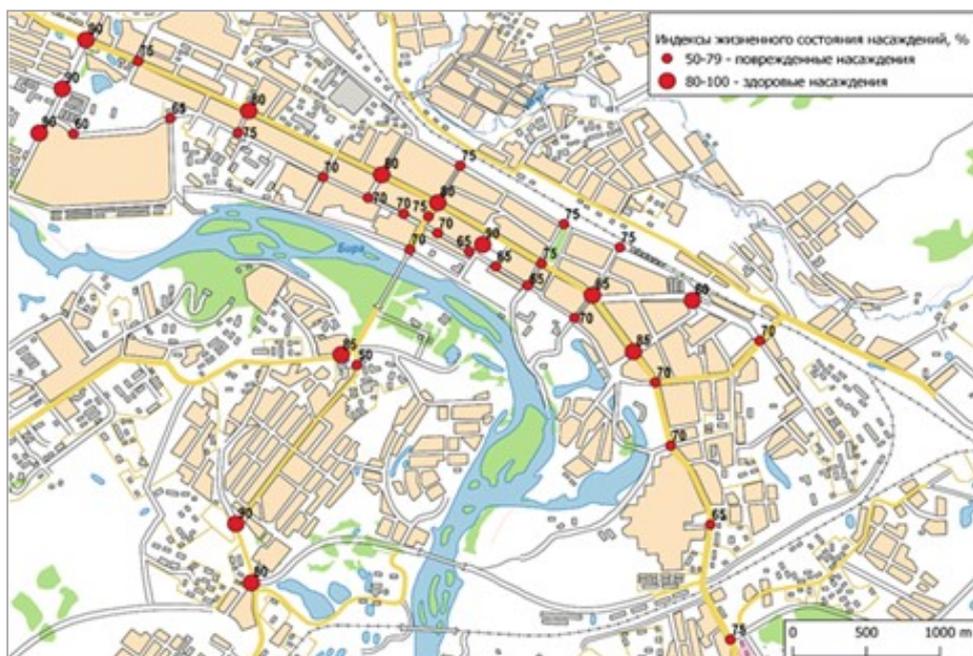


Рисунок 3 – Индексы жизненного состояния насаждений на ключевых участках второй группы.

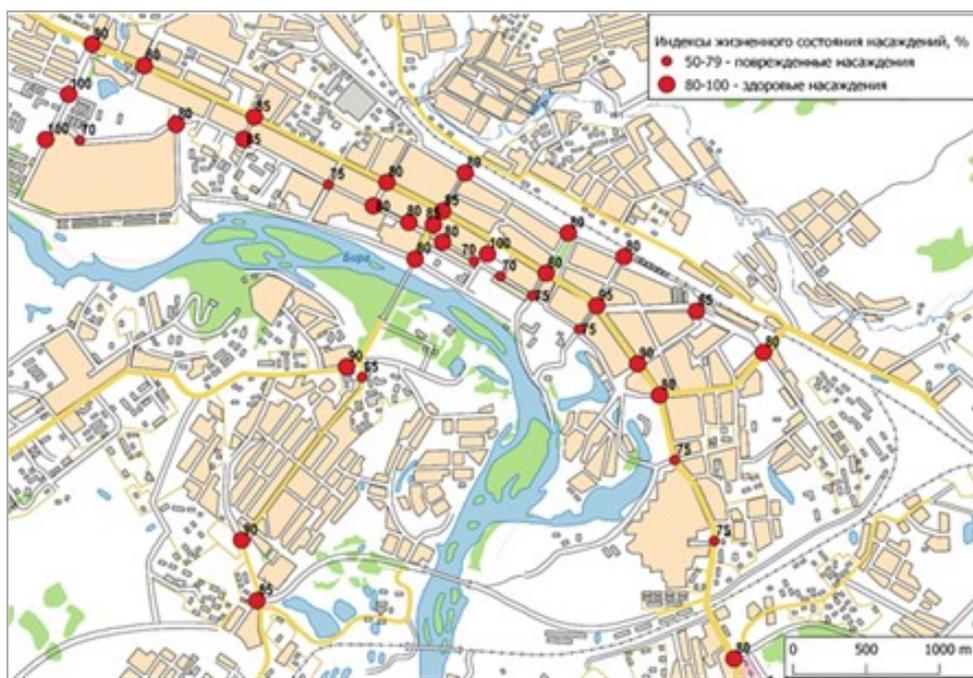


Рисунок 4 – Индексы жизненного состояния насаждений на ключевых участках третьей группы.

Значения максимально разовых выбросов CO разнятся в зависимости от категории автотранспортного средства. Транспортный поток исследованных улиц Биробиджана распределен следующим образом: 85% легковой транспорт, 10% грузовой транспорт, 5% автофургоны и 5% автобусы. Наибольший выброс CO был отмечен на перекрестках 2, 3, 4, 14, 18, 19, 23, 24, 27 (рис. 1). Суммарный разовый индекс выбросов CO на данных перекрестках колебался в пределах 0,035-0,045 гр./сек.

На рисунке 5 отражены графики корреляционной связи между выбросами CO и ИЖС. Теснота связи в окрестностях перекрестков оказалась высокой (Случай 1). Об этом свидетельствуют критические значения коэффициентов корреляции г-Пирсона при 95%-ном уровне нормальности ($r=0,2319$). Во втором и третьем случаях (придомовые газоны и внутриквартальные насаждения) теснота связи уменьшается, что выражается предположительно в уменьшении концентрации CO и других вредных газов в окружающем воздухе и обеспечивает увеличение индекса жизненного состояния древесных насаждений. Корреляционная связь значимая и обратная в обоих случаях ($r=-0,7$) и ($r=-0,68$).

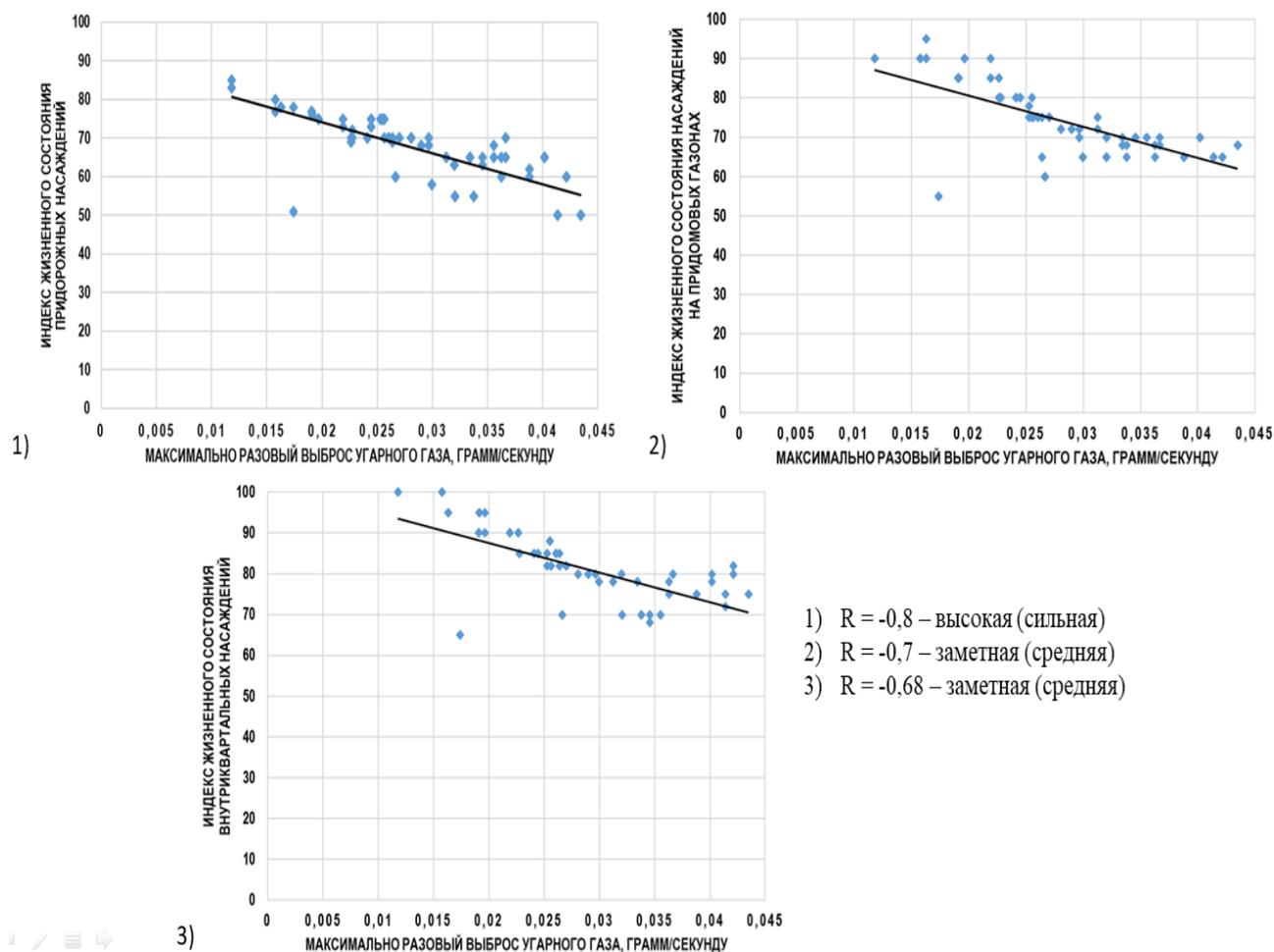


Рисунок 5 – Корреляционная связь между максимально разовым выбросом угарного газа и индексом жизненного состояния деревьев на ключевых участках.

Заключение

Исследования показывают, что автомобильный транспорт является одним из основных источников загрязнения городской среды. Не является исключением и г. Биробиджан. Интенсивность автотранспортного потока в городе с каждым годом растет. За последние 15 лет он увеличился почти в 2 раза в основном за счет легкового транспорта [11,12].

Древесные насаждения остаются важной частью любой урбоэкосистемы. Выявлена высокая корреляционная зависимость между жизненным состоянием древесных насаждений и их близостью к источнику антропогенного воздействия (в данном случае проезжей части улицы).

Сравнение ИЖС разных видов показывает разную степень их устойчивости к негативному воздействию. Лиственные виды более устойчивы, чем хвойные. Из хвойных наименее устойчивой является сосна. Приоритет в придорожных посадках следует отдавать лиственным видам: ясеню маньчжурскому, березе плосколистной и даурской, ильму японскому и мелколистному, яблоне ягодной.

Библиографический список

1. Kurochkina A.A., Semenova Yu.E., Lukina O.V. Regional Economic Development and Urbanization in Russia Lukina // Components of Scientific and Technological Progress. – 2020. – No 2(44). – P. 30-33.
2. Федеральная служба государственной статистики/ URL: <https://rosstat.gov.ru/> (дата обращения: 25.09.2022).
3. Бухарина И.Л., Журавлева А.Н, Большова О.Г. Городские насаждения: экологический аспект: монография. Ижевск: Удмуртский университет, 2012. 206 с.
4. Жучков Д.В., Макаренко В.П., Фетисов Д.М. Оценка жизненного состояния зеленых насаждений магистральных улиц г. Биробиджана в результате воздействия автомобильного транспорта // Региональные проблемы. 2022. Т. 25. №3. С. 22-24.
5. Морозова Г.Ю., Дебелая И.Д. Зеленая инфраструктура как фактор обеспечения устойчивого развития Хабаровска // Экономика региона. 2018. Т. 14. № 2. С. 562-574.
6. Шихова Н.С. Анализ функциональной эффективности зеленых насаждений в структуре городского озеленения Владивостока / Н. С. Шихова // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2020. № 3(211). С. 103-115.
7. Шихова Н.С. Биогеохимические критерии оценки экологической эффективности видов в городском озеленении // Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. – 2022. № 2(222). С. 17-36.
8. Еврейская автономная область в цифрах. 2021: Крат. стат. сб./Хабаровскстат – г. Биробиджан, 2021. 98 с.
9. Изучение фитоценозов техногенных ландшафтов. Екатеринбург: Изд-во Урал. ун-та, 2014. 166 с.
10. 10.Алексеев В.А. Диагностика жизненного состояния деревьев и древостоев // Лесоведение, 1989. №4. С. 51-57.
11. Зайков Д.В. Оценка эколого-экономического ущерба от воздействия автомобильного транспорта на окружающую среду (на примере города Биробиджан) // Географические и геоэкологические исследования на Дальнем Востоке: сб. науч. статей молодых ученых. Владивосток: Дальнаука. 2008. Вып. 4. С. 151-157.
12. Чубатов А.С., Клинская Е.О. Факторный анализ влияния автомобильного транспорта на качество атмосферного воздуха Г. Биробиджана и на заболеваемость детского населения болезнями органов дыхания // Вестник Дальневосточной государственной социально-гуманитарной академии. 2009. № 2(3). С. 97-105.

ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ БУРОВЫХ ШЛАМОВ ПРИ ПОМОЩИ БАКТЕРИИ *ALCANIVORAX BORKUMENSIS*

Ишмухаметов И.Р., Фахруллина Г.И., Фахруллин Р.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. В данном исследовании был проведен анализ изменения характеристик бурового раствора в результате нефтеструктивной деятельности бактерии *Alcanivorax borkumensis*. Проведена культивация бактерий на обедненных твердых средах с компонентами шламов, с подсчетом их численности.

Ключевые слова: буровой шлам, биоремедиация, нефтеструкция, *Alcanivorax borkumensis*.

INVESTIGATION OF THE EFFICIENCY OF CLEANING OIL-CONTAINING DRILLING MUD USING THE BACTERIUM *ALCANIVORAX BORKUMENSIS*

Ishmukhametov I. R., Fakhrullina G. I., Fakhrullin R. F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. In this study, the analysis of changes in the characteristics of drilling mud as a result of the oil-destructive activity of the bacterium *Alcanivorax borkumensis* was carried out. The cultivation of bacteria on depleted solid media with mud components was carried out, with the calculation of their number.

Keywords: drilling mud, bioremediation, oil destruction, *Alcanivorax borkumensis*.

Введение.

Нефтедобывающая промышленность является ключевой отраслью, обеспечивающей энергетическую безопасность России и способствующей ее технологическому развитию, и промышленному освоению территорий. Однако в процессе добычи и перевозки нефти возникают многочисленные риски загрязнения природной среды, что определяет необходимость наличия экологического контроля. Также важным и экологически значимым является вопрос ремедиации и утилизации отходов нефтедобычи, одним из которых является токсичный буровой шлам – вязкая жидкая субстанция с измельченными фрагментами грунта, нефтепродуктами и функциональными химикатами [1]. Отработанный буровой раствор, и добытая вместе с ним вода являются постоянными причинами ухудшения состояния окружающей среды [2]. Использование микроорганизмов является одним из наиболее значимых способов нейтрализации токсического действия отработанных буровых растворов и загрязненной ими воды [3]. В качестве объекта для биоремедиационного исследования была выбрана морская нефтеразлагающая бактерия *Alcanivorax borkumensis*, которая использует нефтяные углеводороды в качестве исключительного источника углерода и энергии [4]. А.

borkumensis встречается в небольших количествах во всех океанах мира и в больших количествах в загрязненных нефтью водах [5]. Эти качества, в дополнении к галофильности, и обусловили выбор данного объекта для биодegradации нефтяной составляющей соледержащих буровых шламов с месторождений республики Татарстан. Образцы шламов были исследованы, разделены на составляющие, после чего с ними была проведена инкубация бактерий в твердых и жидких средах. Были зафиксированы изменения в характеристиках шламов и численности бактерий.

Методика.

Буровые шламы были отобраны на месторождениях республики Татарстан, в лабораторных условиях была проведена их обработка и разделение на две фракции – осадок и надосадочная жидкость. При помощи индикационных тест-полосок была определена кислотность образцов. Измерения проводили в десятикратной повторности. Были проведены микроскопические исследования образцов при помощи светового микроскопа Carl Zeiss Imager при увеличениях x5, x10, x20 и x40, x63 и x100. В опытных колбах были проведены разбавления буровых шламов дистиллированной деионизированной водой в соотношениях 1:1, 1:3, 1:5 и 1:10. Проводился засев опытных колб концентрированной ночной культурой *A. borkumensis*, после чего колбы 25 суток культивировались в инкубаторе при температуре 30 °С, с постоянным помешиванием. После инкубации проводился анализ надосадочной жидкости. После окончания 25-дневных экспериментов были измерены характеристики надосадочной части буровых растворов. Оптическая плотность была измерена при помощи прибора Multiscan для вычисления условных показателей оптической плотности используемых суспензий (в единицах). pH был измерен при помощи индикационных полосок Munktel, 10-кратная повторность. Спектры поглощенного света надосадка буровых растворов были построены при помощи спектрофотометра NanoPhotometer.

Ночная культура бактерий *A. borkumensis* была приготовлена по стандартной методике. Вечером накануне эксперимента проводился засев бактериями 100-миллилитровой колбы с соленой жидкой средой Marine Broth с натриевой солью пировиноградной кислоты, после чего велась ее инкубация в инкубаторе с температурой 30 °С и при постоянном помешивании. В день эксперимента ночную культуру центрифугировали в течение 6 минут со скоростью 3500 оборотов в минуту и трижды отмывали от среды с метаболитами. Оптическую плотность доводили до значения 0,8-1 единиц при помощи ИФА анализатора Multiskan. Для эксперимента с твердыми средами выполнялись серийные разведения полученной суспензии. Суспензия последовательно семь раз разбавлялась в 10 раз, в результате чего емкость с седьмым разбавлением содержала разведение в 10 миллионов раз. Такое разбавление является достаточным, чтобы колонии на твердой среде развивались обособленно и их можно было легко подсчитать для контроля численности.

Приготовление твердых сред для бактерии *A. borkumensis* проводилось также по стандартной методике. Горячую агаризованную соленую среду Marine Agar в стерильных условиях ламинара разливали по пластиковым чашкам Петри диаметром 90 мм, по 15 мл в каждую. Для отрицательного контроля использовали чашки Петри с агаром без добавления каких-либо питательных источников. Опытные чашки были четырех видов: ОС-ПОВ, ОС-ТОЛ, ЖК-ПОВ и ЖК-ТОЛ. В чашки ОС-ТОЛ (осадок в толще) после наливания горячего агара в него добавлялось по 600 мкл осадочной части образца шлама, после чего агар перемешивался шпателем Дригальского шириной 39 мм. В чашки с ЖК-ТОЛ (жидкость в толще) аналогичным образом добавлялось по 600 мкл жидкой составляющей образца шлама. В чашки с ОС-ПОВ

(осадок на поверхности) наливался агар и оставлялся застывать, после чего на его поверхность заливалось по 200 мкл осадочной части образца.

Шпателем Дригальского осадок распределялся по всей поверхности агара. В чашки с ЖК-ПОВ (жидкость на поверхности) на застывший агар аналогичным образом добавлялось по 200 мкл жидкой составляющей образца шлама. В качестве положительного контроля использовался агар без добавок шлама. Учитывая, что буровые шламы изначально содержат высокую концентрацию солей, не было необходимости добавления в опытные чашки растворов солей для предотвращения возможного осмотического шока. Отмытая ночная культура *A. borkumensis*, была в стерильных условиях инокулирована на поверхность приготовленных ранее обедненных агаризованных сред с обозначениями К-, К+, ОС-ПОВ, ОС-ТОЛ, ЖК-ПОВ и ЖК-ТОЛ, по 500 мкл в каждую, после чего она была распределена по поверхности агара шпателем Дригальского, после чего чашки помещались на 24 часа в инкубатор с температурой 30 °С, без помешивания. После суток культивации был проведен подсчет выросших отдельных бактериальных колоний, каждая из которых выросла из отдельной клетки, таким образом проводился подсчет колоний, которые были способны прорасти в условиях, в которых им приходилось использовать в качестве единственного питательного источника компоненты бурового шлама.

Результаты.

1) Краткая характеристика буровых шламов.

Образцы буровых растворов представляли собой вязкую темную эмульсию, содержащую нефтепродукты и значительное количество осадка в виде измельченного минерального грунта. В неразбавленном виде образцы имели слабокислую реакцию, рН варьировал в интервале 5-6. Препараты для микроскопии были затемнены вследствие наличия нефтепродуктов, кроме того, на них были отчетливо заметны разноразмерные фрагменты измельченного грунта (Рис. 1).

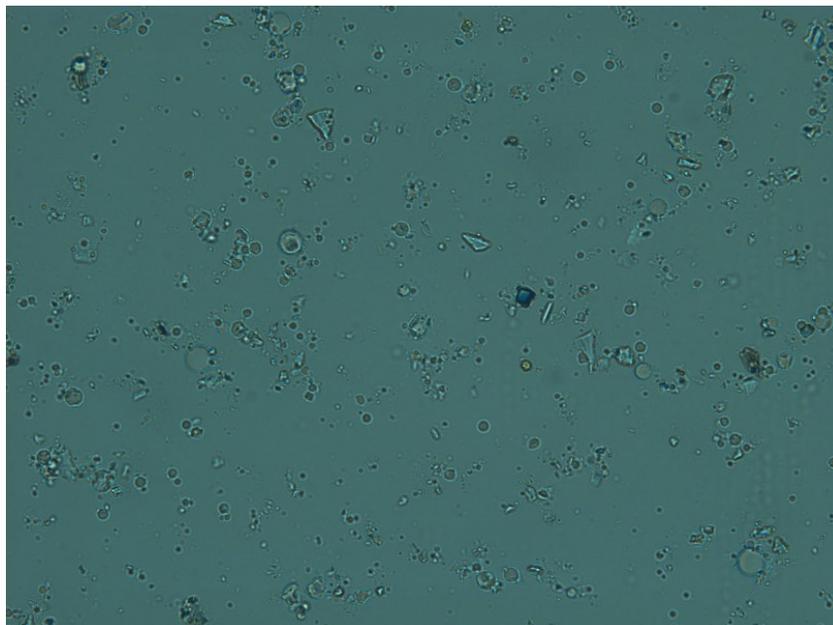


Рисунок 1 – Микроскопическое изображение образца бурового шлама. Световой микроскоп, иммерсионный объектив, 63-кратное увеличение объектива.

2) Изменение параметров растворов.

В таблице 1 показаны результаты измерения оптической плотности и pH. Спектры поглощенного света надосадка буровых растворов представлены на Рисунке 2. Исходя из таблицы 1 и рисунка 2, можно сделать вывод, что чем концентрированнее буровой раствор, тем более мутным и насыщенным оказывается надосадок в результате 25-дневной культивации с бактериями *A. borkumensis*. Что касается значений pH, то в результате деятельности бактерий происходит незначительное закисление среды. Изначально кислая реакция при разбавлении водой должна была сместиться ближе к pH=7, чего не наблюдается в значениях в таблице 1.

Таблица 1 – Значения оптической плотности и pH надосадка буровых растворов после 25 дней культивации с бактерией АВ

Разведение	1:1	1:3	1:5	1:10
Оптическая плотность, ед.	0.098	0.089	0.073	0.058
pH	5.1	5.3	6.3	6.0



Рисунок 2 – Спектры поглощения буровых растворов.

3) Результаты эксперимента с *A. borkumensis* на твердых средах.

После суток культивации были проведены подсчеты выросших отдельных бактериальных колоний, усредненные результаты которых приведены в Таблице 2.

Таблица 2 – Количество колоний бактерий *A. borkumensis*, выросшее за 24 часа на обедненных агаризованных средах с добавлением буровых шламов

Повторность \ Среда	Агар (-контр.)	ОСАДОК		ЖИДКОСТЬ		МА (+контр.)
		ТОЛЩА	ЖИД-ТЬ	ТОЛЩА	ЖИД-ТЬ	
1	0	0	0	0	0	46
2	0	0	0	0	0	42

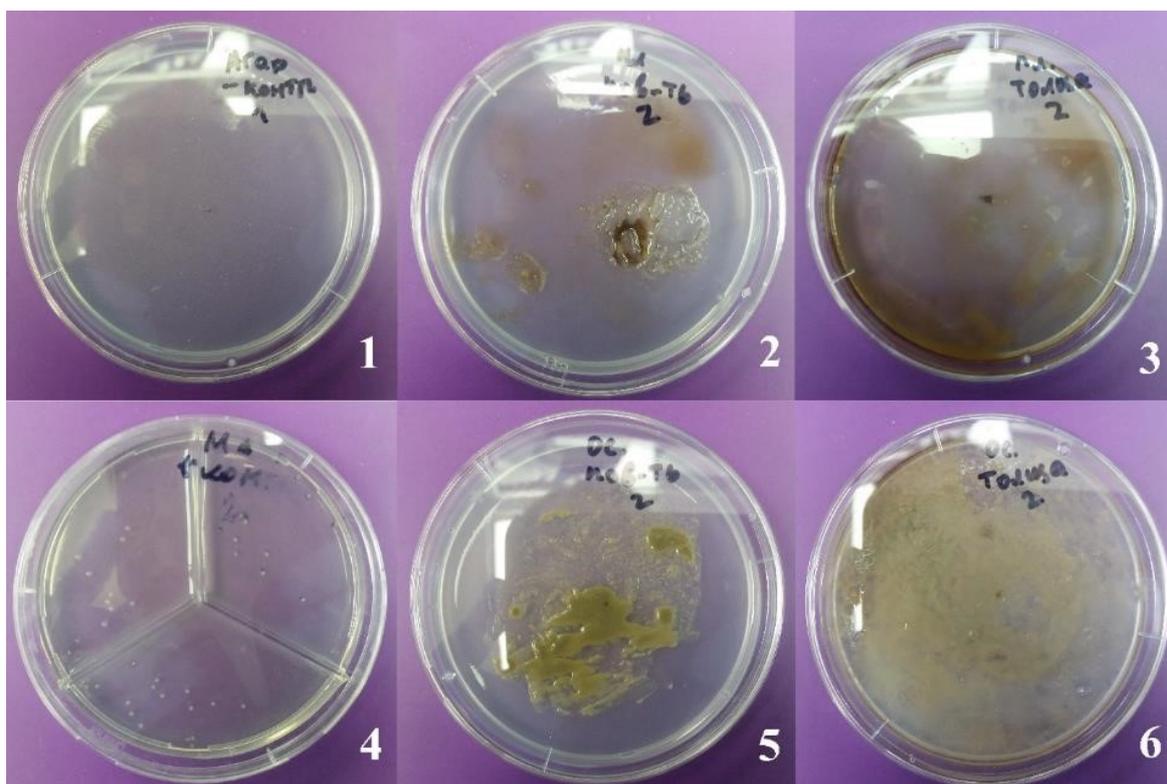


Рисунок 3 – Общий вид чашек Петри с колониями *A. borkumensis* после 24 часов культивирования. 1 – агар; 2 – надосадочная жидкость, поверхность; 3 – надосадочная жидкость, толща; 4 – среда Marine Agar; 5 – осадок, поверхность; 6 – осадок, толща.

Отрицательный контроль в виде агара без питательных компонентов не способствовал росту бактериальных колоний, поэтому, как и было ожидаемо, спустя сутки их не наблюдалось. Положительный контроль в виде среды Marine Agar, богатой пептоном и дрожжевым экстрактом, выровненной по концентрациям солей, напротив, способствовал росту колоний, поэтому, также ожидаемо, наблюдалось их развитие, в среднем по 44 КОЕ на чашку (Рисунок 3). Что касается остальных исследуемых опытных вариантов, то ни в одной чашке роста бактерий на твердой среде не наблюдалось, вне зависимости от компонента (осадок или надосадочная жидкость) или способа внедрения в агар (в толщу или на поверхность), что говорит о непригодности грубо обедненных твердых сред для культивирования бактерий *A. borkumensis*.

В дальнейшем эти данные будут основанием для ряда опытов для подбора дополнительных компонентов среды, чтобы культивировать бактерию на другой твердой среде с буровыми шламами.

Выводы.

1) Анализ надосадка показал, что в результате 25 дневной культивации буровых растворов с *Alcanivorax borkumensis* оптическая плотность и интенсивность поглощения света в области до 300 нм отмечается у более концентрированных образцов.

2) В результате нефтеструктивной деятельности *Alcanivorax borkumensis* наблюдалось незначительное закисление среды, что объясняется особенностями метаболизма бактерий.

3) Роста бактерий на твердой среде с компонентами буровых шламов не наблюдалось, вне зависимости от компонента (осадок или надосадочная жидкость) или способа внедрения в агар (в толщу или на поверхность), что говорит о непригодности грубо обедненных твердых сред для культивирования бактерий *A. borkumensis*.

Заключение.

Бактерия *A. borkumensis* является многообещающим объектом для нефтеструкции бурового шлама, что подтверждается изменениями в его характеристиках в результате культивации с бактериями в обедненной жидкой среде.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-4393.2022.1.3.

Библиографический список

1. Edwards, W. C. Toxicology of oil field wastes. Hazards to livestock associated with the petroleum industry // The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.-1989.-5(2).-P. 363-374.
2. Borah, B., & Das, B. M. A review on applications of bio-products employed in drilling fluids to minimize environmental footprint // Environmental Challenges.-2022.-6.-100411.
3. Deng, S., Wang, B., Su, S., Zeng, H., Chen, R., Ma, H., ... & Zhang, F. Microbial community diversity and potential bioremediation of drill cuttings in two oil reservoirs. // Petroleum Science and Technology.-2022.-40(12).-P. 1462-1478.
4. Kadri T. et al. Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes // Biochemical Engineering Journal.-2018.-132.-P. 279-287.
5. Golyshin P. N. et al. Genome sequence completed of *Alcanivorax borkumensis*, a hydrocarbon-degrading bacterium that plays a global role in oil removal from marine systems // Journal of biotechnology.-2003.-106(2-3).-P. 215-220.

БИОСИНТЕЗ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ И АГРОПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ

Кузнецова А.П., Грескова П.П.

Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. В Российской Федерации остро стоит проблема накопления пластиковых и органических отходов. Кроме того, многие отходы не перерабатываются в достаточной степени. Как один из путей решения данной проблемы может выступать производство биоразлагаемых полигидроксиалканоатов (ПГА) в соответствии с принципами биоэкономики замкнутого цикла. ПГА синтезируются микробиологическим путем из отходов пищевой промышленности и агропромышленного сектора, что значительно удешевляет процесс производства полимера и в то же время позволяет перерабатывать неиспользуемые отходы. В конце своего жизненного цикла полимер полностью биоразлагается на углекислый газ и воду, и при переработке путем компостирования позволит получить удобрения. В статье рассмотрены основные проблемы, стоящие перед широким внедрением производства ПГА, проанализированы наиболее перспективны микроорганизмы для биосинтеза полимера и возможные новые виды сырья из отходов производства.

Ключевые слова полигидроксиалканоаты, биоразложение, биоэкономика замкнутого цикла, переработка пищевых отходов.

BIOSYNTHESIS OF BIODEGRADABLE POLYHYDROXYALKANOATES FROM FOOD AND AGROINDUSTRIAL WASTE

Kuznetcova A. P., Greskova P. P.

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «National Research University ITMO», St. Petersburg, Russia

Abstract. In the Russian Federation there is an acute problem of plastic and organic waste accumulation. Partially due to many wastes are not recycled sufficiently. Production of biodegradable polyhydroxyalkanoates (PHAs) in accordance with the principles of closed-loop bioeconomics can be one of the ways to solve this problem. PHAs are synthesized microbiologically from food industry and agro-industrial waste, which significantly reduces the cost of polymer production and at the same time allows recycling waste. At the end of its life cycle, the polymer completely biodegrades into carbon dioxide and water, and if recycled through composting, will produce fertilizer. The article considers the main problems that widespread PHAs production faces, analyzes the most promising microorganisms for biosynthesis of the polymer and new types of raw materials from food industry and agro-industrial wastes.

Keywords: polyhydroxyalkanoates, biodegradation, closed-loop bioeconomics, food waste recycling.

В настоящее время подавляющее большинство промышленности строится на принципах линейной экономики. То есть, на постоянном росте производства и потребления ресурсов с соответствующим накоплением отходов в окружающей среде. Однако данный подход приводит к нескольким экологическим проблемам: истощение природных ресурсов и загрязнению окружающей среды. Согласно данным Росприроднадзора, за 2021 год объем отходов в России достиг значения 8,5 млрд тонн, а объем накопленных отходов – 53 млрд тонн [1]. В 2002 году произведенное количество отходов составляло 2 млрд тонн. Из них, по данным Минпромторга до 5 млн тонн – пластиковые отходы. При этом переработке подвергается всего лишь 7–20% [2].

ПГА – биоразлагаемый полимер, синтезируемый микроорганизмами. Значительным преимуществом этого полимера выступают аналогичные традиционным пластикам физико-механические свойства [3]. Кроме того, производство ПГА может полностью соответствовать принципам биоэкономики замкнутого цикла. Так, в качестве источника углерода и питательных веществ для клеток, производящих ПГА, применяются бытовые и промышленные отходы. А использованная продукция из ПГА может быть переработана вместе с органическими отходами посредством компостирования. Такой подход повышает ресурсоэффективность, вносит вклад в систему управления отходами, а главное, снижает общую стоимость производства ПГА [4].

ПГА находит применение в различных сферах: медицине, фармацевтике, пищевой упаковке, при изготовлении предметов ежедневного обихода (ручек, упаковок, одноразовой посуды, игрушек), для производства сельскохозяйственных тепличных пленок и даже стимулирования роста семян растений. Так, в сердечно-сосудистой практике ПГА полимеры применяются в качестве сердечно-сосудистых клапанов, стентов, трансплантантов, пластырей. В стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для формирования новой кости, в качестве барьерной мембраны. Более того, в перспективе ПГА могут использоваться для доставки лекарств [5].

Биосинтез ПГА в бактериях является реакцией на несбалансированные условия культивирования, характеризующиеся высоким уровнем запаса углерода и ограничением неорганических питательных веществ: азота, кислорода, фосфора [6]. Для производства ПГА в промышленных масштабах используют природные штаммы бактерий, причем необходимо учитывать особенности культивирования каждого из них для максимального выхода ПГА. Наиболее практичными являются микроорганизмы, способные накапливать ПГА даже в присутствии высоких концентраций питательных веществ, например, *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas putida*, *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii* и некоторые другие [7].

Разные штаммы-продуценты имеют свои особенности. Например, для получения ПГА используется штамм *Cupriavidus necator* В-10646, для культивации которого используется либо среда Шлегеля (рост происходит в течение 48 ч с использованием термостатирующего шейкера-инкубатора при 30 °С и 200 об/мин), либо олеиновая кислота с концентрацией 10 г/л, так как именно при данном проценте содержания олеиновой кислоты в среде достигается максимальный процент содержание полимеров от массы сухой биомассы [6].

Также широко применяется и исследуется штамм-продуцент *Pseudomonas putida* КТ-2440 – один из наиболее перспективных микроорганизмов для получения ПГА. *Pseudomonas putida* имеет особое преимущество – универсальный внутренний метаболизм с разнообразными ферментативными способностями, поэтому он может применяться для

создания рекомбинантных штаммов. *P. putida* устойчиво переносит экстремальные условия окружающей среды (высокая температура, экстремальный pH, присутствие токсинов или ингибирующих растворителей). Периодическое культивирование штамма *P. putida*-GPO1 предоставляет возможность расширить и повысить эффективность производства ПГА. Также культура *P. putida*-KT2440 с высокой плотностью клеток может обеспечивать эффективное накопление ПГА во время экспоненциальной фазы питания с ограниченным количеством углерода [8–10].

Культуру *Ralstonia eutropha* стандартно опускают в питательный бульон и инкубируют на поршневой качалке (250 об/мин) при 30°C в течение 24 часов. Одним из преимуществ данного штамма является его способность расти на бюджетной среде на основе CCS – малоценном побочном продукте производства этанола – содержащей 240 г CCS в 1 литре, с соотношением C:N 50:1 [7].

Культивирование *Azotobacter vinelandii* может проводиться либо на агаре Берка (BM) с добавлением 20 г/л сахарозы при 30°C, либо на среде с мелассой с концентрацией 60 г/л, принудительной аэрацией при температуре 25°C. У данного штамма-продуцента имеется особенность строения, влияющая на производство ПГА – продуцирование ПГА происходит только при наличии гена *Avin-16040* в клетке бактерии *Azotobacter vinelandii*, который продуцирует белок S-слоя [11].

Возможно несколько подходов по развитию процессов производства ПГА согласно биэкономике замкнутого цикла. Первый метод заключается в использовании отходов органической природы в качестве исходного сырья для биосинтеза полимера. Производство биоразлагаемого полимера позволит утилизировать уже имеющиеся отходы, сам полимер в конце своего жизненного цикла будет переработан вместе с органическими отходами путем компостирования с дальнейшим получаем удобрения (компоста) или энергии (метана) [12].

Второй подход заключается в дополнительном извлечении полезных веществ в процессе производства ПГА. Так, возможно извлечение полисахаридов, поверхностно-активных веществ, пигментов, каротиноидов, аминокислот и их производных и биоэлектричества при совместном производстве с ПГА [13]. Одним из этапов синтеза ПГА является разрушение клеточной стенки, в ходе него высвобождаются органические вещества клеток (белки, полисахариды, нуклеиновые кислоты, липиды и фрагменты клеточной стенки). Количество белка при этом достигает 50% сухой массы клетки [14]. Таким образом, извлеченный белок может стать источником питательных веществ для самого производства ПГА, что значительно снижает стоимость его производства.

В статье рассматривается первый метод снижения стоимости ПГА – получение его посредством переработки различных органических отходов. Одним из таких отходов выступают остатки заваренного кофе – кофейный жмых [15]. В настоящее время кофе считается одним из самых популярных предметов потребления на современном мировом рынке, и в процессе переработки кофе образуется огромное количество отходов. По оценкам, мировой объем производства отработанного кофейного молотого зерна составляет около 6 млн тонн в год [16]. Интерес представляет не только жмых, но и масло из отработанной кофейной гущи, которое может быть извлечено посредством экстракции.

Средний состав кофейного жмыха составляет в основном 32-42% гемицеллюлозы, 7-13% масс/об целлюлозы, 0-26% масс/об лигнина, 10-18% масс/об белка, 2-24% масс/об липидов, 0-2% масс/об кофеина и 1-2% масс/об золы. При гидролизе выделяются арабиноза, манноза и галактоза. Такие микроорганизмы как *Bacillus subtilis*, *Bacillus firmus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia sac-chari*, *Novosphingobium nitrogenifigens* Y88 и *Halomonas*

halophila способны метаболизировать эти моносахара в ПГА [17]. Моносахариды являются самой простой формой сахарного субстрата для микроорганизмов, и они могут быть легко использованы всеми микроорганизмами, производящими РНА. При использовании *S. necator* удалось достичь высокой эффективности по выходу ПГБ – выход составил 89,10%. Основным препятствием для использования масла кофейного жмыха является его пенообразующее свойство, однако его можно контролировать, используя другие масла [15].

Другими отходами, который может быть использован для производства биоразлагаемого ПГА, выступают пищевые отходы. Среди них меласса низкого качества, богатая сахарозой, является потенциальным источником для производства РНА. Так, одно из исследований показало, что вид *Pseudomonas* дает возможность получения 7,02-12,53 г/л биомассы с содержанием 20,63-35,63% ПГА. При использовании *B. megaterium* ВА-019 удалось достигнуть значений 72,7 г/л сухой клеточной биомассы с 42% содержанием РНВ [18]. Таким образом, меласса может быть недорогим источником углерода при производстве ПГА.

В качестве сырья для производства ПГА может быть использовано отработанное кулинарное масло. Достоинством его использования выступает возможность его прямого использования в качестве источника углерода без необходимости предварительной подготовки. Исследования показывают, что *S. necator* Н16 на субстрате из отработанного пальмового масла было получено 6,8% сухой микробной биомассы и 83% накопления ПГБ. Наибольшую эффективность на данный момент показывает *Bacillus thermoamylovorans*. Так, с использованием данного микроорганизма был достигнут выход 87% ПГА. При этом применение рекомбинантных микроорганизмов могут значительно повысить выход продукта [15].

Перспективным сырьем для синтеза ПГА выступают отходы фруктов. Так, исследования показывают, что при использовании яблочной мякоти в качестве единственного источника углерода, две культуры *S. necator* и *P. citronellolis* дали смесь полимеров Р(ЗНВ) и ПГА. Данная смесь полимеров может быть использована для получения тонких пленок. Для переработки отходов фруктов также могут быть использованы *Pseudomonas citronellolis* и *Bacillus* sp [19].

Более того, рассматривается возможность использования в качестве субстрата для синтеза ПГА отходы скотобоен. Применение рекомбинантных штаммов с применением таких отходов в качестве сырья позволило получить 65% ПГА от сухой массы клеток [20].

Несмотря на необходимость предварительной подготовки многих пищевых отходов (исключая отработанные масла), использование их в качестве источника углерода при биосинтезе ПГА имеет ряд экономических и экологических перспектив [15].

Для синтеза ПГА также могут быть использованы отходы агропромышленного комплекса. Переработка сельскохозяйственных отходов для производства биополимеров не только имеет решающее значение для управления отходами, но и может быть достаточно эффективной для производства биоразлагаемых полимеров с экономической и коммерческой точки зрения.

Различные исследования показывают, что использование недорогих и возобновляемых субстратов, таких как агропромышленные отходы, может снизить стоимость производства биопластиков примерно на 40-50% [15]. К таким отходам относят: яблочные выжимки, виноградные выжимки, крахмал, сахарная свекла. Выжимки фруктов содержат в себе большое количество сахаров, пектина и органических кислот, что делает их перспективным сырьем для производства ПГА. Сахарная свекла богата сахарозой, в связи с чем некоторые компании (*Bio On, Italy*) используют сок свеклы в качестве источника углерода при синтезе ПГА. Другой

отход сахарной промышленности, бегасса, также может стать перспективным сырьем для биосинтеза [15].

Перспективным сырьем также выступают отходы производства крахмала. Так, *Cupriavidus* sp. ККУ38, выделенный из вод производства крахмала маниоки, при использовании крахмала маниоки в качестве источника углерода произвел 5,97 г/л биомассы с содержанием ПГА 61,6% [21].

Молочная промышленность производит огромное количество побочных продуктов, которые могут быть эффективно использованы для создания продуктов с добавленной стоимостью. Сыворотка – это побочный продукт молочной промышленности, который состоит в основном из лактозы, молочной кислоты, жиров, белков, нескольких минералов, водорастворимых витаминов, а также различных других необходимых питательных веществ. По данным ОЭСР и ФАО, ежегодное производство сыворотки в мире составляет около 120 млн тонн [15].

Согласно отчетам, около 50% сыворотки выбрасывается в сточные воды или используется в качестве корма для животных [15]. Безопасная утилизация сыворотки в настоящее время является все более актуальной проблемой для многих молочных предприятий, что открывает перспективы ее использования в качестве экономически эффективного субстрата для производства РНА. Однако для применения в качестве источника питательных веществ при синтезе ПГА требуется предварительная подготовка сыворотки – гидролиз лактозы до моносахаров. Кроме того, при применении сыворотки потребуются добавлять минеральные добавки и источники азота. Применение рекомбинантной *E. Coli* позволяет избежать необходимость дополнительной подготовки молочной сыворотки. Однако требуется больше исследований по возможности эффективного применения сыворотки в качестве субстрата для микроорганизмов при производстве ПГА [15].

Основными проблемами массового производства полигидроксиалканоатов являются стоимость сырья, используемого для выращивания штаммов-продуцентов ПГА, а также недостаточный выход продукта. Можно выделить два пути решения проблемы: поиск бюджетного питательного сырья для бактерий и повышение процента выхода ПГА относительно общей биомассы с помощью использования рекомбинантных микроорганизмов.

Так как, например, штамм *Pseudomonas putida* КТ-2440 обладает универсальным внутренним метаболизмом, он может быть использован для рекомбинантного биосинтеза ценных природных продуктов, в том числе ПГА. *P. putida* успешно используется для производства биополимеров и большого количества химических веществ. Секвенирование ДНК и РНК данного штамма и моделирование пути всего генома открывают возможности для превращения *Pseudomonas putida* в гибкую “клеточную фабрику” для производства биополимеров [8].

Благодаря молекулярной генетике было доказано, что данная бактерия имеет высокую генетическую восприимчивость, что делает ее подходящей для метаболической инженерии с целью создания штаммов с необходимыми характеристиками для максимально эффективного получения ПГА.

ПГА являются перспективными биоразлагаемыми полимерами, получаемыми в ходе биосинтеза. Их производство соответствует биэкономике замкнутого цикла, благодаря использованию органических отходов пищевой промышленности и агропромышленного комплекса. Процесс синтеза ПГА может быть значительно удешевлен за счет использования такого типа сырья. Возможно эффективное снижение стоимости производства ПГА и решение

нескольких экологических проблем: накопления органических отходов и растущее число пластика. Сырье должно содержать в себе достаточное количество моносахаров и других питательных веществ для успешного биосинтеза ПГА микроорганизмами. При культивировании микроорганизмов, синтезирующих ПГА, требуется соблюдать условия синтеза, в том числе, верно подбирать среды и питательные веществ. Требуется проведение исследований по определению наиболее подходящего сырья, рода микроорганизмов, а также возможности создания рекомбинантных микроорганизмов для дальнейшего удешевления процесса производства данного полимера.

Библиографический список

1. РОСПРИРОДНАДЗОР. Федеральная служба по надзору в сфере природопользования. Светлана Радионова: объем отходов в РФ за 2021 год достиг 53 млрд тонн [Электронный ресурс] – URL: https://rpn.gov.ru/news/svetlana_radionova_obem_otkhodov_v_rf_za_20-21_god_dostig_53_mlrld_tonn/ (дата обращения 17.09.2022)
2. Сперанская О. А. Российский рынок пластика и пластиковых отходов // ТБО – Обращение с отходами. –2021. – Т. 1. – №1. – С. 42 – 47.
3. Sirohi R. Critical overview of biomass feedstocks as sustainable substrates for the production of polyhydroxybutyrate (PHB) // *Bioresource Technology* – 2020. – Vol. 311. – P. 1235–1246.
4. Pakalapati H. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. –2018. – Vol. 126. – № 3. – P. 282–292.
5. Dalton B. A Review on Biological Synthesis of the Biodegradable Polymers Polyhydroxyalkanoates and the Development of Multiple Applications // *Catalysts*. – 2022. – Vol. 12. – № 3. – P. 319–332.
6. Волова Т. Г. Полиоксикалкоанаты (ПОА) – биоразрушаемые полимеры для медицины: монография / Т. Г. Волова, В. И. Севастьянов, Е. И. Шишацкая; Т.Г. Волова, В.И. Севастьянов, Е.И. Шишацкая; научный редактор: В.И.Шумаков; СО РАН. – Новосибирск: Издательство Сибирского отделения РАН, 2003. – 332 с. – ISBN 5-7692-0608-X.
7. Киселев Е.Г., Демиденко А.В., Барановский С.В., Волова Т.Г. Масштабирование технологии синтеза биодegradуемых полигидроксиалканоатов в условиях опытного производства // *Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Биология*. – 2014. – Т. 7. – № 2. – С. 134-147.
8. Poblete-Castro I. Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2012. –Vol. 93. – № 6. – P. 2279–2290.
9. Volke D.C., Calero P., Nikel P.I. *Pseudomonas putida* // *Trends in Microbiology*. – 2020. – Vol.28. – № 6. – P. 512–513.
10. Loeschcke A., Thies S. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products // *Appl Microbiol Biotechnol*. – 2015. – Vol. 99. – № 15. – P. 6197–6214.
11. Mok P.-S. In Vivo Characterization and Application of the PHA Synthase from *Azotobacter vinelandii* for the Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoate Containing 4-Hydroxybutyrate // *Polymers*. – 2021. – Vol. 13. – № 10. – P. 1576.
12. Abrha H. Bio-Based Plastics Production, Impact and End of Life: A Literature Review and Content Analysis // *Sustainability*. – 2022. – Vol. 14. – № 8. – P. 4855.
13. Kumar P., Kim B.S. Valorization of polyhydroxyalkanoates production process by co-synthesis of value-added products // *Bioresource Technology*. – 2018. – Vol. 269. – P. 544–556.

14. Yadav B. A review on recovery of proteins from industrial wastewaters with special emphasis on PHA production process: Sustainable circular bioeconomy process development // *Bioresource Technology*. – 2020. – Vol. 317. – P. 1240–1256.
15. Talan A. Biorefinery strategies for microbial bioplastics production: Sustainable pathway towards Circular Bioeconomy // *Bioresource Technology Reports*. – 2022. – Vol. 17. – P. 1008–1017.
16. Tokimoto T. Removal of lead ions in drinking water by coffee grounds as vegetable biomass // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2005. – Vol. 281. – № 1. – P. 56–61.
17. Kovalcik A. Influence of removal of microbial inhibitors on PHA production from spent coffee grounds employing *Halomonas halophila* // *Journal of Environmental Chemical Engineering*. – 2018. – Vol. 6. – № 2. – P. 3495–3501.
18. Kulpreecha S. Inexpensive fed-batch cultivation for high poly(3-hydroxybutyrate) production by a new isolate of *Bacillus megaterium* // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2009. – Vol. 107. – № 3. – P. 240–245.
19. Ranganathan S. Utilization of food waste streams for the production of biopolymers // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6. – № 9. – P. 891–905.
20. Rodríguez G. J.E. Efficient production of polyhydroxybutyrate from slaughterhouse waste using a recombinant strain of *Cupriavidus necator* DSM 545 // *Science of The Total Environment*. – 2021. – Vol. 794. – P. 148754.
21. Poomipuk N., Reungsang A., Plangklang P. Poly- β -hydroxyalkanoates production from cassava starch hydrolysate by *Cupriavidus* sp. KKU38 // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2014. – Vol. 65. – P. 51–64.

ЗУБР: ИСТОРИЯ ВЫМИРАНИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВИДА В ПРИОКСКО-ТЕРРАСНОМ ЗАПОВЕДНИКЕ

Лемаев Т. В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В статье анализируется влияние деятельности человека на окружающую природу и животный мир. Изучается значение Красной книги как важного элемента для сохранения вымирающих видов. Автор рассматривает историю зубра как подтверждение возможности спасения вида, находящегося на грани исчезновения, но успешно восстановленного с помощью заповедников, исследуется важная роль Приокско-Террасного заповедника в сохранении зубра.

Ключевые слова: зубр, естественный отбор, вымирание, исчезающие виды животных, красная книга.

BISON: THE HISTORY OF EXTINCTION AND RESTORATION OF THE SPECIES IN THE PRIOKSKO-TERRASNY NATURE

Lemaev T. V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The article analyzes the impact of human activity on the surrounding nature and wildlife. The significance of the Red Book as an important element for the conservation of endangered species is being studied. The author considers the history of the bison as confirmation of the possibility of saving a species on the verge of extinction, but successfully restored with the help of reserves, the important role of the Prioksko-Terrasny Reserve in the preservation of the bison is investigated.

Keywords: bison, natural selection, extinction, endangered animal species, red book.

Учёные до сих пор не знают, сколько на планете существует представителей фауны, сегодня в мире проживают более 8 миллионов видов млекопитающих, птиц, рептилий, рыб и насекомых, и с каждым годом открывают новые виды. Богатства животного мира безграничны. Но несколько сотен видов занесены в красную книгу, многие находятся на грани вымирания. Почему эти виды могут перестать существовать на земле? Они обречены на исчезновение? Или могут избежать трагической судьбы, как это случилось с зубром?

В природе существует строгий порядок функционирования с целью поддержания и сохранения гармонии и баланса между существами, каждый живой организм играю свою определённую роль, в целом обеспечивая устойчивость всей системы. В ней нет ни одного лишнего зверя, они убраны эволюцией, и исчезновение любого из них обязательно скажется на устойчивости самой системы.

Человек тоже часть – это системы, он не может жить вне её [1]. Один из важных факторов природы – это естественный отбор, выживает тот вид, который смог адаптироваться к определённым трудностям, в то время как остальные не смогли и погибли. Виды исчезали, так же, как и возникали, благодаря медленному действию и теперь ещё существующих причин, то есть путём конкуренции и естественного отбора [2, с.73]

Многие виды живых существ успешно приспосабливались к изменениям климата, ландшафта, конкуренции со стороны хищников, но самой главной трудностью было взаимодействие с человеком.

Мы считаем человека венцом природы, который на эволюционном пути стоит вверху лестницы развития, опережая всех существующих животных. Пока животные приспосабливались к природным условиям, человек преобразовывал природу под свои нужды и развивался духовно и физически, постигал речь, здравый смысл, понятия добра и зла, создавал культуру и строил цивилизации, совершал географические открытия, делал революционные открытия в науке.

Технический и интеллектуальный прогресс позволили человеку занять особый статус в мире, но по мере того, как окружающая действительность осваивалась по мере развития возможностей общества, менялась природа-экологических проблем становилось больше. От этого страдал животный мир. Каждое живое существо выполняет определённые функции в природной цепи питания. Но если вымирает один вид, это вызывает сбой в сложившейся системе, который может привести к экологической катастрофе. При исчезновении одного звена экосистемы страдают и остальные, в природе всё взаимосвязано и поддерживается в хрупком балансе.

Человек истреблял различные виды животных на протяжении веков, он вырубал леса, уничтожал естественную среду обитания, охотился на зверей. В результате халатности по разным причинам с планеты исчезли стеллерова корова, бескрылая гагарка, странствующий голубь, тилацин или сумчатый волк, фолклендская лисица. Причиной их вымирания стал человек, они не смогли выжить в борьбе с ним. Эти виды больше не вернуть, как и многие другие. Человек должен осознавать, что вернуть исчезнувший биологический вид невозможно, люди на это не способны и уничтожая живых существ, наносят вред всей экосистеме, часто вызывая цепное исчезновение других созданий в природной среде. Сейчас под угрозой исчезновения находятся такие известные животные как амурский тигр, калифорнийский кондор, суматранский носорог, большая панда, калимантанский орангутан, снежный барс.

Понимая ошибки прошлого и то, к чему может привести бездумное истребление зверей, если их не защищать, человек занимается восстановлением популяции тех животных, которые оказались в тяжелой ситуации, близкой к вымиранию. Он делает всё возможное, чтобы не допустить исчезновения редких и уникальных видов. Исчезающие виды животных и растений – это те виды, которые находятся под угрозой исчезновения, спасение которых невозможно без осуществления специальных мер [3], все они включены в специальный документ, подтверждающий их особый статус, Красную книгу. Если животное оказалось в красной книге, это сигнал тревоги, призыв к защите данного животного, если не предпринимать активных действий, то виду грозит опасность исчезновения. Красная книга – это символ бережного отношения к природе, которая учит разумному обращению с животными.

Этим она создаёт надежду, что не всё потеряно, что биологические виды можно восстановить и спасти.

Одним из животных, занесённых в Красную книгу, является зубр. Уникальный биологический вид, зубр-это мощный дикий бык. Но его история крайне трагична. Изначально зубры встречались в смешанных лесах Западной, Восточной и Юго-Восточной Европы. Но величественное животное было объектом охоты со стороны человека, и к началу XX века дикие зубры оставались лишь в двух регионах-на Кавказе и в Беловежской пуще. Поэтому зубр разделился на два подвида-кавказского зубра и зубра равнинного (или беловежского) в соответствии с местами обитания.

Тяжёлые времена для зубров настали во времена Первой Мировой Войны-животных массово уничтожали в качестве пищи для солдат, а их места обитания разорялись боевыми действиями. Это привело к тому, что зубры были истреблены в дикой природе, последние представители кавказских зубров были застрелены на Западном Кавказе в 1926, а последние беловежские зубры исчезли в 1921 году в Беловежской пуще. Но зубры не вымерли-они сохранились в зоопарках и это спасло их полной гибели.

Международное общество по сохранению зубров, созданного в 1923, экстренно провело перепись оставшихся в зоопарках животных-численность зубров достигла критического уровня, на 1927 насчитывалось 48 особей. Началась тяжелая работа по восстановлению численности зубров, над которым возникла угроза вымирания. С этой целью зубр был внесён в красную книгу. Популяция зубров постепенно росла, благодаря разведению в специальных заповедниках. Ярким примером является Приокско-Террасный государственный природный заповедник имени Михаила Заблоцкого, который был создан специально для охраны окружающей среды.

19 июня 1945 года был создан Московский государственный заповедник, включавший 5 участков: Приволжско-Дубненский, Глубоко-Истринский, Верхне-Москворецкий, Верхне-Клязьменский и Приокско-Террасный. Но в 1951 из-за постановления Правительства СССР 4 заповедника, находившиеся в Московской области, оказались закрыты, сохранился только Приокско-Террасный заповедник. Приокско-Террасный заповедник- единственный государственный природный заповедник в Московской области и остаётся единственным заповедником в Подмосковье до сих пор. В чём причина? 21 ноября 1948 году русским зоологом и кандидатом биологических наук Михаилом Александровичем Заблоцким был основан первый Центральный российский зубровый питомник, что спасло заповедник от закрытия в 1951 году.

Изначальная задача питомника была направлена на восстановление вида и возвращение его в среду прежнего обитания, поэтому территория выбиралась с учётом биологической пригодности для обитания зубров, чтобы они были близки к естественным. Михаилом Заблоцким было проведено обследование ряда лесных территорий и для строительства питомника была избрана территория Приокско-Террасного участка Московского заповедника, потому что в нем сохранились остатки дубрав и области смешанных лесов с травянистым покровом, подходящим для зубров.

С середины 1949 года Центральный питомник начал выполнение своей основной задачи –разведения животных. К сожалению, кавказский подвид зубра был полностью истреблён охотниками и в настоящее время существует только в качестве гибрида с беловежским.

Поэтому на территории заповедника обитают как беловежские зубры, так и равнинно-кавказские. Первыми зубрами в питомнике были две пары зубров-пара зубров беловежского подвида Плещух и Плесе и пара зубров кавказско-беловежских Пустулучка и Пуслав.

Вскоре на свет появился первый зубрёнок, которому дали имя Москвитянин. Имена зубрам выбираются определённым образом, который был предложен Международным

обществом охраны зубров. Центральный зубровый питомник находится рядом со столицей России, Москвой, поэтому все имена зубров начинаются с буквы “М”. Дальнейшая буква зависит от природы зубра. Если родившийся зубрёнок беловежского подвида, то его имя начинается со слога “Мо”, как у зубра Моссада. А если зубрёнок кавказско-беловежский, то его имя начинается со слога “Му”, как у главной гордости заповедника, ставшего эмблемой питомника, зубра Мураками.

Подобная система позволяет сразу установить, где зубр родился, не прибегая к помощи справочников. Эти данные заносятся в специальную международную племенную книгу, ведущуюся в Беловежском национальном парке, где каждому животному присваивают определённый номер, чтобы фиксировать количество зубров в мире. За более чем 60-летний период работ по спасению зубра от исчезновения достигнуты убедительные результаты [4, с.6], усилиями работников Центрального зубрового питомника восстановлено поголовье зубров. В результате целенаправленной деятельности специалистов вид был спасён от угрозы исчезновения и возвращён в природу. Огромный вклад в восстановлении популяции зубра внёс М.А. Заблоцкий, его работа неоценима для охраны природы и окружающей среды не только России, но и всего мира.

За десятилетия в Центральном зубровом питомнике родилось более 500 зубрят, которые были отправлены в различные районы России и Белоруссии. Зубровник функционирует и в наши дни, по-прежнему выполняя такие задачи как выращивание молодых зубров для выпуска на волю в районах прежнего обитания этого вида, сохранение и укрепление генофонда зубров в России. В настоящее время Центральный зубровый питомник продолжает важную деятельность по сохранению зубра в России, вывозит животных для формирования популяций в Смоленскую, Калужскую и Брянскую область. Сейчас на территории заповедника обитают 33 зубра и 4 бизона.

Зубр-это яркий пример того, что исчезающее животное можно спасти и сохранить как важную часть природы. Зубр все ещё относится к группе уязвимых в Красной книге, но сейчас есть уверенность в том, что вид не исчезнет. Если в начале XX века шансы на выживание зубров были минимальны, то сейчас их численность постепенно стабилизируется. Чувство ответственности заставляет постоянно думать о том, какие именно меры необходимы для обеспечения нормальной жизнедеятельности зубров [5].

Но кроме этого зубр является уникальным биологическим видом из Красной книги, фактически первым, который официально вымер в дикой природе, полностью истреблён человеком в естественных условиях. Зубр уцелел только в неволе, в питомниках, зоопарках и зоосадах мира, а затем был успешно возвращён в природу в места привычного обитания. Этот вид был спасён от полного исчезновения только благодаря многолетним действиям специалистов из России и Европы, одним из которых был М.А. Заблоцкий. Сейчас в мире больше 9000 тысяч зубров, а когда-то их было меньше 50. Это невероятное событие, что последний представитель диких быков в Европе до сих пор существует.

Зубр-доказательство того, что любой вид можно спасти и восстановить, но для этого нужно приложить необходимые и фундаментальные усилия. В данных случаях животные успешно избежали исчезновения и полного вымирания. Но не всем так везёт...

Таким образом, в существовании и формировании видового разнообразия животных огромную роль занимает естественный отбор, где важным является то, сумеет биологический вид адаптироваться к возникшим трудностям или погибнет от них. Но большое влияние на вымирание многих видов оказал человек. Человек истреблял различные виды животных на протяжении веков, он вырубал леса, уничтожал естественную среду обитания, охотился на

зверей. И это не могло не отразиться на живой природе, многие звери и птицы начали исчезать, часть безвозвратно. Человек осознал последствия своей деятельности и принимал защитные меры к тем животным, которые оказались в тяжелой ситуации, близкой к вымиранию. В первую очередь все редкие виды, попавшие под угрозы исчезновения, заносились в красную книгу и приобретали охраняемый статус. Но последнего варианта красной книги не существует и быть не может, она постоянно обновляется.

Условия обитания животных постоянно меняются и всё новые и новые виды могут оказаться в катастрофическом положении [1]. Но те усилия, которые прилагает человек, оставляют надежду, что многие виды избегут ужасной участи.

Одним из таких животных стал зубр. Изначально зубры встречались в смешанных лесах Западной, Восточной и Юго-Восточной Европы. Но величественное животное было объектом охоты со стороны человека, и к началу XX века дикие зубры оставались лишь в двух регионах, численность зубров сокращалась. Это привело к тому, что зубры были истреблены в дикой природе, но они не вымерли окончательно-зубры сохранились в зоопарках и это спасло их полной гибели. Огромный вклад в сохранение зубров внёс русский зоолог М.А.Заблоцкий. Под его руководством был основан первый Центральный российский зубровый питомник на территории Приокско-Террасного заповедника. За годы упорных трудов и тяжёлой деятельности работников Центрального питомника восстановлено поголовье зубров. В результате целенаправленной деятельности специалистов вид был спасён от угрозы исчезновения и возвращён в природу. Заповедник существует до сих пор и является важным местом разведения зубров.

Зубр является уникальным животным, потому что официально вымер в дикой природе, но благодаря разведению в заповедниках, величественному быку удалось выжить в неволе и постепенно восстановить свою прежнюю численность. Пример зубра показывает, что любой вид можно сохранить, даже если он находится на грани исчезновения и шансы малы. К каждому виду нужно относиться осторожно и бережно, поскольку он неповторим и важен для экосистемы. Но если о природе не заботиться, то в очень скором времени многих животных может не стать, или даже самого человека.

Библиографический список

1. Флинт В.Е. Стратегия сохранения редких видов в России: теория и практика. – М.: Московский зоопарк, 2004. – 376 с.
2. Колберт Элизабет. Шестое вымирание. Неестественная история/Элизабет Колберт; пер, с англ. Под ред. А. Якименко. – Москва: издательство АСТ: CORPUS, 2019. – 368 с.
3. Красная Книга Международного Союза Охраны Природы, 1963.
4. Козло, П. Г. Зубр в Беларуси / П. Г. Козло, А. Н. Буневич; науч. ред. В. П. Семенченко. – 2-е изд., испр. и доп. – Минск: Беларус. навука, 2011. – 366 с.,
5. Перерва В. И. Возвращение зубра. – Москва: «Колос», 1992. – 207 с.

ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РЕКИ ДОН

Михайлов М.А., Черных В.Д., Смолий М.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация: Россия очень богата количеством рек, которые есть у нее на территории. Свыше 2,8 млн рек, общая длина которых составляет 12,4 млн. км. Река Дон располагается в европейской части России. По водосборной площади площадь реки ее площадь составляет 422 тыс. км². Целю данной работы служит оценка и анализ данных экологической обстановки реки Дон, в пределах города Ростов-на-Дону. Загрязнение окружающей среды тяжелыми металлами является актуальной проблемой в современном мире. Повышение антропогенного воздействия привело к увеличению выбросов загрязнителей, которые загрязняют все слои биосферы. Тяжелые металлы – это одни из самых распространенных и опасных токсикантов, для которых свойственно пагубно влиять на живое.

Ключевые слова: экология, загрязнение водоемов, загрязнение, водные ресурсы.

ECOLOGICAL CONDITION OF THE DON RIVER

Mikhailov M. A., Chernykh V. D., Smoliy M. V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. Russia is very rich in the number of rivers it has on its territory. There are over 2.8 million rivers with a total length of 12.4 million km. The Don River is located in the European part of Russia. In terms of its catchment area, the river has an area of 422,000 km². The purpose of this work is to assess and analyze data on the ecological situation of the Don River, within the city of Rostov-on-Don. Environmental pollution by heavy metals is an urgent problem in the modern world. Increased anthropogenic impact has led to an increase in pollutant emissions that pollute all layers of the biosphere. Heavy metals are one of the most widespread and dangerous toxicants, for which it is characteristic to have a deleterious effect on living things.

Keywords: ecology, water pollution, pollution, water resources.

Дон – это река в Европейской части России. Исток реки расположен на северных склонах Среднерусской возвышенности, у г. Новомосковска, Тульской области. Пройдя путь длиной в 1870 км впадает в Таганрогский залив Азовского моря.

Донской бассейн, площадь которого составляет 422 000 км², образуется в результате 5200 притоков, длина которых составляет 60100 км. Большая часть данного бассейна раскидывается на плоской Восточно-Европейской равнине. Донской бассейн является

довольно маловодным из-за его местоположения располагается на природно-климатических зонах и лесостепной местности. Средний сток в устье Дон составляет около 35 м³/сек.

Как правило, реки, длина которых довольно большая разделяют на три участка: Нижний, Средний и Верхний. В данной работы будут проанализировано экологическое состояние Нижнего Дона. Данная часть реки Дон берет свое начало от города Калач-на-Дону до устья. Глубины реки в некоторых местах достигают 15 м. Глубины достигают местами 15 м. В течении реки Нижнего Дона притоками, Северный Донец – справа, Маныч – слева.



Рисунок 1 – Карта бассейна Нижнего Дона [1].



Рисунок 2 – Нижний Дон.

Под загрязнением водных ресурсов понимают любые изменения физических, химических и биологических свойств воды в водоемах в связи со сбрасыванием в них жидких, твердых и газообразных веществ, которые причиняют или могут создать неудобства, делая воду данных водоемов опасной для использования, нанося ущерб народному хозяйству, здоровью и безопасности населения [2]. В качестве мероприятий, основанных на эпидемиологическом мониторинге за ситуацией по холере, были организованы во временной промежуток 60-70-х годов 20 века в связи со вспышкой данного заболевания в городе Ростове-на-Дону. Таким образом, использование для хозяйственных целей воды из реки Дон стало причиной 80% случаев инфицирования населения. Так как донской бассейн формирует экономический район, относящийся к развитым промышленно аграрным, с долей в суммарном объеме продукцией 20-30%, то на бассейн Нижнего Дона, рядом с которым располагаются крупные города, лежит большая антропогенная нагрузка и загрязнение.

В Донском бассейне в качестве источников водоснабжения основными служит сама река Дон, ее поверхностные воды и водохранилища. Из подземных источников забор воды составляет 4,7% от общего забора воды. Сбросы сточных вод различных промышленных предприятий существенно влияют на качественный состав реки Дон. Следует добавить, что на качество водяного бассейна также оказывает влияние загрязняющие вещества, поступающие с городских территорий, воды орошения и сельскохозяйственные объекты.

Поверхностные воды обладают довольно-таки разнообразным химическим составом. Причина заключается, прежде всего, с различными условиями: физические, так и географические.

Для Ростовской области качество воды реки Дон определяется под влиянием сбросов сточных вод следующих городов:

- 1) Волгодонск;
- 2) Ростов-на-Дону;
- 3) Константиновка;
- 4) Азов;
- 5) И другие.

На ухудшение состава водных объектов влияют хозяйственные действия следующих предприятий: промышленные и сельскохозяйственные. Для промышленных предприятий характерны следующие факторы ухудшения водных объектов:

- 1) Очищенные или недостаточно очищенные сточные воды предприятий;
- 2) Очищенные или недостаточно очищенные сточные воды загрязненных шахтных вод, которые в своем составе включают железо, цинк, сульфате, медь.

Для сельскохозяйственных:

- 1) Сбросы сточных вод, осуществляемый по специально выделенным каналам, после орошения земельных участков без очищения;
- 2) Вынос почвы с определенными химическими веществами, такими как натрий, кальций, сульфаты, хлориды, магний.

Помимо сельскохозяйственных и промышленных предприятий существуют еще объекты водопроводно– канализационного хозяйства, которые загрязняют водные ресурсы путем сбросов загрязненных сточных вод. Приведем оценку экологического состояния реки Дон используя параметр ПДК (предельно допустимая концентрация) и средние концентрации тяжелых металлов в воде Нижнего Дона. Период измерения 2018 – 2021 гг. Единица измерения – мкг/л.

Из таблицы 1 видно, что концентрация марганца, железа, цинка и меди увеличилась. Но превысило ПДК лишь концентрация железа.

Таблица 1 – Средние концентрации тяжелых металлов в воде Нижнего Дона в период 2018 – 2021 гг., мкг/л [2].

Год	Fe	Mn	Zn	Cu	Pb	Cr	Cd	Ni	As	Hg
2018	44	9,8	2,1	1,2	<0,40	<1,0	<0,10	4,2	<2,5	<0,01
2019	25	6,2	3,3	1,3	<0,40	2,5	0,10	3,0	<2,5	<0,01
2020	82	26	7,9	1,9	0,53	1,4	0,10	2,4	2,8	0,02
2021	105	45	3,7	1,1	0,75	<1,0	<0,10	2,4	<2,5	0,02
ПДК	100	10	10	1,0	6	20	5	10	50	0,01

Согласно таблице 2 можно заметить, что в 2021 году лишь увеличилась концентрация мышьяка и уменьшилась концентрация хрома. Увеличение – в 1,6 раза.

Таблица 2 – Средние концентрации тяжёлых металлов в донных отложениях Нижнего Дона в период 2018 – 2021 гг., мг/кг сухой массы [2].

Год	Ni	As	Mn	Hg	Cd	Pb	Cu	Zn	Cr	Fe
2018	34	5,3	242	0,12	0,08	16	30	62	195	15772
2019	20	6,4	517	0,13	0,11	16	31	63	88	16178
2020	17	7,9	365	0,01	0,09	10	11	48	63	9753
2021	24	10	386	0,02	0,10	31	27	70	54	18206

В результате проведенного исследования представляется возможным сделать следующие выводы. Токсическое загрязнение реки Нижний Дон за последние четыре года претерпела изменения. Средние концентрации тяжелых металлов в воде реки Нижнего Дона не почти не изменились, кроме концентрации железа и мышьяка. Концентрация мышьяка увеличилась примерно в 1,6 раз. В работе описывается какую опасность представляет загрязнение водных систем для экологии региона.

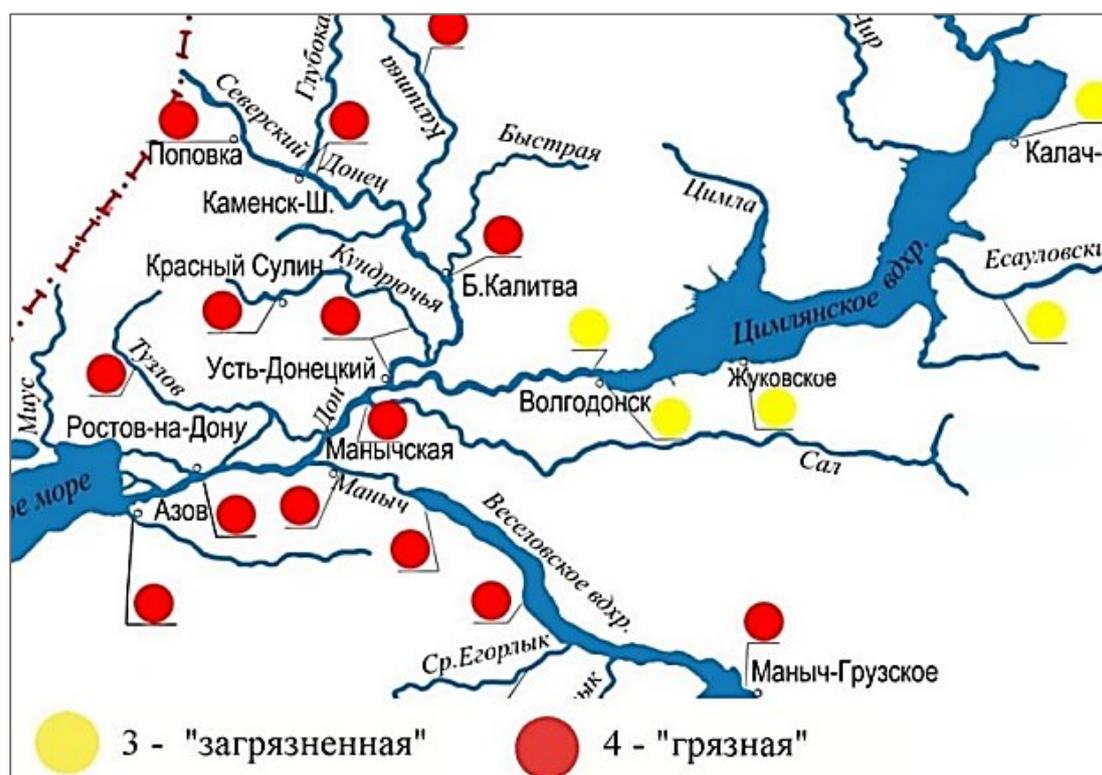


Рисунок 3 – Карта оценка качества поверхностных вод бассейна р. Дон по комплексным показателям в 2020 г [4].

Экологические проблемы нижнего течения Дона по большей части обусловлены недостаточным водообеспечением. Строительство Цимлянского водохранилища повлияло на нарушение естественного режима речного стока.

На качество питьевой воды отрицательный эффект оказало интенсивное развитие сине-зеленых и зеленых водорослей, что привело к хроническому «цветению» воды в р. Дон, и

Цимлянском водохранилище. Актуальной проблемой является подтопления (заболачивания), засоления грунтовых и поверхностных вод. Эти процессы повлияли на значительное ухудшение водных экосистем в бассейне р. Маныч, что способствовало резкому снижению рыбохозяйственной деятельности в Веселовском и Пролетарском водохранилищах [5].

Библиографический список

1. Алексенко В. Н. География Ростовской области: учебник / Алексенко В.Н., Мартынова М. И. // Ростов-на-Дону: ООО «Терра», 2005. – 120 с
2. Фишкина М. В. Экологический вестник дона. «О состоянии окружающей среды и природных ресурсов Ростовской области в 2021 году» Ростов-на-Дону 2022»
3. Источники загрязнения внутренних водоемов [Электронный ресурс]. URL: <https://ecoportal.su/public/zagryazn/view/912.html/> (дата обращения: 08.10.2022)
4. Качество поверхностных вод Российской Федерации. 2020 гг. / Росгидромет. ФГБУ ГХИ. Ростов-на-Дону, 2021. – 612 с.
5. Джамалов Р. Г. Водные ресурсы бассейна Дона и их экологическое состояние / Джамалов Р. Г., Киреева М. Б., Косолапов А. Е., Фролова Н. Л.

АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДОННЫХ ОСАДКОВ ТЕХНОГЕННОГО ВОДОЕМА (Г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ)

Нечаева Ю.И.^{1,2}, Белкин П.А.¹, Плотникова Е.Г.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия.

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

Аннотация. Проведен анализ структуры микробных сообществ донных отложений галощелочного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей. Отмечено, что доминирующими филумами являются *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*. Показано, что микробные сообщества обладают высоким микробным разнообразием. Выявлена значительная корреляция между содержанием в среде K^+ , Na^+ , Mg^{+2} , Cl^- , хрома, цинка и представленностью филумов *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* и *Fusobacteria*.

Ключевые слова: экстремальные условия, микробные сообщества, донные отложения, Верхнекамское месторождение солей.

ANALYSIS OF THE OF MICROBIAL COMMUNITIES STRUCTURE IN BOTTOM SEDIMENTS OF A TECHNOGENIC WATER RESERVOIR (BEREZNIKI, PERM KRAI)

Nechaeva Y.I.^{1,2}, Belkin P.A.¹, Plotnikova E.G.^{1,2}

¹ Perm State University, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy
of Sciences, Perm, Russia

Abstract. Microbial communities of bottom sediments of an anthropogenic reservoir with saline alkaline water located on the territory of the Verkhnekamsk salt deposit (Berezniki, Perm region, Russia) were studied. The majority of bacteria found in the samples belong to the phyla *Proteobacteria*, *Firmicutes* and *Actinobacteria*. The study shows that microbial communities have a high microbial diversity. A significant influence of concentrations of K^+ , Na^+ , Mg^{+2} , Cl^- , Cr and Zn on the representation *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* and *Fusobacteria* was revealed.

Keywords: extreme conditions, microbial communities, bottom sediments, Verkhnekamsk salt deposit.

Микроорганизмы, присутствующие в различных естественных и техногенных экосистемах, играют значительную роль в их функционировании, участвуют в биогеохимическом круговороте различных элементов, а также в утилизации различных загрязняющих агентов в окружающей среде.

В последнее время широко исследуются экстремальные местообитания, такие как глубоководные гидротермальные источники, территории вечной мерзлоты, а также засоленные и щелочные среды обитания, которые широко распространены по всему миру [1]. Несмотря на неблагоприятные физико-химические условия среды, данные экосистемы обеспечивают разнообразие экологических ниш для широкого спектра микроорганизмов [2].

В засоленных и щелочных природных средах обитают различные группы галоалкалофильных микроорганизмов, которые способны выживать в условиях высокой солености (до 33% NaCl) и щелочности среды (pH > 9). Галоалкалофилы ранее были обнаружены в микробных сообществах содовых озер, соляных отложений, соляных шахт, а также солончаковых почв [3]. За последнее время накопился большой объем знаний о сообществах микроорганизмов природных галощелочных сред обитания, однако микробное разнообразие искусственных местообитаний изучено недостаточно. При этом стоит отметить, что способность галоалкалофильных микроорганизмов существовать в экстремальных условиях среды привлекает к ним большой интерес, как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

Целью настоящего исследования являлось изучение разнообразия и структуры микробных сообществ донных осадков техногенного галощелочного водоема, расположенного на территории Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (ВМКМС).

Для исследований проводили отбор донных отложений из техногенного щелочного водоема, расположенного на территории ВМКМС (Пермский край, Россия). Образец донных осадков включал 9 слоев (таблица), которые отличались содержанием солей (Na⁺ 9611-39078 мг/кг; K⁺ 226-14475 мг/кг; Mg²⁺ 218-4510 мг/кг) и токсичных элементов, значениями pH (9,89-10,57), а также качественным и количественным составом органических соединений (3,04-5,94%). Для анализа микробных сообществ отобраны пробы из каждого слоя, в целом для исследования микробных сообществ использовали 9 проб.

Таблица – Физико-химические характеристики исследуемых слоев

№ слоя	Глубина	pH	ОВ	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻	Cr	Zn
	м		%	мг/кг					
9	0-0,12	10,48	3,04	1308	9611	226	46270	140,98	10,47
8	0,12-0,25	10,57	4,23	386	16863	616	93000	2268,98	26,61
7	0,25-0,38	10,33	3,19	218	9785	289	46735	47,66	2,11
6	0,38-0,69	10,44	4,15	441	26350	1080	92800	1425,71	29,96
5	0,69-0,85	10,32	4,18	4510	39078	14475	114600	491,38	21,98
4	0,85-1,02	10,37	5,08	1007	21000	892	85500	1152,39	33,96
3	1,02-1,32	10,35	5,30	2013	16256	678	67750	952,00	41,78
2	1,32-1,52	10,18	4,69	1576	19464	754	70150	917,09	36,91
1	1,52-1,82	9,89	5,94	1739	19293	891	76775	1120,89	35,08

Примечание: ОВ – содержание органического вещества

Выделение тотальной ДНК из донных отложений проводили с использованием набора реактивов NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Для ПЦР-амплификации фрагмента гена 16S рРНК использовали универсальные праймеры для гипервариабельной области V4: 515F/806R (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'/ 5'-GGACTACVSGGGTATСТААТ-3') [4], с присоединенными адаптерами и уникальными баркодами компании Illumina (США). ПЦР-амплификацию и подготовку библиотек для секвенирования гена 16S рРНК проводили в соответствии с рекомендациями производителя (Illumina, США). ДНК библиотеку секвенировали на платформе Illumina MiSeq с использованием MiSeq® ReagentKit v3 (2 × 300 п.н., 600 циклов).

Удаление адаптеров и демультимплексирование полученных парно-концевых прочтений (300 п.н.) проводили с помощью программного обеспечения компании Illumina (США). Для контроля качества данных секвенирования использовали FASTQC v0.11.7. Шумоподавление, объединение последовательностей, удаление химерных прочтений и получение вариантов последовательностей ампликонов (ASV, Amplicon Sequence Variant) проводили с помощью программного пакета DADA2 [5], интегрированного в QIIME 2 версии 2021.11 [6]. Уникальные варианты последовательностей ампликонов (ASV) классифицированы с помощью наивного байесовского классификатора, предварительно обученного на базе данных SILVA v138 [7]. Статистический анализ полученных данных осуществляли в среде программирования R (версия 4.0.2).

По данным секвенирования гена 16S рРНК микробные сообщества сформированы 23 филумами в составе домена *Bacteria*. Во всех образцах доминирующим филумом был *Proteobacteria* (61,19-76,58%), за ним следуют *Firmicutes* (8,96-19,21%), *Actinobacteria* (8,76-13,28%), *Bacteroidetes* (2,86-4,8%), *Fusobacteria* (0,1-1,12%) и *Cyanobacteria* (0,63-1,04%). Данные результаты согласуются с предыдущими исследованиями, которые показывают, что *Proteobacteria* является доминирующим филумом в соленых и щелочных средах по всему миру [8, 9]. Ранее представители данных групп обнаружены в природных экосистемах, таких как засоленные почвы [10], содовые озера [11], а также в искусственных местах обитания [9]. Менее многочисленными филумами (<1%) являлись *Tenericutes*, *Chloroflexi*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomycetes*, *TM7*, *OD1*, *Verrucomicrobia*, *Acidobacteria* и другие. В ходе сравнительного анализа отмечено, что в образце №5 (таблица) процентное содержание *Proteobacteria* (76,58%) увеличено в сравнении с остальными образцами. При этом содержание представителей филума *Firmicutes* составляло 8,96 %, что меньше, чем в других образцах (15,81-19,21%). В образце №7 (таблица) выявлено высокое относительное содержание *Cyanobacteria* (1,51%). При этом стоит отметить, что при проведении химического анализа данного образца обнаружено сравнительно низкое содержание в нем ионов Mg^{+2} , K^{+} , Na^{+} и Cl^{-} . Для анализа взаимосвязи между факторами окружающей среды и таксономическим составом на уровне филумов проведен подсчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена.

Выявлено, что тип *Proteobacteria* положительно коррелирует с содержанием Na^{+} и K^{+} ($p < 0,01$). В отличие от *Proteobacteria*, для филума *Fusobacteria* обнаружена отрицательная связь с K^{+} и Na^{+} . Отмечена также существенная ($p < 0,01$) отрицательная корреляция между содержанием в среде Mg^{+2} , Na^{+} , Cl^{-} , Cr , Zn и представленностью филума *Cyanobacteria*.

Основными классами, преобладающими в микробных сообществах донных отложений, являлись *Gamma*proteobacteria (23,77-37,71%), *Beta*proteobacteria (21,03-37,82%), *Bacilli* (7,56-15,02%), *Alphaproteobacteria* (9,54-12,71%) и *Actinobacteria* (8,03-11,59%).

Можно отметить, что во всех образцах представители классов *Gamma*proteobacteria и *Beta*proteobacteria имеют примерно одинаковое относительное содержание. За исключением образца №8 (таблица), где процентное содержание *Beta*proteobacteria (37,82%) практически в 2 раза превышает *Gamma*proteobacteria (23,77%). На уровне рода наиболее представленными

являлись: *Ralstonia* (15,73-29,65%), *Pseudomonas* (13,57-29,92%), *Streptococcus* (4,59-8,73%), *Bradyrhizobium* (2,79-5,16%), *Propionibacterium* (1,96-3,27%) и *Staphylococcus* (1,84-3,04%). Согласно литературным данным представители родов *Ralstonia* и *Pseudomonas*, которые доминируют в изученных микробных сообществах, способны к деградации алифатических и ароматических углеводов [12, 13]. Также в последнее время широко исследуется устойчивость данных родов к различным высокотоксичным элементам, в частности тяжелым металлам [14]. Предполагается, что большое относительное содержание данных родов связано с их потенциальной возможностью нормально функционировать в экстремальных условиях среды, в частности при засоленности, высокой щелочности и повышенных концентрациях высокотоксичных элементов, что характерно для исследуемых донных отложений техногенного щелочного водоема ВМКМС.

Анализ альфа-разнообразия показал, что, несмотря на наличие экстремальных условий среды, в исследуемом водоеме наблюдается высокое микробное разнообразие. В сравнении с ранее опубликованными данными для гиперсоленых озер [15] полученные показатели альфа-разнообразия на уровне ASV являются достаточно высокими. Разнообразие микробных сообществ (Shannon, Simpson), богатство (Chao1) и равномерность (Pielou's Evenness) не существенно варьируют между исследуемыми образцами. Также проведена оценка влияния факторов окружающей среды на показатели альфа-разнообразия методом подсчета коэффициента Пирсона. В ходе анализа отмечена существенная отрицательная корреляция между показателями альфа-разнообразия (Shannon, Simpson, Chao1) и содержанием в среде растворенных хлоридов, натрия, магния и калия.

Исследование микробных сообществ техногенных, чрезвычайно засоленных, щелочных донных отложений показывает высокое разнообразие и богатство сообществ бактерий. В целом, сравнительный анализ распределения таксономических групп микроорганизмов в донных отложениях солёного щелочного водоема не выявил сильных отличий относительно глубины исследованных слоев (от поверхностного слоя к более глубинному), в свою очередь данный факт может быть связан с отсутствием явных различий в физико-химических свойствах между слоями в донных отложениях. Преобладающими филумами в микробных сообществах являлись *Proteobacteria*, *Firmicutes* и *Actinobacteria*, что по литературным данным характерно для гиперсоленых и щелочных местообитаний. При этом доминирующие рода идентифицированы, как *Ralstonia* и *Pseudomonas*. Наличие в микробных сообществах микроорганизмов, потенциально способных использовать в качестве источника углерода и энергии широкий спектр углеводов, свидетельствует о возможности сообществ обеспечивать деградацию различных соединений и использования их в биотехнологических целях.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации темы: АААА-А19-119112290008-4. Комплекс полевых исследований проведён при поддержке гранта Президента РФ № МК-4377.2022.1.5.

Библиографический список

1. Shu W. S., Huang L. N. Microbial diversity in extreme environments // Nature Reviews Microbiology. – 2022. – V. 20. – №. 4. – P. 219-235.
2. Philippot L., Griffiths B. S., Langenheder S. Microbial community resilience across ecosystems and multiple disturbances // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2021. – V. 85. – №. 2. – P. e00026-20.

3. Ventosa A., de la Haba R. R., Sánchez-Porro C., Papke R. T. Microbial diversity of hypersaline environments: a metagenomic approach // *Current Opinion in Microbiology*. – 2015. – V. 25. – P. 80-87.
4. Bates S. T., Berg-Lyons J.G., Caporaso W.A., Walters W.A., Knight R., Fierer N. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil // *The ISME journal*. – 2011. – V.5 – №. 5. – P. 908-917.
5. Callahan B. J., McMurdie P. J., Rosen M. J., Han A. W., Johnson A. J. A., Holmes, S. P. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data // *Nature methods*. – 2016. – V. 13. – №. 7. – P. 581-583.
6. Bolyen E., Rideout J. R., Dillon M. R., Bokulich N. A., Abnet C. C., Al-Ghalith G. A., Caporaso J. G. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 // *Nature biotechnology*. – 2019. – V. 37. – №. 8. – P. 852-857.
7. Quast C., Pruesse E., Yilmaz P., Gerken J., Schweer T., Yarza P., Peplies J., Glöckner F.O. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools // *Nucleic acids research*. – 2012. – V. 41. – №. D1. – P. D590-D596.
8. Wang Y., Bao G. Diversity of prokaryotic microorganisms in alkaline saline soil of the Qarhan Salt Lake area in the Qinghai–Tibet Plateau // *Scientific reports*. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 1-14.
9. Kalwasińska A., Deja-Sikora E., Szabó A., Felföldi T., Kosobucki P., Brzezinska M. S., Walczak M. Salino-alkaline lime of anthropogenic origin a reservoir of diverse microbial communities // *Science of The Total Environment*. – 2019. – V. 655. – P. 842-854.
10. Hollister E. B. Engledow A. S., Hammett A. J. M., Provin T. L., Wilkinson H. H., Gentry T. J. Shifts in microbial community structure along an ecological gradient of hypersaline soils and sediments // *The ISME journal*. – 2010. – V. 4. – №. 6. – P. 829-838.
11. Ersoy Omeroglu E., Sudagidan M., Yurt M. N. Z., Tasbasi B. B., Acar E. E., Ozalp V. C. Microbial community of soda Lake Van as obtained from direct and enriched water, sediment and fish samples // *Scientific Reports*. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 1-13.
12. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., James T.S. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria* – N.Y., Springer, 2005. P. 1388
13. Shariati S., Pourbabae A. A., Alikhani H. A., Rezaei K. A. Anaerobic biodegradation of phthalic acid by an indigenous *Ralstonia pickettii* strain SHAn2 isolated from Anzali international wetland // *International Journal of Environmental Science and Technology*. – 2022. – V. 19. – №. 6. – P. 4827-4838.
14. Liu H. Zhang Y., Wang Y., Xie X., Shi Q. The connection between CZC and CAD systems involved in cadmium resistance in *Pseudomonas putida* // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – V. 22. – №. 18. – P. 9697.
15. Chen S., Xu Y., Helfant L. Geographical isolation, buried depth, and physicochemical traits drive the variation of species diversity and prokaryotic community in three typical hypersaline environments // *Microorganisms*. – 2020. – V. 8. – №. 1. – P. 120.

ПОИСК СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА И ПРОДУКТИВНОСТИ *CHLORELLA VULGARIS*

Новокшонова А. Д.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов, ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. Оптимизированы условия культивирования *C. vulgaris*: засевная доза, допустимая концентрация органического растворителя, время культивирования, режим аэрации клеточной культуры, режим «свет-темнота», настройка орбитального шейкера. Оптимизированы методы хранения и поддержания физиологического постоянства культуры *C. vulgaris*.

Ключевые слова: *Chlorella vulgaris*, биостимуляторы, биомасса, рост, культивирование.

SEARCH FOR GROWTH AND PRODUCTIVITY STIMULANTS *CHLORELLA VULGARIS*

Novokshonova A. D.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, PFRC UB RAS, Perm, Russia

Abstract. *C. vulgaris* cultivation conditions were optimized: inoculation dose, allowable concentration of organic solvent, cultivation time, cell culture aeration mode, light-dark mode, orbital shaker setting. The methods of storage and maintenance of the physiological constancy of the *C. vulgaris* culture have been optimized.

Keywords: *Chlorella vulgaris*, biostimulants, biomass, growth, cultivation.

Зеленая одноклеточная водоросль *Chlorella vulgaris* имеет серьезный потенциал промышленного применения, который обусловлен ее способностью к быстрому размножению и накоплению биомассы, содержащей широкий спектр биологически активных соединений: белков, полиненасыщенных жирных кислот, пигментов, витаминов, минералов и олигосахаридов [1]. Для увеличения продуктивности *C. vulgaris* используются различные стимуляторы, которыми служат как химические соединения (например, фитогормоны), так и физические факторы (магнитные поля, освещение и т.д.) [2]. Биостимуляторы позволят предприятиям, использующим *C. vulgaris*, повысить практический выход представляющих интерес молекул. Особую актуальность создание новых стимуляторов продуктивности *C. vulgaris* имеет для производителей биодизеля, удобрений, биогаза, инструментов для очистки сточных вод, восстановления почв [1]. Изготовители продуктов питания, кормов,

косметики, товаров для здоровья, также заинтересованы в повышении продуктивности *C. vulgaris* [3].

Промышленные предприятия, культивирующие *C. vulgaris* в крупных масштабах, испытывают потребность в эффективных способах усиления роста и продуктивности *C. vulgaris* [4].

Поиск биостимуляторов будет производиться при помощи скрининга библиотеки малых органических молекул, относящихся к классу гетероциклических соединений. На настоящий момент, разработан протокол анализа для скрининга библиотеки малых органических молекул. Были оптимизированы следующие условия культивирования *C. vulgaris*: засевная доза, допустимая концентрация органического растворителя, время культивирования, режим аэрации клеточной культуры, режим «свет-темнота», настройка орбитального шейкера. Оптимизированы методы хранения и поддержания физиологического постоянства культуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания № АААА-А19-119112290010-7.

Библиографический список

1. Wilson G., Microalgae for biotechnological applications: Cultivation, harvesting and biomass processing // Aquaculture. 2020. Vol. 528, P. 562-735.
2. Metsoviti M. N., Papapolymerou G., Effect of light intensity and quality on growth rate and composition of *Chlorella vulgaris* // Plants (Basel, Switzerland). 2019. Vol. 9, no. 1, P. 31-31.
3. Abdul Fattah S., Nazlina Haiza M. Y., Unveiling antimicrobial activity of microalgae *Chlorella sorokiniana* (UKM2), *Chlorella* sp. (UKM8) and *Scenedesmus* sp. (UKM9) // Saudi journal of biological sciences. 2022. Vol. 29, no. 2, 1043–1052.
4. Ziganshina E.E., Bulynina S.S., Ziganshin A.M., Growth characteristics of *chlorella sorokiniana* in a photobioreactor during the utilization of different forms of nitrogen at various temperatures // Plants. 2022. Vol. 11, no. 8, P. 10-86.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕФТЕЙ И НЕФТЕПРОДУКТОВ

Олькова А.С.¹, Баньковская Е.В.¹, Матанина В.В.², Вьялкова А.А.²

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

² Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России, Пермь, Россия

Аннотация. В работе исследована ранозаживляющая активность нефтей Русского (НРМ) и Нафталанского (ННМ) месторождений, а также светлых нефтепродуктов ранотензиометрическим методом. В результате исследования выявлено, что мазевые композиции, содержащие светлые нефтепродукты, превосходят по ранозаживляющему действию ННМ и НРМ. Наибольшее ранозаживляющее действие выявлено у мазевых композиций на основе бензиновых фракций.

Ключевые слова: нефть, светлые нефтепродукты, ранозаживляющая активность.

STUDY OF THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF OILS AND PETROLEUM PRODUCTS

Olkova A.S.¹, Bankovskaya E.V.¹, Matanina V.V.², Vyalkova A.A.²

¹ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia.

² Perm State Pharmaceutical Academy of the Ministry of Health of Russia, Perm, Russia

Abstract. The wound-healing activity of oils from the Russian (NRM) and Naftalan (NNM) fields, as well as light oil products, was studied by the early tensiometric method. As a result of the study, it was revealed that ointment compositions containing light oil products are superior in the wound healing effect of ННМ and НРМ. The greatest wound healing effect was found in ointment compositions based on gasoline fractions.

Keywords: oil, light oil products, wound healing activity.

Нефть и нефтепродукты являются объектом исследования во многих областях науки, например, в химии, физике, биологии, а также в медицине [1–5]. Лечебная нефть Нафталанского месторождения используется и в настоящее время в медицинской практике. Нафталан отличается от других нефтей содержанием различных химических соединений с преобладанием углеводов нафтенового ряда [6]. Препараты на основе нафталана применяются для лечения заболеваний кожи, сосудов, а также опорно-двигательной аппарата. В настоящее время запасы Нафталанского месторождения значительно истощены.

В работах академика Нестерова И.И. ведутся поиски бальнеологических нефтей, аналогичных нафталанской. В Западной Сибири выявлены нафтеновые нефти и конденсаты с лекарственными свойствами, которые относятся к сенманским месторождениям – нефть

Русского месторождения и Ван-Еганского, добываемые в Тюменской области [7], которые по химическому составу идентичны нафталанской нефти [8]. В сеноманских нефтях среди нафтеновых углеводородов преобладают соединения адамантанового ряда. На основе адамантанов нефтей Западной Сибири созданы высокоэффективные противовирусные составы пролонгированного действия [9].

Работы, в которых исследована ранозаживляющая активность нефтепродуктов практически отсутствуют, поэтому исследование нефтепродуктов как источника биологически активных веществ является актуальным.

Целью данной работы является изучение ранозаживляющей активности некоторых нефтей и светлых нефтепродуктов.

Материалы и методы. Объекты исследования: нефти русского и нафталанского месторождений, а также прямогонный бензин с заводской установки АВТ-5, из которого по известным методикам [10] были получены узкие фракции (АВТ-5-150-160, АВТ-5-140-150, АВТ-5-130-140, АВТ-5-120-130), деароматизированные фракции (АВТ-5-150-160ДА, АВТ-5-140-150ДА, АВТ-5-130-140ДА), фракция аренов (АВТ-5-150-160АР), а также фракции с изопарафинами и нафтенами (АВТ-5-140-150ИН, АВТ-5-130-140ИН, АВТ-5-120-130ИН).

С целью изучения ранозаживляющей активности исследуемых образцов были приготовлены 10% мазевые композиции. В качестве мазевой основы использовали медицинский вазелин. Скрининговые исследования проведены на белых нелинейных крысах-самках массой 220–270 г на модели линейной асептической раны кожи. В контрольные и опытные группы было включено по 3 животных, у каждого животного произведено по 2 разреза, таким образом, в каждой группе получали по 6 результатов. В асептических условиях под кратковременным эфирным наркозом фиксировали животное, выстригали шерсть на спине, производили 2 параллельных разреза кожи до подкожной клетчатки. Раны зашивали рядом узловых швов (шелк №3) с расстоянием между стежками в 5 мм. На раны животных подопытных групп ежедневно наносили по 0,2 г исследуемых мазевых композиций. В контрольной группе обработку ран производили мазевой основой, взятой в эквивалентном количестве.

Влияние на заживление линейных асептических ран кожи изучено ранотензиометрическим методом [11]. Определяли силу разрыва рубца на 7 сутки после операции в опытных и контрольной группах с помощью специального прибора, разработанного Горбуновым С.М. [12]. Ранозаживляющее действие оценивали по изменению силы разрыва послеоперационного рубца по сравнению с контролем. Результаты обрабатывали статистически с вычислением критерия Фишера – Стьюдента. Эффект считали достоверным при $P < 0,05$.

Из таблицы видно, что образцы ННМ, АВТ-5, АВТ-5-140-150, АВТ-5-140-150ДА, АВТ-5-140-150ИН, оказывают ранозаживляющее действие при поверхностном применении на модели асептической линейной раны кожи. Прочность послеоперационного рубца достоверно увеличивалась по сравнению с контролем от 10,9 до 46,4%.

Таблица – Ранозаживляющая активность 10% мазевых композиций

№ группы	Объект исследования	Сила разрыва рубца на 7сутки, г	P, по сравнению с контролем	P, по сравнению с основой	Изменение силы рубца по сравнению с контролем, %
1	ННМ	545,2±66,0	>0,05	<0,05	+10,93
2	НРМ	562,0±59,8	<0,05	<0,05	+14,34
3	АВТ-5	555,0±82,3	>0,05	<0,05	+12,92
4	АВТ-5-150-160	426,3±36,4	<0,05	>0,05	-13,27
5	АВТ-5-150-160ДА	573,6±58,4	<0,05	<0,05	+16,70
6	АВТ-5-150-160АР	482,0±104,3	>0,05	>0,05	-1,93
7	АВТ-5-140-150	543,8±33,8	<0,05	<0,05	+10,64
8	АВТ-5-140-150ДА	519,3±54,0	>0,05	<0,05	+5,66
9	АВТ-5-140-150ИН	518,3±50,0	>0,05	<0,05	+5,45
10	АВТ-5-130-140	719,3±68,1	<0,05	<0,05	+46,35
11	АВТ-5-130-140ДА	395,7±25,3	<0,05	<0,05	-19,49
12	АВТ-5-130-140ИН	479,6±12,6	>0,05	<0,05	-2,42
13	АВТ-5-120-130	648,0±63,7	<0,05	<0,05	+31,84
14	АВТ-5-120-130ИН	568,5±65,9	<0,05	<0,05	+15,66
15	Основа	447,3±30,2	<0,05	-	-8,99
16	Контроль	491,5±31,3	-	<0,05	-
17	Бепантен	645,2±34,9	-	-	-
18	Левомеколь	548,2±24,2	-	-	-

Нефть нафталанского и русского месторождений действуют на уровне препаратов сравнения.

Обработка ран композициями АВТ-5-150-160ДА, АВТ-5-130-140, АВТ-5-120-130, АВТ-5-120-130ИН достоверно увеличивала прочность рубца на разрыв не только по сравнению с контролем, но и с основой.

Половина исследуемых образцов превосходят по ранозаживляющему действию «Левомеколь». Фракции АВТ-5-130-140 и АВТ-5-120-130 достоверно увеличивают силу разрыва рубца по сравнению с известным препаратом «Бепантен».

На основании проведенных исследований сделаны следующие выводы:

1. Исследуемые образцы проявляют высокую ранозаживляющую активность.
2. В результате исследования выявлено, что мазевые композиции, содержащие светлые нефтепродукты, превосходят по ранозаживляющему действию нефти нафталанского и русского месторождений.

3. Наибольшее ранозаживляющее действие выявлено у мазевых композиций на основе фракций АВТ-5-150-150ДА, АВТ-5-130-140, АВТ-5-120-130, АВТ-5-120-130ИН. Они рекомендуются для дальнейших углубленных исследований в медицине и ветеринарии.

Библиографический список

1. Егоров К.А. Нафталан (лечебное применение). – Баку, 1941. – 68 с.
2. Мамедалиев Ю.Г. К теории механизма действия нафталанской нефти // Известия Академии наук СССР. – 1946. – № 5. – С. 560.
3. Гутыря В.С. Нефти Азербайджана. – Баку: Азнефтеиздат, 1945. – 30 с.
4. Мурадов А.Н. Исследование химического состава лечебных нафталанской нефти: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Баку, 1979. – 26 с.
5. Мурадов А.Н. Синтез биологически активных веществ на основе лечебной нафталанской нефти // Sciences of Europe. – 2021. – № 82-1. – С. 31–33.
6. Мурадов А.Н. Синтез биологически активных веществ на основе лечебной нафталанской нефти // Инновации в современной науке: материалы Междунар. науч.-практ. конф. / Махачкалинский центр повышения квалификации. – Махачкала, 2014. – С. 169–173.
7. Антипина, М.И., Нестеров И.И. Анализ состава и подсчет запасов и ресурсов особо ценных компонентов в нефтеносных нефтях Западной Сибири // ГеоЕвразия 2018. Современные методы изучения и освоения недр Евразии: труды междунар. геолого-геофизической конф. – Москва: ООО "ПолиПРЕСС", 2018. – С. 300-302.
8. Выделение адамантановых углеводородов из нефти сеноманских отложений русского месторождения / О. Н. Бакланова, А. В. Лавренов, В. А. Каширцев [и др.] // Нефтехимия. – 2016. – Т. 56. – № 2. – С. 115.
9. Тяжелая нефтяная нефть русского месторождения: новые возможности квалифицированной переработки / О. Н. Бакланова, А. В. Лавренов, В. А. Каширцев [и др.] // "Перспективные материалы с иерархической структурой для новых технологий и надежных конструкций" и "Химия нефти и газа" в рамках междунар. симпозиума "Иерархические материалы: разработка и приложения для новых технологий и надежных конструкций": тезисы докладов междунар. конф.– Томск: Издательский дом Томского государственного университета, 2018. – С. 689.
10. Альтернативные лекарственные средства из природных углеводородов / Балыева А.А., Олькова А.С., Баньковская Е.В., Кудинов А.В., Чащина С.В. // Вестник ПНИПУ. Химическая технология и биотехнология. – 2022. – № 2. – С. 99-108.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств /под ред. Миронова А.Н. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
12. Горбунов С.М., Заиконникова И.В., Абдрахманова Н.Г. Устройство для определения прочности на разрыв заживающих ран // Фармакологическая регуляция регенераторных процессов в эксперименте и клинике. – Йошкар-Ола. – 1979. – С.100–104.

УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ В РАЙОНАХ АНОМАЛЬНЫХ ГАЗОВЫХ ПОЛЕЙ

Пономарева А.Л., Полоник Н.С.

Тихоокеанский океанологический институт ДВО РАН, Владивосток, Россия

Аннотация. С использованием методов хроматографического анализа и распространения генов *alkB* проведена оценка углеводородокисляющего потенциала микробиоты донных осадков на двух полигонах в Японском море: южный полигон – в районе северного замыкания Центральной котловины Японского моря, и северный – в южной части Татарского отрога. На южном полигоне деструкция насыщенных УВ коррелирует с обнаружением генов *alkB1* и *alkB2*, а на северном – с *alkB2*. На обоих полигонах в наименьшей степени происходит биodeградация УВ с длиной углеродной цепи от C₁₃ до C₂₀. На большинстве станций северного полигона выражена биodeградация углеводородов с длиной цепи более 20 атомов углерода, тогда как на южном полигоне наблюдается обратная тенденция. Полученные результаты позволяют высказать предположение о возможности находок газогидратов на северном полигоне и традиционных углеводородных залежей на южном полигоне.

Ключевые слова: биологическое окисление углеводородов, микробиота, донные осадки, Японское море.

HYDROCARBON OXIDIZING POTENTIAL OF BOTTOM SEDIMENTS OF THE SEA OF JAPAN IN THE REGIONS OF ANOMAL GAS FIELDS

Ponomareva A. L., Polonik N. S.

Pacific Oceanological Institute V. I. Il'ichev of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

Abstract. Using the methods of chromatographic analysis and distribution of the *alkB* genes, the hydrocarbon-oxidizing potential of the microbiota of bottom sediments was assessed at two polygons in the Sea of Japan: the southern polygon, in the area of the northern closure of the Central Basin of the Sea of Japan, and the northern one, in the southern part of the Tatar spur. In the southern polygon, the destruction of saturated hydrocarbons correlates with the detection of the *alkB1* and *alkB2* genes, and in the northern one, with *alkB2*. At both sites, biodegradation of hydrocarbons with a carbon chain length from C₁₃ to C₂₀ occurs to the least extent. At most stations of the northern polygon, the biodegradation of hydrocarbons with a chain length of more than 20 carbon atoms is pronounced, while the reverse trend is observed at the southern polygon. The results obtained allow us to suggest the possibility of finding gas hydrates in the northern range and traditional hydrocarbon deposits in the southern range.

Keywords: biological oxidation of hydrocarbons, microbiota, bottom sediments, Sea of Japan.

Состав и соотношение углеводов, поднимающихся на поверхность в районах разгрузки газовых и нефтяных месторождений, изменяется под действием углеводородоксиляющего бактериального фильтра. Изучение его активности и видового разнообразия позволяет с высокой чувствительностью выявить микроколичества углеводов. Алкангидроксилазы являются наиболее распространенным классом ферментов, участвующих в деградации алканов, которые представлены в различных видах бактерий, грибов, дрожжей и водорослей [1]. Alk-гены определяющие синтез алкангидроксилаз обеспечивающих деградацию коротко- и длинноцепочечных алканов. *alkB* имеются у микроорганизмов, деградирующих короткоцепочечные алканы (C₆–C₁₂). *alkB2* разрушают алканы с длиной цепи C₁₂–C₂₀, *alkB3* разрушают алканы с длиной цепи более C₂₀.

Районом исследования являлась малоизученная часть северная часть Японского моря на двух полигонах: южный полигон – район северного замыкания Центральной котловины Японского моря и, северный – в южной части Татарского трога в 81 рейсе НИС "Академик М.А. Лаврентьев" в мае 2018 г. Одним из наиболее интересных объектов исследования морей Дальнего Востока являются территории крупнейшей Охотоморской нефтегазовой провинции, которую отличает большое количество нефтегазовых и газоконденсатных месторождений и трога Татарского пролива Японского моря с потоками метана и газогидратами в донных осадках западного Сахалинского склона [2, 3]. Отбор донных осадков выполнен с помощью трубчатого пробоотборника – геологической трубкой.

Для исследования способности к биodeградации углеводов нефти из 0.1г окисленного слоя донных отложений создавалась накопительная культура на среды Ворошиловой–Диановой на основе искусственной морской воды, в которой единственным источником углерода являлась нефть (содержание в среде 4 %). В течение 3 месяцев проводилась инкубация при температуре, соответствующей температуре в месте отбора, в диапазоне от +2 до +5 °С. После инкубирования образцы нефти исследовались методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС).

Хромато-масс-спектрометрический анализ проводили на хромато-масс-спектрометре Shimadzu GCMS 2010 Ultra. Разделение компонентов осуществлялось на капиллярной колонке Ultra ALLOY-5 MS/HT (FrontierLab., Япония; длина – 30 м, толщина фазы – 0.25 мкм, диаметр – 0.25 мм, фаза – 5% дифенил 95% диметилполисилоксан). В качестве газа-носителя использовался гелий марки 6.0. Растворенный в хлороформе образец (1 мкл) вводился в инжектор, нагретый до температуры 230°C (режим – splitless). Линейная скорость газа-носителя – 40 см/с, начальное давление газа – 66 кПа. Образцы хроматографировали в следующем режиме: изотермически в течение 7 мин при 40°C, при градиенте температуры от 40 до 270°C со скоростью нагрева 4°C/мин, затем изотермически в течение 20 мин при 270°C. Температура ионного источника – 200°C, температура интерфейса масс-спектрометра – 270°C. Диапазон сканирования масс-спектрометра – от 35 до 600 а.е.м с ионизацией электронным ударом при 70 эВ.

Масс-фрагментограммы регистрировались по полному ионному току. Интерпретацию органических соединений проводили на основе сопоставления полученных масс-спектров с масс-спектрами соединений из библиотеки NIST 08. Расчет и интерпретация геохимических коэффициентов проводились после внутренней нормализации масс-фрагментограмм по полному ионному току (TIC) [4].

Детекцию генов проводили с использованием суммарной ДНК, выделенной из окисленного слоя отложений, были поставлены ПЦР с праймерами к генам *alkB*, *alkB2*, *alkB3*. Наличие ПЦР-продукта определяли электрофоретически [5, 6, 7].

Кроме этого из накопительной культуры выделяли чистые культуры нефтеокисляющих микроорганизмов и проводили их идентификацию классическими методами с подтверждением ПЦР.

Для статистической обработки экспериментальных данных использовалась среда программирования R (версия 3.1.0); соответствие выборок закону нормального распределения проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка; для визуализации распределения величин в выборках применялся графический метод боксплотов.

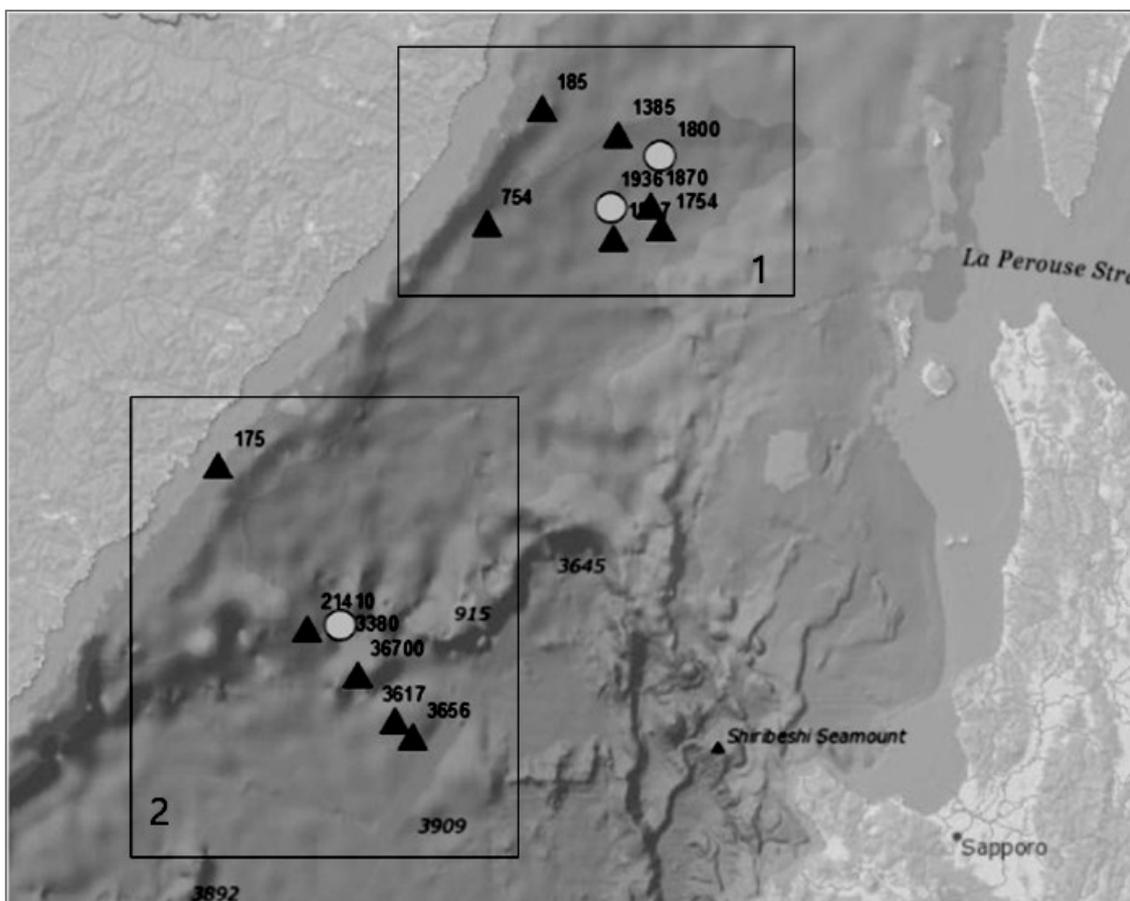
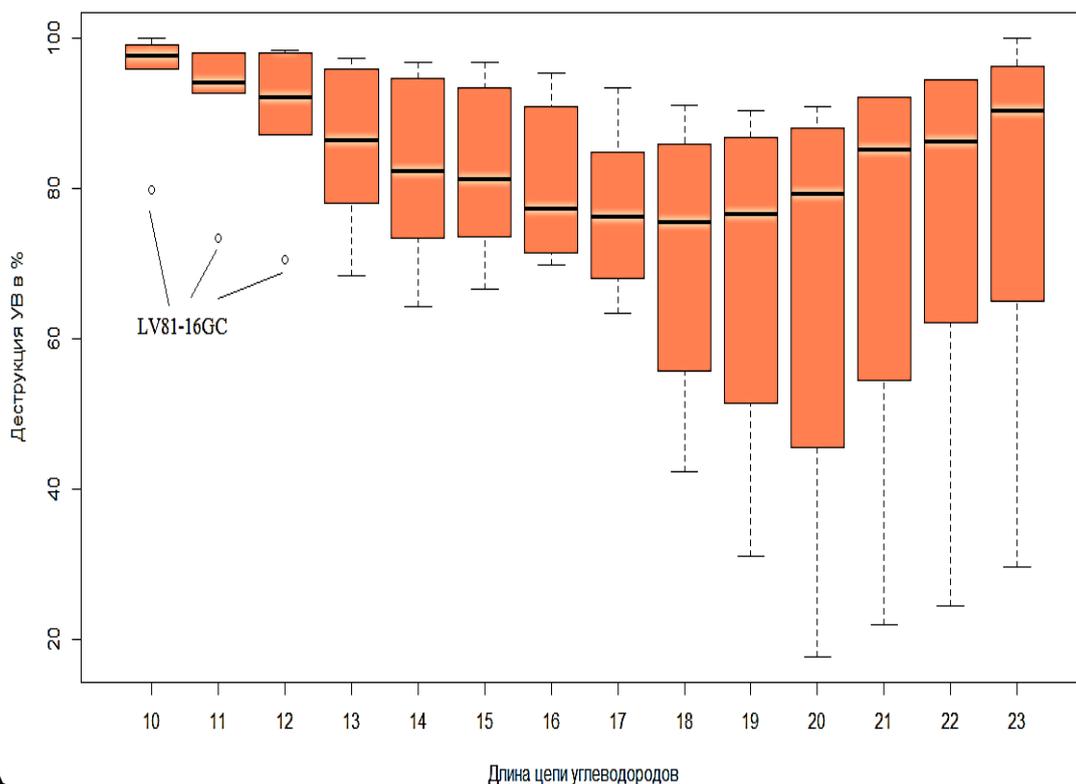


Рисунок 1 – Район исследования. Условные обозначения. Кружками обозначены станции, в которых интенсивность биодеградации УВ была снижена. Цифрами указана глубина пробоотбора (1 – Северный полигон, 2 – Южный полигон).

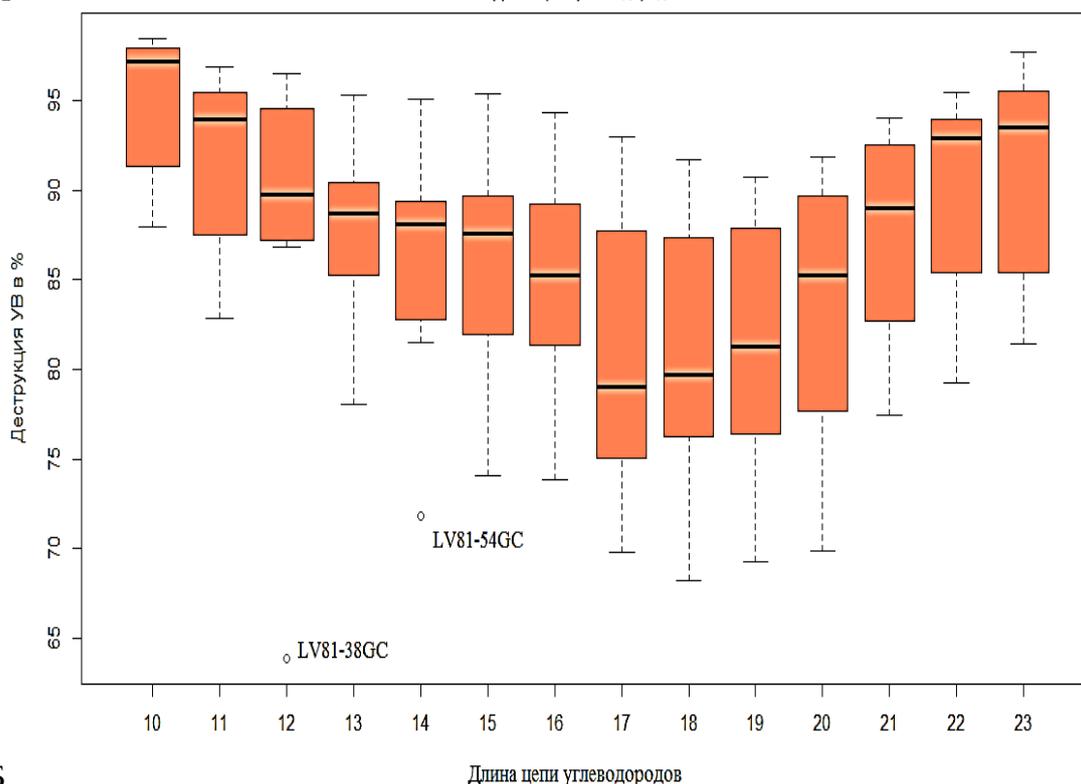
На южном полигоне нефтеокисляющие микроорганизмы, в основном представленные родами *Sporosarcina* ssp., *Micrococcus* ssp., *Bacillus* ssp, являющиеся факультативными анаэробами. А на северном – родами *Streptomyces* ssp., *Actinomyces* ssp. и нокардиоморфными бактериями.

Как на южном, так и на северном полигонах в наименьшей степени происходит биодеградация УВ с длиной углеродной цепи от C_{13} до C_{20} . В наибольшей степени утилизируются самые короткие УВ с длиной углеродной цепи от C_{10} до C_{12} .

На северном полигоне, на большинстве станций, выражена биодеградация УВ с длиной углеродной цепи $> C_{20}$, а на южном, наблюдается обратная тенденция (Рис. 2).



А



Б

Рисунок 2 – Интенсивности биодegradации углеводородов нефти (%) на южном (А) и северном полигоне (Б).

Во всех исследованных станциях на южном полигоне значения показателя $(C_{12}+C_{16})/(C_{20}+C_{23})$ было ниже исходного, а на северном полигоне только на 2 из 8. В одной станции (LV81-16 GC) на южном полигоне и на двух (LV81-38 и 54GC) – на северном наблюдается снижение интенсивности биодegradации легких углеводородов. Кроме этого

станция LV81-16 GC деструкция длинноцепочечных УВ по сравнению с короткоцепочечными УВ выражена в максимальной степени, находится на южном полигоне, на ней этот показатель равен 13.12. В исходной нефти данный показатель составляет 2.42.

Pr/Ph отношение является одним из наиболее часто используемых корреляционным параметром, который используют в качестве индикатора условий осадконакопления [4]. Известно, что в окислительных условиях из фитола образуется преимущественно пристан (Pr), в восстановительных – фитан (Ph). Поэтому отношение Pr/Ph можно использовать для оценки окислительно – восстановительного потенциала среды. Соотношение фитан/пристан Pr/Ph на одной станции на южном полигоне (LV81-16 GC), и на двух на северном (LV81-33 и 54GC) превышает контрольные значения (1.03, 1.22, 1.05 и 0.98, соответственно), на остальных станциях значения остаются близкими к контрольным.

В среднем, интенсивность деструкции на южном полигоне выше, чем на северном. В результате процессов биодегградации происходит увеличение доли четных УВ по сравнению с нечетными на всех изученных станциях. Частота встречаемости генов *alkB* сразу всех трех групп в образцах суммарной ДНК из Южного полигона составила 16.7%, в Северном – 4%. На южном полигоне деструкция насыщенных УВ коррелирует с обнаружением генов *alkB1* и *alkB2*, а на северном – с *alkB2*.

Таким образом, на южном полигоне микробиота склонна к биодегградации наиболее легкоокисляющихся УВ. Низкая относительно южного полигона частота встречаемости генов типа *alkB*, и усиление дегградации длинноцепочечных насыщенных УВ на северном полигоне, также указывает на то, что в этом районе распространены гены, кодирующие альтернативные ферменты, которые участвуют в высокоселективной деструкции n-алканов с длиной углеродной цепи > C₂₀, например, *rubA*, *CYP153*, *LadA* и т.д [7]. Поэтому можно предположить, что на северном полигоне сообщества нефтеокисляющих микроорганизмов более высокоспециализированное и основано на источнике углеводов с высокой долей длинноцепочечных УВ.

Полученные результаты являются важными для исследования потенциала районов исследования на поиски газогидратов (северный полигон) и традиционных углеводородных залежей (южный полигон).

Работа выполнена в рамках государственного задания «Исследование состояния и изменений природной среды на основе комплексного анализа и моделирования гидрометеорологических, биогеохимических, геологических процессов и ресурсов Дальнего Востока», (0211-2021-0012).

Библиографический список

1. van Beilen J. Alkane hydroxylases involed in microbial alkane degradation. van Beilen J., Funhoff R. / Appl. Microbial Biotech, Vol. 74. – 2007 – P.13-21.
2. Ломтев В.В. Тектонические аспекты коровой сейсмичности Сахалина Ломтев В.В., Никифоров С.П., Ким Чун Ун / Вестник ДВО РАН. 2007. № 4. С. 64-71
3. Харахинов В.В. Нефтегазовая геология Сахалинского региона. М.: Науч. мир, 2010. 276 с.
4. Peters K., Walters C., Moldowan, J. The Biomarker Guide: Biomarkers and isotopes in petroleum systems and Earth history, Vol. 2, 2nd edition: Cambridge university press, New York – 2005 – 698 p.

5. Sazykina I. S. Chemiluminescence Analysis of Oil Oxidizing Bacteria *Actinetobacter calcoaceticus* Extracts: Effects of the Extracts on pSoxSlux Biosensor. I. S. Sazykina, V. N. Prokofieva, V. A. Chistyakova, M. A. Sazykinaa and V. V. Vnukovb // *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2011, Vol. 47, No. 4, pp. 400–404
6. Sei K. Development and application of PCR primers for monitoring alkane-degrading bacteria in seawater microcosm during crude oil degradation process. K. Sei, K. Mori, T. Kohno, H. Maki // *Journal of Chemical Engineering of Japan*. – 2003. – Vol. 36, № 10. – P. 1185-1193
7. Турова Т.П., Соколова Д.Ш., Семенова Е.М., Шумкова Е.С., Коршунова А.В., Бабич Т.Л., Полтараус А.Б., Назина Т.Н. Детекция генов деградации алканов *alkB* и *ladA* у термофильных углеводородокисляющих бактерий родов *Aeribacillus* и *Geobacillus* // *Микробиология*. – 2016. – Т. 85, № 6. – С. 676-692

ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРАЛЬНЫХ ИНДЕКСОВ ШЕРШНЕВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА

Прокопенко Д.П., Кравцова А.В.

Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

Аннотация. В исследовании представлен анализ возможности использования спектральных индексов NDCI, MNDWI для мониторинга экологического состояния Шершневого водохранилища г. Челябинска. Определены значения индексов за вегетационный период 2018-2021 гг. на основе спутниковых снимков, сделанных в различных спектрах излучения. Спектральные индексы рассчитаны с использованием геоинформационной программы QGIS. Получены картографические изображения индексов, их пространственно-временные распределение для Шершневого водохранилища.

Ключевые слова: спектральный индекс, NDCI, MNDWI.

CHARACTERISTICS OF THE SPECTRAL INDICES OF THE SHERSHNEVSKY RESERVOIR

Prokopenko D. P., Kravtsova A. V.

Chelyabinsk State University, Russia, Chelyabinsk

Abstract. The study presents an analysis of the possibility of using spectral indices NDVI, MNDWI for monitoring the ecological state of the Shershnevsky reservoir in Chelyabinsk. The values of the indices for the growing season 2018 – 2021 were determined on the basis of satellite images taken in various radiation spectra. Spectral indices are calculated using the geoinformation program QGIS. Cartographic images of the indices and their spatial-temporal distribution for the Shershnevsky reservoir were obtained.

Keywords: spectral index, NDVI, MNDWI.

Введение

Одним из современных дистанционных методов экологического мониторинга является расчёт спектральных индексов – это показатели, характеризующие изменение спектральной плотности потока излучения (кривой спектральной отражательной способности) объекта с изменением частоты. Данный метод позволяет оперативно получить информацию о состоянии отдельных компонентов природной среды на территории и оценить пространственно-временную динамику изменений в окружающей среде.

Актуальность и значимость исследования обусловлена статусом Шершневого водохранилища, которое является единственным источником хозяйственно-питьевого

водоснабжения г. Челябинск и населённых пунктов в его окрестностях. Для водного объекта ежегодно регистрируется массовое «цветение» фитопланктона, и способствующее изменению качества воды в водоёме [2].

Цель исследования: определить спектральные характеристики поверхности акватории Шершневского водохранилища.

Задачи:

1. Овладеть методикой расчёта спектральных индексов MNDWI и NDCI по космическим снимкам с помощью программы QGIS;
2. Рассчитать значения и проанализировать полученные результаты спектральных индексов MNDWI и NDCI Шершневского водохранилища за вегетационный период 2015-2021 гг.

Материалы и методы

Материалами для исследования послужили космоснимки со спутников Sentinel-2 и Landsat-8 за вегетационный период 2015-2021 гг., полученные с сайта EarthExplorer. В работе представлен расчет и оценка 2 спектральных индексов.

Модифицированный нормализованный разностный водный индекс (Modified normalized difference water index – MNDWI) – алгоритм выделения водной поверхности, отлично определяющий разницу значений вдоль береговой линии. Выходной растр имеет значения в промежутке [-1; 1], значения воды принимаются больше 1. MNDWI является отношением разности зелёного (520-600 нм) и коротковолнового инфракрасного (900-1700 нм) спектра излучения к сумме этих показателей [1].

Нормализованный разностный индекс хлорофилла «а» (Normalized difference chlorophyll index – NDCI) – алгоритм отражает содержание хлорофилла «а» в растениях, позволяющий пространственно определить зарастание водоёма. NDCI является отношением разности коэффициентов спектральной яркости на пиках поглощения (705 нм) и отражения (665 нм) хлорофилла «а» к сумме этих показателей [3]. Вычисления индекса и визуализация проводились в программе QGIS.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что за весь вегетационный период 2015 – 2021 гг. спектральный индекс MNDWI в основном принимает положительные значения и колеблется в диапазоне от 0,08 до 0,63. При этом основная часть значений индекса находится в интервале 0,08-0,2. Положительные значения свидетельствуют о наличии воды, поскольку данный индекс отлично определяет разницу значений вдоль береговой линии и однородные площади (водное зеркало). Индекс MNDWI позволяет выделить более четко водные границы Шершневского водохранилища и подтвердить, что заболоченные участки, заросшие макрофитами на западном берегу и речном плёсе, являются частью водоема, а не прибрежной территорией.

Спектральный индекс – NDCI за тот же период вегетации имеет как положительные, так и отрицательные значения. Положительные значения индекса свидетельствуют о наличии процессов эвтрофирования водоёма, т.е. указывают на увеличение количества хлорофилла «а», а, следовательно, численности и биомассы фитопланктона в водохранилище. Отрицательные значения, наоборот, свидетельствуют о меньшей степени проявления процессов фотосинтеза. Значения индекса колеблются в диапазоне от -0,46 до 0,22 за весь исследуемый период. Среднее значение составляет -0,05.

Большая часть акватории водоёма имеет одинаковое значение индекса на протяжении всего вегетационного периода. Однако можно выделить некоторые участки, где значения индекса увеличивается, это указывает на увеличение концентрации хлорофилла «а» в этих зонах, что, в свою очередь, свидетельствует о формировании зон цветения на водоёме. Такими зонами в Шершневском водохранилище, в основном, являются участки речного плёса и вблизи западного берега.

Спектральные индексы позволяют выявить пространственно-временные закономерности негативных экологических процессов, происходящих в Шершневском водохранилище – эвтрофикацию и заболачивание берегов. Полученная информация может быть использована для проведения природоохранных мероприятий для улучшения качества воды питьевого водохранилища г. Челябинска.

Результаты

Таблица 1 – Значения спектральных индексов MNDWI и NDCI Шершнёвского водохранилища за 2018 – 2021гг.

Дата снимка	MNDWI	NDCI
16.09.2018	0,14	-0,58
12.09.2019	0,14	0,06

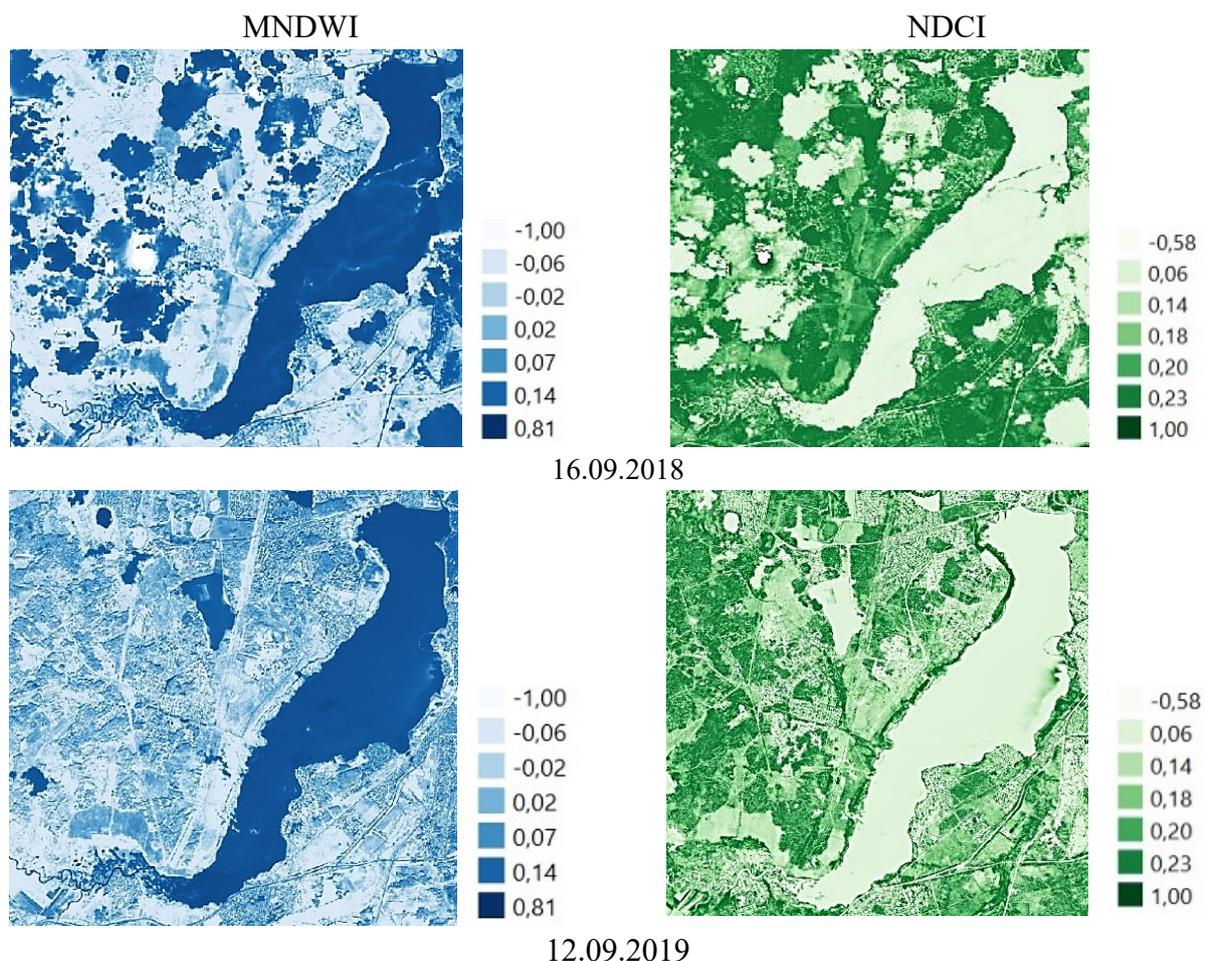


Рисунок 1 – Сравнительная характеристика пространственного распределения значений спектральных индексов MNDWI и NDCI.

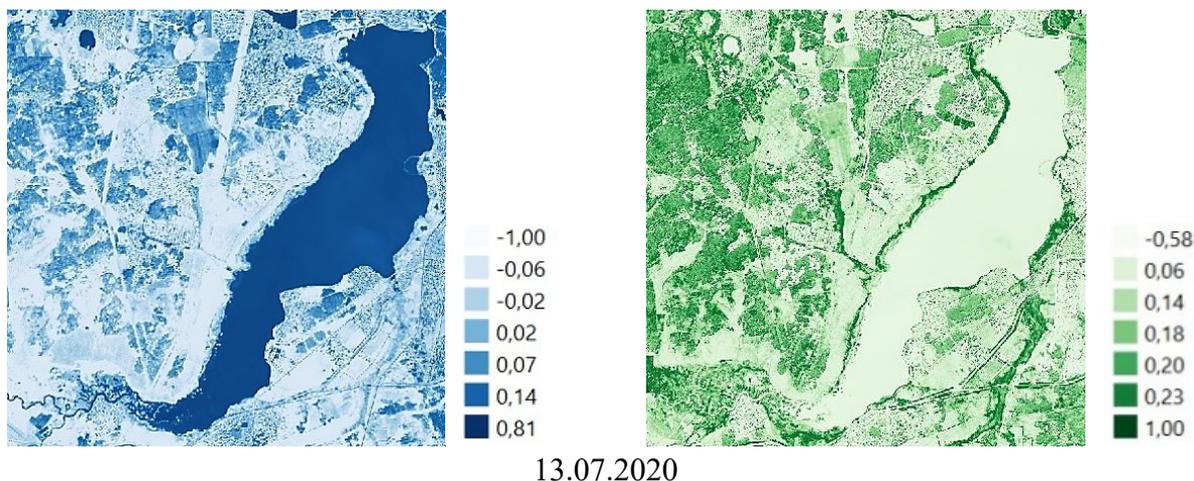


Рисунок 2 – Сравнительная характеристика пространственного распределения значений спектральных индексов MNDWI и NDCI (13 июля 2020 г.)

Выводы

За вегетационный период 2015 – 2021 гг.:

- 1) Основная часть значений спектрального индекса MNDWI составляет 0,14.
- 2) Основная часть значений спектрального индекса NDCI составляет – 0,58
- 3) Оба индекса отвечают за разные процессы, происходящие в водоёме, и, следовательно, используются для разных целей исследования.

Библиографический список

1. Васильченко А.А. Анализ основных методов выделения водного зеркала с помощью спектральных данных ДЗЗ // Грани познания. – 2021. – № 2 (73). – С. 4 – 8. – URL: http://grani.vspu.ru/files/publics/_1620212248.pdf (дата обращения 18.03.2022). Режим доступа: Научная электронная библиотека Elibrey.
2. Кравцова А.В. Особенности многолетней динамики развития гидрохимических показателей воды Шершневого водохранилища // Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление. – 2021. – № 5. – С. 8 – 28. – URL : <https://cyberleninka.ru/article/n/osobennosti-mnogoletney-dinamiki-razvitiya-gidrohimicheskikh-pokazateley-vody-shershnevskogo-vodohranilischa> (дата обращения 13.04.2022). Режим доступа: Научная электронная библиотека КиберЛенинка.
3. Лагута А.А. Пространственно-временная изменчивость концентрации хлорофилла «а» в Краснодарском водохранилище по данным спутниковых снимков // Водное хозяйство России: проблемы, технологии, управление. – 2021. – № 4. – С. 67 – 84. – URL : <https://waterjournal.ru/files/wj/1630485157.pdf> (дата обращения 27.03.2022). Режим доступа: Научная электронная библиотека Elibrey.

ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ОЧИСТКИ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ БУРОВЫХ ШЛАМОВ ПРИ ПОМОЩИ НЕМАТОДЫ *TURBATRIX ACETI*

Рожин А.О., Фахруллина Г. И., Ишмухаметов И. Р., Ахатова Ф.С.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. В настоящей работе приводится исследование выживаемости и нефтеструктивной деятельности нематод *Turbatrix aceti* в жидких и твердых средах, содержащих компоненты нефтесодержащих буровых шламов для выяснения перспектив их промышленного применения.

Ключевые слова: буровой шлам, биоремедиация, *Turbatrix aceti*, нефтеструкция.

INVESTIGATION OF THE PROSPECTS OF THE PURIFICATION OF OIL-CONTAINING DRILLING MUD USING THE NEMATODE *TURBATRIX ACETI*

Rozhin A. O., Fakhrullina G. I., Ishmukhametov I. R., Akhatova F.S.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. This paper presents a study of the survival and oil-destructive activity of *Turbatrix aceti* nematodes in liquid and solid media containing components of oil-containing drilling mud to clarify the prospects for their industrial application.

Keywords: drilling mud, bioremediation, *Turbatrix aceti*, oil destruction.

Введение. Одним из важнейших природных ресурсов, добываемых на территории России, являются нефтепродукты. Обеспечение бесперебойной и высокотехнологичной добычи нефти является ключевой задачей, без выполнения которой невозможно существование промышленности и энергетики. Но добыча нефти сопряжена с рисками загрязнений природной среды в местах бурения и переработки, а также по пути ее транспортировки. Постоянно актуален вопрос снижения токсичности и утилизации отходов нефтедобычи, таких, как буровые растворы и шламы, в которых для улучшения технологических свойств применяются функциональные добавки, часто являющиеся токсичными [1]. Оставшийся после бурения обводненный шлам является постоянным фактором загрязнения окружающей среды [2]. Поиск способов его очистки является актуальной задачей. Одним из наиболее эффективных и технически простых методов снижения токсичности нефтепродуктов является биоремедиация [3]. Отмечалось, что нематоды, или круглые черви, могут представлять идеальных кандидатов для исследований деградации почвенных углеводородов [4]. В данном исследовании была поставлена задача изучения способов биоремедиации нефтесодержащих буровых шламов с месторождений республики Татарстан при помощи нематод.

Нематоды – одна из наиболее широко распространенных и многочисленных групп животных. Данная группа организмов освоила широкий диапазон сред обитания, в том числе все типы почв: от торфяников тундры до песков пустынь. Нематоды способны переносить длительное воздействие неблагоприятных факторов окружающей среды в неактивном состоянии [5]. Нематода *Turbatrix acetii*, или уксусная угрица, – вид свободноживущих круглых червей, который обитает в бродящем уксусе и крахмальном клейстере, где питается дрожжами и бактериями. Этот вид является хорошим модельным объектом для тестирования токсинов на популяции червей из-за их оптической прозрачности тела и устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды, что обусловило его выбор для исследований.

Методика. В лабораторных условиях *T. acetii* культивировали совместно со стрептомицин-устойчивой культурой бактерий с культурой *Escherichia coli* OP50. Бактерии *E. coli* инкубировались отдельно, при постоянном перемешивании на шейкере-инкубаторе в течение ночи при температуре 37°C в жидкой питательной среде NB с добавлением антибиотика стрептомицина. Трижды центрифугированные и промытые от среды и метаболитов бактериальные суспензии оптической плотностью 0.8-1 единиц помещались в стерильную пробирку, где хранились при температуре 4 °C и использовались для кормления червей, которых выращивали на агаризованных твердых средах в чашках Петри. Предварительно горячую твердую среду NGM заливали в чашки Петри диаметром 90 мм, ждали, когда она затвердеет и засеивали бактериальной суспензией, в качестве питательного субстрата. Выращивали бактериальный газон в течение 24 часов при 37 °C, после чего проводилось пересаживание нематод со старых и переполненных на свежеприготовленные чашки посредством переноса при помощи металлического шпателя агаровых блоков размером 10x10 мм на свежую среду. Нематоды выращивались при комнатной температуре 25 °C в затемненном месте.

Для выяснения биоремедиационного потенциала круглых червей *T. acetii* был проведен эксперимент по их культивированию в жидких средах. Изучались три варианта жидких сред: среда NB, в которой происходит культивирование бактерии *E. coli*, которой питаются нематоды, среда MB, соленый морской бульон, который наиболее близок по составу к солесодержащему буровому шламу, и стерильная дистиллированная вода. В эти среды были стерильно добавлены образцы буровых шламов в соотношении 1:3 (образец/среда). Смешивание происходило в конических колбах на 100 мл, объем содержимого – 30 мл. В каждую колбу при помощи дозатора на 1 мл было добавлено примерно по 500 разновозрастных особей *T. acetii* после недельной культивации. Запечатанные колбы хранились в темноте при комнатной температуре в течение недели. Таким образом определялась возможность нематод выдерживать, во-первых, неблагоприятные кислородные условия в толще жидкости, во-вторых, токсическое действие буровых шламов и, в-третьих, отсутствие питательного компонента в виде бактерий. Предполагалось, что некоторые прошедшие через пищевод нематод бактерии *E. coli* могли бы выжить и размножиться в среде NB и стать возможным источником питания для червей. Вариант с раствором образцов в дистиллированной воде предполагался наиболее жестким вариантом эксперимента, наиболее приближенный к реальным условиям применения в дальнейшем. После недельной культивации содержимое колб отбиралось дозатором, переливалось в чашки Петри и рассматривалось при помощи стереоскопического микроскопа. Производился подсчет живых и мертвых особей во всех вариантах.

Кроме того, для визуализации процессов разложения нефтяного компонента бурового шлама был проведен эксперимент с *T. acetii*, культивируемыми в твердых средах с

содержанием компонентов буровых шламов. Твердые среды для опытов были приготовлены описанным ранее образом, используя 30 мм чашки Петри с агаром NGM. На поверхность охлажденного агара стерильно добавлялось по 50 мкл образцов буровых шламов из двух разных фракций – из осадка и из надосадочной жидкости. На некоторые чашки, в зависимости от варианта эксперимента, добавлялось по 100 мкл инокулята ночной культуры морской нефтеразлагающей бактерии *Alcanivorax borkumensis*, либо непосредственно в день эксперимента, либо за 24 часа до добавления нематод. На некоторые чашки добавлялось по 5 мкл смыва с чашек Петри, содержащего от 10 до 150 разновозрастных нематод *T. aceti*. Экспериментальные чашки Петри выдерживались в комнатной температуре в темноте в течение недели, подсчет численности живых особей и визуализация разрыхляющего эффекта проводились на 2, 3, 6 и 10 день эксперимента при помощи стереомикроскопа.

Результаты. Спустя 7 дней после начала культивации нематод в конических колбах с жидкими средами NB, MB и dH₂O проводился подсчет живых особей во всех вариантах, при помощи стереомикроскопа. Общий вид полей зрения приведен на Рисунке 1. В результате было установлено следующее:

1. В среде NB (Nutrient Broth) с буровыми шламами живых особей было найдено не было;
2. В среде MB (Marine Broth) со шламами были найдены редкие живые слабоактивные экземпляры, общее количество которых не превышает 4%;
3. В дистиллированной воде со шламами количество живых и активных особей было не менее 90%, причем была видна молодежь, что говорит о сохранении репродуктивной способности.

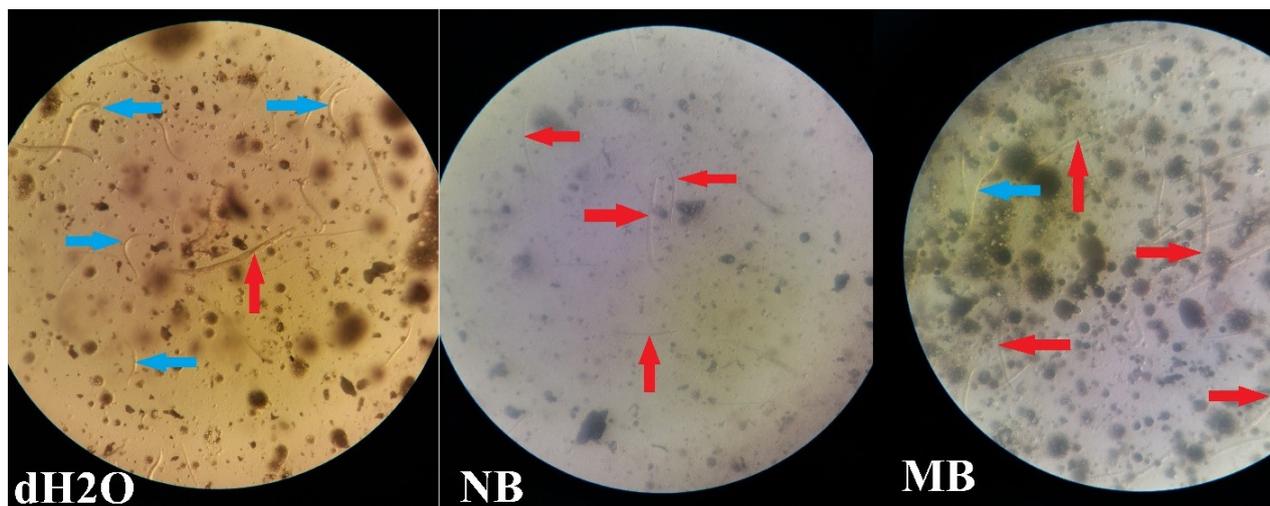


Рисунок 1 – Микроскопические изображения живых и мертвых нематод *T. aceti* после недельной культивации в различных жидких средах с добавлением буровых шламов. Красными стрелками обозначены мертвые особи, синими – живые.

Такой результат был неожиданным, его можно объяснить только слабой приспособленностью нематод к специфическим компонентам жидких бактериальных сред.

При этом, самая простая рецептура, разбавление шламов водой, обеспечивала выживание нематод в течение недели, что говорит об их хорошем потенциале при промышленном использовании в дальнейшем. Причем питательного компонента в виде бактериальной биомассы в опыте было добавлено не было, что позволяет говорить о том, что постоянного добавления питательного компонента для червей в промышленных условиях может не потребоваться.

Далее, после 10-дневной культивации нематод на твердых средах с добавлением компонентов буровых шламов была подсчитана численность особей в каждой чашке Петри. Усредненные данные по динамике численности приведена на Рисунке 2. Как видно из графика, в присутствии буровых шламов численность нематод росла во всех рассматриваемых случаях, в том числе без добавления бактерий. Из графика можно выделить две закономерности. Во-первых, численность нематод растет медленнее всего в вариантах без подкормки бактериями. Во-вторых, в присутствии надосадочной жидкости численность *T. aceti* растет лучше, чем в присутствии осадка. Это можно связать как с предположительно меньшей токсичностью надосадочной жидкости, в сравнении с осадком, так и с большим содержанием в ней нефтепродуктов, служащих питательной средой для бактерий *A. borkumensis*, которой в дальнейшем питаются нематоды. Что касается времени добавления бактерий, то здесь эффект неочевиден, поэтому подтвердить необходимость проращивания бактериального газона для питания заранее в данных условиях не удалось. Таким образом, удастся сделать важный вывод о том, что нематоды *T. aceti* способны выживать и размножаться на твердых средах в присутствии компонентов буровых шламов, что подтверждает их пригодность для биоремедиации.

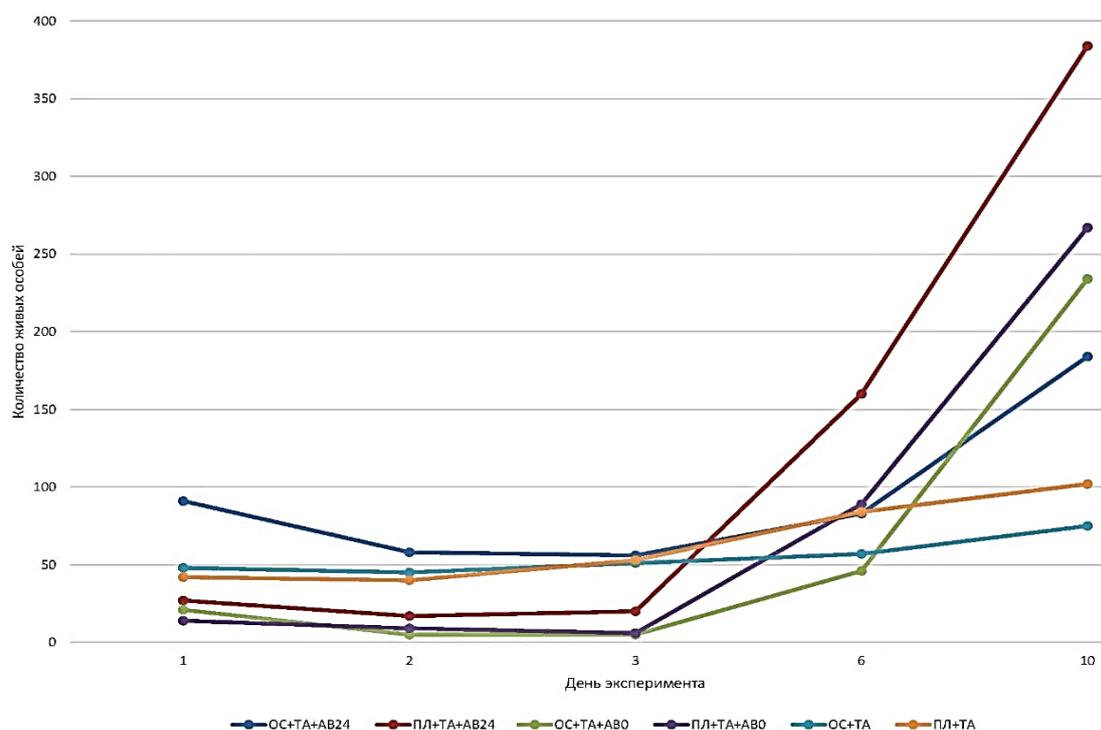


Рисунок 2 – Динамика численности нематод *T. aceti* в течение 10 дней культивации на твердых средах с компонентами буровых шламов и бактериями *A. borkumensis*. ОС – осадок шлама, ПЛ – поверхностная пленка шлама, ТА – добавлены *T. aceti*, АВ – добавлены *A. borkumensis*.

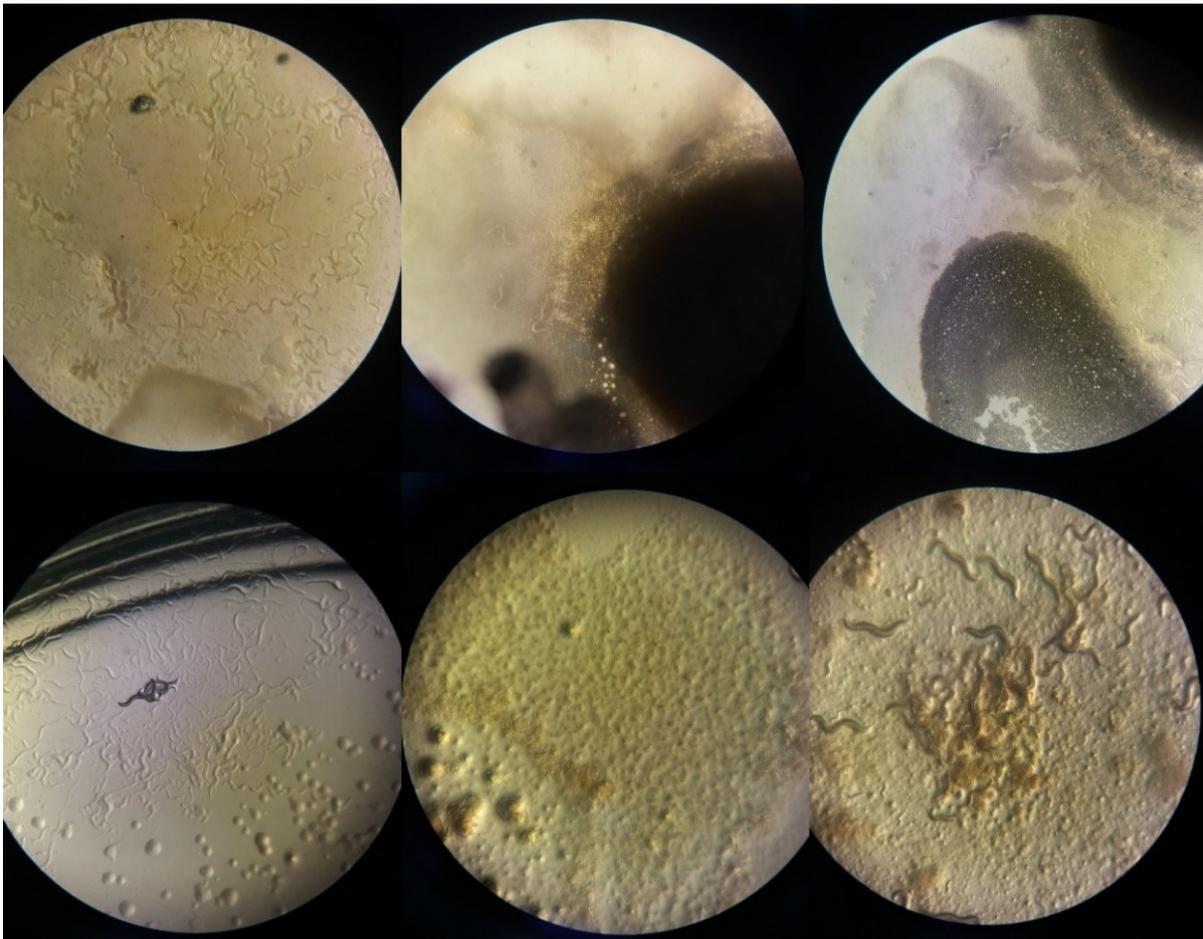


Рисунок 3 – Микроскопические изображения поверхности буровых шламов, деформированной в результате деятельности нематод *T. aceti*.

Также был исследован эффект, оказываемый нематодами на нефтяные загрязнения образцов. В чашках Петри, в которых присутствовали нематоды, поверхность и толщина шламов была буквально испещрена ходами червей, которые пронизывали мелкие и средние капли и растаскивали их на поверхности агара (Рисунок 3). Было видно, что значительную часть они пропускали через кишечник, измельчая их и преобразовывая в более жидкую субстанцию. Подобные эффекты наблюдались как в чашках с осадком, так и с надосадочной жидкостью. Надосадочную жидкость было разносить проще, по причине ее подходящей консистенции, однако даже твердый осадочный сгусток по краям был испещрен результатами подвижности *T. aceti*. Эффект разрыхления был заметен даже без микроскопа, при сравнении чашек с контрольными. Причем в случае с вариантами с бактериями, но без нематод такого эффекта не наблюдалось.

Выводы.

1) Жидкая среда с присутствием буровых шламов, разбавленных водой, обеспечивала выживание (90%) и размножение нематод в течение недели, в отличие от сред Nutrient Broth и Marine Broth для культивирования бактерий, где выживало 0 и 4%.

2) На твердых средах с добавлением надосадочной жидкости из бурового шлама численность *T. aceti* растет лучше, чем в средах с добавлением осадка. Это можно связать как с предположительно меньшей токсичностью надосадочной жидкости, в сравнении с осадком,

или большим содержанием в ней нефтепродуктов, служащих питательной средой для нефтеразлагающих бактерий.

3) На твердой среде с буровыми шламами, в которой присутствовали нематоды, поверхность и толща шламов сильно взрыхляются, мелкие и средние капли распределяются ими поверхности агара. Часть капель шламов они пропускают через кишечник, измельчая их и преобразовывая в более жидкую субстанцию.

Закключение. Данное исследование открывает перспективы для применения в будущем нематод *T. aceti* в установках для ремедиации буровых шламов, что может стать удобной альтернативой существующим методам их очистки.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-4393.2022.1.3.

Библиографический список

1. Edwards, W. C. Toxicology of oil field wastes. Hazards to livestock associated with the petroleum industry // The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.-1989.-5(2).-P. 363-374.
2. Borah, B., & Das, B. M. A review on applications of bio-products employed in drilling fluids to minimize environmental footprint // Environmental Challenges. -2022.-6.-100411.
3. Thapa B., Кс А. К., Ghimire A. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil // Kathmandu university journal of science, engineering and technology. - 2012.-8(1).-P. 164-170.
4. Remelli S. et al. Natural surface hydrocarbons and soil faunal biodiversity: a bioremediation perspective // Water. -2020.-12(9).-P. 2358.
5. Khan Z., Kim Y. H. A review on the role of predatory soil nematodes in the biological control of plant parasitic nematodes //Applied soil ecology. -2007.-35(2).-P. 370-379.

АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИИ *PSEUDOMONAS PUTIDA*

Рожин А.О., Искужина Л.И., Фахруллин Р.Ф.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация. Методом построения кривых роста исследована антибактериальная активность биогенных серебряных наночастиц, в отношении *Pseudomonas putida*. Было отмечено их значительное противомикробное действие, начальная эффективная концентрация – 10 мкг/мл, а полное ингибирование происходило при концентрациях выше 85 мкг/мл.

Ключевые слова: *Pseudomonas putida*, множественная лекарственная устойчивость, биогенные наночастицы серебра, *Sphagnum fallax*, антимикробное действие.

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF SILVER NANOPARTICLES AGAINST *PSEUDOMONAS PUTIDA* BACTERIA

Rozhin A. O., Iskuzhina L. I., Fakhrullin R. F.

Kazan Federal University, Kazan, Russia

Abstract. The antibacterial activity of biogenic silver nanoparticles in relation to *Pseudomonas putida* was investigated by the method of constructing growth curves. Their significant antimicrobial effect was noted, the initial effective concentration was 10 mcg/ml, and complete inhibition occurred at concentrations above 85 mcg/ml.

Keywords: *Pseudomonas putida*, multidrug resistance, biogenic silver nanoparticles, *Sphagnum fallax*, antimicrobial action.

Введение. Многие условно-патогенные бактерии, в том числе вызывающие широкий спектр внутрибольничных инфекций, обладают устойчивостью к различным антибиотикам и другим лекарственным средствам, а также способны образовывать биопленки [1]. Было продемонстрировано, что внутренняя резистентность синегнойной палочки (*Pseudomonas aeruginosa*) возникает в результате сочетания ограниченной проницаемости внешней мембраны и многочисленных вторичных механизмов резистентности [2]. Кроме того, отмечалось, что *Pseudomonas putida* является экологическим резервуаром накопления множественной лекарственной устойчивости, причем распространение этих элементов устойчивости на клоны *P. aeruginosa* представляет серьезную эпидемиологическую и клиническую угрозу [3]. К тому же, исследование бактерии *P. putida* является более доступным, по причине ее малоопасности, в сравнении с синегнойной палочкой. Указанные причины обусловили выбор объекта для настоящего исследования.

Проблема поиска альтернативных средств для устранения бактериальных инфекций, достаточно актуальна. Известно, что наночастицы серебра (AgNPs) обладают хорошей терапевтической активностью, в частности, антимикробным действием в отношении широкого спектра бактерий с множественной лекарственной устойчивостью [4]. Причем биогенные синтетические пути имеют ряд преимуществ перед традиционными химическими или физическими, поскольку они являются экологически чистой технологией [5]. В качестве биологического объекта был выбран белый мох *Sphagnum fallax*. Его антимикробные свойства известны давно [6], поэтому ожидался определенный синергический эффект от соединения противомикробных механизмов наночастиц серебра и их биогенной оборочки на основе сфагнома. Профиль метаболитов сфагнома состоит в основном из кислотоподобных и флавоноидных гликозидных соединений, которые могут действовать как мощные противомикробные соединения [6], механизмы же антибактериального действия наночастиц серебра заключаются в повреждении клеточной мембраны, взаимодействии с ДНК, а также в образовании свободных радикалов [7]. Противомикробное действие серебряных наночастиц, синтезированных путем биогенной самосборки с использованием мха сфагнома, исследовалось на планктонной форме бактерии *P. putida*.

Методика. Растения *S. fallax* были взяты из природного источника – с олиготрофного болота в Ульяновской области. В лабораторных условиях растения были промыты проточной водой и высушены при комнатной температуре. Высушенные растения *S. fallax* кипятились в течение 5 минут, полученный экстракт отстаивался и остывал в стерильных условиях в течение 30 минут, после чего был снят надосажок. Емкости Falcon с надосажкой центрифугировали в течение 5 минут с частотой 2000 оборотов в минуту, после чего снова удалялся осадок. Процесс синтеза проходил в стерильных условиях при комнатной температуре – производилось смешивание экстракта сфагнома и стерильного AgNO_3 , пропорции 1:2 по объему, соответственно. Хранили реакционную смесь в темноте при комнатной температуре в течение 7 дней. Процесс протекания синтеза серебряных наночастиц контролировали по изменению цвета реакционного раствора, с прозрачного на светло-коричневый. Отмывали наночастицы трижды, центрифугированием в течение 20 минут со скоростью 13000 оборотов в минуту для осаждения их на дне емкости. Бактерии *P. putida* культивировались в инкубаторе при постоянном помешивании, при температуре 28 °C, в среде Lysogeny broth в течение 18 часов после пересадки. Антибактериальную активность определяли, используя количественный метод при помощи микропланшетного фотометра Multiscan FC с последующим построением кривой роста.

Культивирование проводили в 96-луночной планшете, в опытные лунки вносили культуру микроорганизмов в концентрации $2,5 \times 10^8$ КОЕ/мл в питательной среде с добавлением наночастиц серебра в концентрациях 250, 170, 125, 85, 40, 20, 10 и 5 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля использовалась деионизированная вода, положительным контролем была культура без наночастиц. Планшет заклеивали оптически прозрачной пленкой и культивировали при непрерывном интенсивном встряхивании и измерении оптической плотности при длине волны 595 нм, каждый час в течение 48 часов. Построение кривой роста и статистическую обработку данных проводили в программе Microsoft Excel 2016.

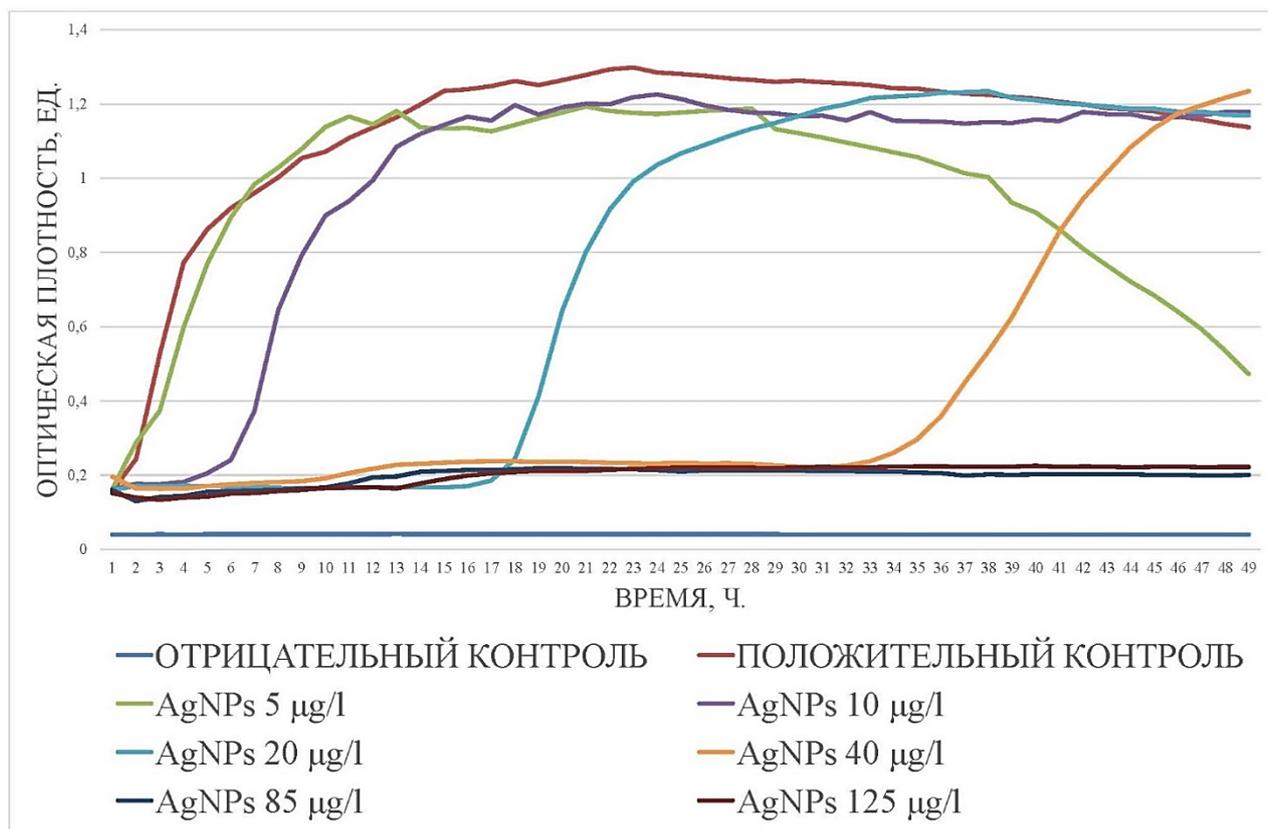


Рисунок 1 – Антибактериальная активность биогенных наночастиц серебра различной концентрации в отношении *Pseudomonas putida*.

Результаты. Как можно видеть на Рисунке 1, эффективность биогенных наночастиц серебра начала проявляться даже на самых малых концентрациях. Кривая положительного контроля показывает, как им образом растет бактериальная колония при отсутствии воздействия. При концентрации 5 мкг/мл можно отметить практически полное совпадение кривой с контрольной, за исключением вторых суток исследования, где отмечается спад. При увеличении концентрации до 10 мкг/мл отмечается 6-часовая задержка увеличения численности, что может быть связано с временным ингибирующим действием, противостоять которому способны лишь некоторые бактериальные клетки, которые после размножаются в обычной динамике. Такой же эффект отмечается при концентрациях 20 и 40 мкг/мл. Им соответствуют 18-часовая и 33-часовая задержки роста, причем в случае с концентрацией в 40 мкг/мл можно также отметить замедление скорости роста по сглаживанию крутизны кривой в ЛАГ-фазе, что связано с тяжелым ингибирующим эффектом, который постоянно испытывают на себе все оставшиеся бактериальные клетки. При 85 и 125 мкг/мл развития бактерий вообще не происходит, что говорит о полном ингибировании. На графике не указаны большие концентрации в 170 и 250 мкг/мл, так как профили их кривых практически совпадают с предыдущими – полное ингибирование. Данный результат позволяет говорить об исключительной эффективности наночастиц серебра в отношении бактерий *P. putida*.

Закключение. Было установлено, что биогенные наночастицы серебра обладают выраженным антимикробным действием в отношении бактерий *P. putida*, причем минимальная действующая концентрация – 10 мкг/мл, а эффективная концентрация полного ингибирования – 80 мкг/мл. Эти данные могут быть основой для дальнейших исследований действия наночастиц серебра на синегнойную палочку и другие условно-патогенные бактерии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 21-74-10034.

Библиографический список

1. Bujňáková, D., Puvača, N., & Čirković, I. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Enterobacteriales. // *Microorganisms*.-2022.-10(8).-1588.
2. Hancock, R. E., & Speert, D. P. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. // *Drug resistance updates*.-2000.-3(4).-P. 247-255.
3. Juan, C., Zamorano, L., Mena, A., Albertí, S., Pérez, J. L., & Oliver, A. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas putida* as a reservoir of multidrug resistance elements that can be transferred to successful *Pseudomonas aeruginosa* clones. // *Journal of antimicrobial chemotherapy*.-2010.-65(3).-P. 474-478.
4. Alavi, M., Kowalski, R., Capasso, R., Douglas Melo Coutinho, H., & Rose Alencar De Menezes, I. Various novel strategies for functionalization of gold and silver nanoparticles to hinder drug-resistant bacteria and cancer cells. // *Micro Nano Bio Aspects*.-2022.-1(1).- P.38-48.
5. Durán, N., Nakazato, G., & Seabra, A. B. Antimicrobial activity of biogenic silver nanoparticles, and silver chloride nanoparticles: an overview and comments. // *Applied microbiology and biotechnology*.-2016.-100(15).-P. 6555-6570.
6. Fudyma, J. D., Lyon, J., AminiTabrizi, R., Gieschen, H., Chu, R. K., Hoyt, D. W., ... & Tfaily, M. M. // Untargeted metabolomic profiling of *Sphagnum fallax* reveals novel antimicrobial metabolites. *Plant Direct*.-2019.-3(11).-e00179.
7. Durán, N., Durán, M., De Jesus, M. B., Seabra, A. B., Fávaro, W. J., & Nakazato, G. Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. // *Nanomedicine: nanotechnology, biology and medicine*.-2016.-12(3).- P. 789-799.

ВОЗДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИРЕТРОИДОВ НА НЕЦЕЛЕВЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ОБЗОР)

Роткин А.Т.

Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной энтомологии и арахнологии – филиал ФГБУН ФИЦ Тюменского научного центра СО РАН, Тюмень, Россия

Аннотация. В данной статье рассмотрены научные исследования, свидетельствующие о негативных факторах, возникающих при применении синтетических пиретроидов для борьбы с насекомыми-вредителями. Пиретроиды – это пестициды, являющиеся синтетическими производными природных пиретринов, обладающие высокой биологической активностью и низкими дозами применения, характеризующиеся низкой растворимостью в воде и сильными сорбционными свойствами, которые снижают их биодоступность в естественных условиях. Использование пиретроидов в сельском хозяйстве принято считать наиболее эффективным и менее токсичным способом борьбы с насекомыми, однако существуют исследования, указывающие на токсическое воздействие применения пиретроидов в отношении нецелевых организмов. Основное содержание исследования составляет анализ имеющихся научных данных о негативном влиянии применения данных средств. Для сбора информации был произведен поиск научных работ в Российских и зарубежных источниках, о последствиях применения синтетических пиретроидов. На основе найденных исследований, можно сделать выводы о том, что масштабность применения пиретроидных пестицидов сильно опережает изученность последствий, связанных с их использованием. Важным в этом вопросе является снижение применения синтетических пиретроидов, этого можно достичь с помощью прогнозирования и моделирования эпизоотической ситуации, исходя из чего можно будет снижать объемы применения инсектицидов в местах, не требующих этого. Также важными мерами предосторожности будут являться: более строгая регулировка продажи, проведение дополнительных исследований и написание научных работ по оценке воздействия пиретроидов на нецелевые организмы, отслеживание и учет отравлений, вызванных пиретроидами, поиски пестицидов токсичных для насекомых-вредителей и безопасных для нецелевых организмов.

Ключевые слова: пестициды, пиретроиды, токсичность пиретроидов, нецелевые организмы.

THE EFFECT OF SYNTHETIC PYRETHROIDS ON NON-TARGET ORGANISMS (REVIEW)

Rotkin A. T.

The All-Russian Research Institute of Veterinary Entomology and Arachnology is a branch of the Federal State Budgetary Institution of Science of the Federal Research Center of the Tyumen Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Tyumen, Russia

Abstract. This article discusses scientific studies that indicate the negative factors that arise when using synthetic pyrethroids to control insect pests. Pyrethroids are pesticides that are synthetic

derivatives of natural pyrethrins, with high biological activity and low doses of use, characterized by low solubility in water and strong sorption properties that reduce their bioavailability in vivo. The use of pyrethroids in agriculture is considered to be the most effective and less toxic way to control insects, however, there are studies indicating the toxic effects of the use of pyrethroids against non-target organisms. The main content of the study is the analysis of available scientific data on the negative impact of the use of these tools. To collect information, a search was made for scientific papers in Russian and foreign sources on the consequences of the use of synthetic pyrethroids. Based on the studies found, it can be concluded that the scale of the use of pyrethroid pesticides is far ahead of the study of the consequences associated with their use. It is important in this matter to reduce the use of synthetic pyrethroids, this can be achieved by forecasting and modeling the epizootic situation, on the basis of which it will be possible to reduce the use of insecticides in places that do not require it. Also important precautions will be: stricter regulation of sales, conducting additional research and writing scientific papers to assess the effects of pyrethroids on non-target organisms, tracking and accounting for poisoning caused by pyrethroids, searching for pesticides toxic to insect pests and safe for non-target organisms.

Keywords: pesticides, pyrethroids, toxicity of pyrethroids, non-target organisms.

Пиретроиды – синтетические инсектициды, аналоги природных пиретринов. На данный момент, пиретроиды являются одними из самых широко применяемых пестицидов в мире они распространены в качестве инсектицидов для борьбы с вредителями плодовых и огородных культур, вредителями запасов продовольствия в быту, для обработки сельскохозяйственных животных против эктопаразитов. По оценкам специалистов, объем потребления пиретроидов на рынке пестицидов в ближайшие годы будет неуклонно расти. Поэтому, в настоящее время, особенно важно более подробно изучать проблему их токсичности в отношении нецелевых организмов [1]. Пиретроиды отличаются от пестицидов других классов быстрым распространением в окружающей среде, относительно низкой токсичностью и малой кумулятивностью. Однако существуют литературные данные, которые свидетельствуют о последствиях токсического действия данных инсектицидов на нецелевые организмы. В частности, в данной статье, приводятся исследования о негативном воздействии пиретроидов на млекопитающих животных, на людей, в особенности у работников сельскохозяйственных предприятий, которые проводят обработки, также на водные организмы и на пчел.

У млекопитающих, которые подвергаются высоким дозировкам пиретроидов в связи с их нейротоксичностью возникают такие побочные эффекты как: мышечный тремор, судороги, возбуждение и нарушение координации. Это может приводить к смерти [2]. Также пиретроиды могут вызывать изменения иммунного ответа у животных. Они являются мощными иммунотоксическими агентами, влияющими на гуморальный и клеточный иммунитет [2,4]. Также очень важным аспектом исследований влияния пиретроидов на млекопитающих, является их действие на репродуктивную систему.

При лабораторных исследованиях с использованием различных дозировок у животных наблюдались, снижение массы плода, наличие дополнительных ребер, потеря беременности, окостенение передних, задних конечностей у плодов, у молодняка наблюдалось появление признаков аномальных движений, судорог и изменения биохимических показателей крови и др. Что касается фертильности у самцов, пиретроиды могут снижать качество спермы в следствии эндокринных нарушений. Это связывают с вызываемыми инсектицидами нарушениями функций антиоксидантной системы в половых железах [4].

У людей, применение пиретроидов в домашнем хозяйстве часто связано с аллергией и астмой, особенно у детей [4]. Метаболиты пиретроидов были обнаружены в грудном молоке женщин. У детей при длительном воздействии перметрина увеличивалось количество его метаболитов в моче, агрессивное, возбужденное поведение, проблемы с кратковременной памятью, нарушение сна, ухудшение мыслительных способностей. Воздействие пиретроидов на беременных соответственно может привести к негативным изменениям в центральной нервной системе плода [2,4].

У работников, контактирующих с пестицидами, наблюдались такие симптомы, как головокружение и головные боли, тошнота, усталость, помутнение зрения, ощущение жжения и покалывания на лице, тремор рук и ног, судороги, чувствительность к солнцу и потеря сознания, также некоторые пиретроиды способствуют развитию болезни Паркинсона [4].

Водные организмы тоже подвергаются негативному воздействию пиретроидов. Способы проникновения в водные среды обитания является как прямым, так и косвенным. Несколько видов рыб и нецелевых водных насекомых, показали сходный уровень чувствительности к пиретроидам, как и личинки комаров [5].

Также интересно еще то, что среди многих вероятных причин возникновения расстройства коллапса пчелиных колоний одной из наиболее важных является применение синтетических инсектицидов. Влияние пиретроидов вызывает, изменение кинетики натриевых каналов чувствительных к напряжению, снижение активности ацетилхолинэстеразы в синаптическом пространстве, уменьшение размера колонии, так, что эти химические вещества действуют быстро, вызывая гибель пчел вдали от улья [3].

Исходя из изученного материала, можно сделать выводы о том, что масштабность применения пиретроидных пестицидов сильно опережает изученность негативных последствий их применения. Важным в этом вопросе является снижение применения синтетических пиретроидов, этого можно достичь с помощью прогнозирования и моделирования эпизоотической ситуации, исходя из чего можно будет снижать объемы применения инсектицидов в местах, не требующих этого.

Также важными мерами будут является: более строгая регулировка продажи, проведение дополнительных исследований и написание научных работ по оценке воздействия пиретроидов на нецелевые организмы, отслеживание и учет отравлений, вызванных пиретроидами, поиски пестицидов токсичных для насекомых-вредителей и безопасных для нецелевых организмов.

Статья подготовлена при финансовой поддержке: 121042000076-5 Разработка методов научно-обоснованного применения средств дезинсекции, химической и биологической регуляции численности паразитов с целью сохранения эпизоотического благополучия и качества здоровья сельскохозяйственных и непродуктивных животных, пчел и птиц.

Библиографический список

1. Максименко, Л. В. Эколого-токсикологическая характеристика пестицидов класса синтетических пиретроидов / Л. В. Максименко, А. И. Гурова // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2004. – № 2. – С. 102-107. – EDN IMQLKH.
2. Анучина А.В. Токсическое действие пестицидов на организм человека и животных. Международный студенческий научный вестник 2019

3. Piechowicz, B. Grodzicki, P. Circadian and Seasonal Changes in Honeybee (*Apis Mellifera*) Worker Susceptibility to Pyrethroids. POLISH JOURNAL OF ENVIRONMENTAL STUDIES. Volume 25 Issue 3 Page 1177-1185. 2016
4. Chrustek A. Holynska-Iwan I, Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. MEDICINA-LITHUANIA. Volume 54. Issue 4. Sep. 2018
5. Antwi FB. Reddy GVP. Toxicological effects of pyrethroids on non-target aquatic insects. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY. Volume 40. Issue 3. Page 915-923. Nov. 2015

**ВЛИЯНИЕ МИКРОПЛАСТИКА НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ
ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ЛИНИИ *DROSOPHILA MELANOGASTER*
МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ *FOXO***

Сайфутдинова А.Р., Костенко В.В.

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Аннотация: Токсичное действие микрочастиц полиэтилентерефталата ($d = 0.1$ мм) было изучено на модели *in vivo* *D. melanogaster* в отношении изменчивости признаков приспособленности: плодовитость, жизнеспособность, эмбриональная и предимагинальная гибель, нейромышечная активность и стресс-устойчивость. Показана роль транскрипционного фактора *dFOXO* при токсигенной нагрузке микрочастиц полиэтилентерефталата в концентрациях 0.02 г/мл и 0.04 г/мл на показатель эмбриональная гибель, стресс-резистентность и двигательная активность.

Ключевые слова: микропластик, *Drosophila melanogaster*, токсигенность, приспособленность, ген *dFOXO*.

**INFLUENCE OF MICROPLASTICS ON THE DEVELOPMENT OF *FOXO* MUTANT
DROSOPHILA MELANOGASTER ADAPTATION PARAMETERS**

Saifutdinova A. R., Kostenko V.V.

Kazan (Volga Region) Federal University, Kazan, Russia

Abstract. The toxic effect of polyethylene terephthalate microparticles ($d = 0.1$ mm) was studied in an *in vivo* model of *D. melanogaster* in relation to the variability of adaptation parameters: fertility, viability, embryonic and preimaginal death, neuromuscular activity, and stress resistance. The role of the transcription factor *dFOXO* in the toxigenic load of polyethylene terephthalate microparticles at concentrations of 0.02 g/ml and 0.04 g/ml on embryonic death, stress resistance, and locomotor activity was shown.

Keywords: microplastics, *Drosophila melanogaster*, toxigenicity, adaption, *dFOXO* gene.

Микропластиковое загрязнение является одной из глобальных экологических проблем современности [1]. С момента начала широкомасштабного использования пластиковых материалов темпы их производства нарастают гигантскими шагами; при этом большая часть пластмасс после использования попадает непосредственно в окружающую среду. В 2010 году мировое производство пластика составляло 270-275 млн. тонн в год; к 2021 году этот же показатель достиг 584 млн. тонн в год [2,3]. Большая часть произведенного пластика становится отходами, которые загрязняют экосистемы: в период с 1950 года по 2015 год

отходами стали 6300 млн. тонн пластика, из которых 4600 млн. тонн (55 %) были выброшены в окружающую среду без надлежащего обезвреживания или утилизации [4].

В естественных условиях крупные фрагменты пластика деградируют до микропластика (МП) – частиц размером менее 5 мм [5]. Из-за размера МП легко перемещается по экосистемам несколькими способами:

- в результате прямого проглатывания МП живыми организмами [6];
- переносом по пищевым цепям [7];
- переносом между разными жизненными стадиями организмов одного вида [8];
- в результате передачи МП-частиц от родителей к потомству во время выкармливания [9].

Микрочастицы пластика были обнаружены в разных точках планеты Земля, в телах различных организмов, в том числе в крови, легких и плаценте человека [10-12]. При попадании в тела живых существ МП оказывает негативные эффекты на их жизнедеятельность. Например, в исследованиях на *Daphnia magna* было продемонстрировано, что дафнии поглощали микрочастицы пластика, что вызывало их обездвиживание и физические повреждения [13]. В работе, посвященной воздействию микрочастиц полистирола (размер частиц 5 мкм и 70 мкм) на рыбок данио-рерио (*Danio rerio*), было обнаружено, что микропластик может накапливаться в жабрах, печени и кишечнике рыб; также в гепатоцитах наблюдались гистологические изменения: инфильтрация, некроз, наличие липидных капель и воспаления [14].

Целью данной работы является оценка вклада гена *FOXO* в формирование признаков приспособленности модельного организма *Drosophila melanogaster* в условиях токсической нагрузки микропластиком из полиэтилентерефталата.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Линии *D. melanogaster* и условия культивирования

В работе использовали линию *Drosophila melanogaster* дикого типа *Canton-S* и линию *FOXO²⁵* (*y, w; FRT 82 dFOXO²⁵ /TM6B Tb, Hu*), содержащую в гомозиготе гипоморфную аллель гена транскрипционного фактора *FOXO*. Мух культивировали на стандартной сахарно-дрожжевой среде в термостате при температуре 25° С и световом режиме 12/12. Для наркотизации мух использовался диэтиловый эфир. В исследовании использовались микрочастицы полиэтилентерефталата (ПЭТ) размером 0.1 мм в концентрациях 0.02 г и 0.04 г на 1 мл питательной среды. Контрольные группы была выращены на стандартной сахарно-дрожжевой среде без добавления ПЭТ.

2. Методы исследования признаков приспособленности *D. melanogaster*, подвергшихся влиянию ПЭТ

Комплексная оценка влияния ПЭТ на адаптационный потенциал дрозофил проводилась на основе следующих параметров: жизнеспособность, плодовитость, яйцепродукция, частота эмбриональной гибели, частота гибели на стадии метаморфоза, реакция на стресс и локомоторная активность.

2.1. Исследование фертильности *D. melanogaster*, подвергшихся влиянию ПЭТ

Показатели плодовитости и жизнеспособности определяли, как количество потомков от двух пар родительских мух, содержащейся в пробирке первые 7 суток, на стадии куколки и стадии имаго соответственно. Учет потомства велся от родительских пар для каждой

концентрации и для контрольных групп. Показатель плодовитости рассчитывался как количество всех куколок в каждой экспериментальной группе дрозophil.

2.2. Анализ яйцепродукции и летальных мутаций в период эмбрионального развития *D. melanogaster*, подвергшихся влиянию ПЭТ

Имаго, которые на стадии личинки получали микропластик в исследуемых концентрациях 0.02 г/мл и 0.04 г/мл, отбирали и затем определяли у них такие показатели как яйцепродукция и частота эмбриональных леталей. В качестве показателя изменений, происходящих в половых клетках имаго, использовался критерий частоты доминантных летальных мутаций (ДЛМ) на ранних стадиях эмбриогенеза. Учет ДЛМ проводился по следующим параметрам: белые яйца – это ранние летали, желтые и коричневые яйца – это поздние летали. Частоту доминантных летальных мутаций определяли как соотношение неразвившихся яиц к общему числу яиц.

2.3. Анализ летальных мутаций в период предимагинального развития *D. melanogaster*, подвергшихся влиянию ПЭТ

Для оценки такого показателя, как «предимагинальная гибель» или «гибель на стадии метаморфоза» учитывали количество особей (в процентах от их общего количества), не вышедших на момент завершения периода выхода имаго из пупариев в потомстве от родительских пар.

2.4. Анализ локомоторной (двигательной) активности имаго *D. melanogaster*, подвергшихся влиянию ПЭТ

Измерение локомоторной (двигательной) активности дрозophil проводили, используя метод вертикального подъема («climbing assay») насекомых в пробирке (d = 20 mm) на расстояние 10 см в течение 10 секунд, затем рассчитывая индекс локомоции по % особей, достигших отметку, к общему числу тестируемых объектов. В эксперименте тестировались группы по 23-56 особей в трех повторах в каждом варианте опыта.

2.5. Анализ стресс – устойчивости *D. melanogaster* в условиях голода

Для анализа стресс-ответа дрозophil, выращенных на среде с добавлением ПЭТ в исследуемых концентрациях, отбирали, подвергали голодовому стрессу и изучали выживаемость особей каждого пола в каждой экспериментальной группе.

2.6. Статистический анализ

Полученные результаты были обработаны с использованием теста ANOVA в программе GraphPad Prism 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование мутантов *FOXO*²⁵ на стадии личинок на среде с добавлением микрочастиц ПЭТ в концентрации 0.02 г/мл приводит к повышению жизнеспособности самок на 20% и самцов на 11% по сравнению с контрольной группой; однако это повышение статистически не значимо (p>0.05). Культивирование мутантов *FOXO*²⁵ на стадии личинок на среде с добавлением микрочастиц ПЭТ в концентрации 0.04 г/мл не приводит к изменению жизнеспособности особей обоих полов по сравнению с контролем.

Показатель плодовитости рассчитывался как количество всех куколок в каждой экспериментальной группе мух. В результате было обнаружено, что у мутантов, получавших на стадии личинок ПЭТ в дозе 0.02 г/мл, плодовитость увеличилась на 17%; а у мутантов, получавших ПЭТ в дозе 0.04 г/мл, этот же показатель увеличился на 13%.

Гибель на стадии метаморфоза среди дрозophil мутантной линии линию *FOXO*²⁵ составила 20%, 20% и 27% в контрольной группе и в группах, получавших ПЭТ в дозах 0.02

г/мл и 0.04 г/мл, соответственно. Эмбриональная гибель составила 38%, 47% и 56% в контрольной группе и в группах, получавших ПЭТ в дозах 0.02 г/мл и 0.04 г/мл, соответственно.

Показано, что культивирование мутантов *FOXO²⁵* на личиночной стадии развития на среде с добавлением ПЭТ в концентрации 0.02 г/мл повышает индекс локомоции у самок на 24% по сравнению с группой без токсической нагрузки; ПЭТ в дозе 0.04 г/мл также повышает индекс локомоции у мутантных самок на 12% по сравнению с контролем. Для самцов, подвергнутых воздействию МП в обеих исследуемых концентрациях, не было обнаружено достоверного изменения индекса локомоции по сравнению с контрольной группой.

Сравнение данных, полученных на дрозофилах дикого типа *Canton-S*, с данными, полученными на мутантах по гену *FOXO²⁵*, показало, что в контрольной группе у мутантных самок жизнеспособность относительно дикого типа повысилась на 23%; а у самцов понизилась на 13%. В опытной группе, получавшей ПЭТ в дозе 0.02 г/мл, жизнеспособность мутантных самок и самцов по сравнению с диким типом снизилась на 4% и 22%, соответственно. В группе мутантов по сравнению с группой дикого типа, получавших ПЭТ в дозе 0.04 г/мл, было обнаружено статистически значимое повышение жизнеспособности у самок на 93%, а у самцов на 67%.

Выявлено, что по сравнению с диким типом у мутантов *FOXO²⁵* наблюдается достоверное увеличение эмбриональной гибели в контрольной группе на 31%, а в группах, получавших ПЭТ в дозах 0.02 г/мл и 0.04 г/мл – 40% и 47% соответственно.

Показано, что по сравнению с диким типом у мутантных дрозофил индекс локомоции у самок снизился на 35%, 5% и 25% в контрольной группе и в экспериментальных группах, получавших ПЭТ в концентрациях 0.02 г/мл и 0.04 г/мл соответственно. Однако для самцов снижение индекса локомоции показано только в контрольной группе на 11% и в группе, получавшей ПЭТ в концентрации 0.02 г/мл, на 16% относительно дикого типа.

В результате проведенного теста по определению стресс-резистентности выявлено, что у мутантов по гену *dFOXO*, выращенных на стандартной среде, средняя продолжительность жизни по сравнению с линией дикого типа снизилась на 27% ($p < 0.001$). При культивировании мух линии *dFOXO²⁵* на среде с микропластиком в концентрациях 0.02 г/мл и 0.04 г/мл по сравнению с диким типом средняя продолжительность жизни при стрессе снизилась на 12% и 7%, соответственно.

Полученные в работе данные указывают на роль транскрипционного фактора *dFOXO* в контроле некоторых адаптивных признаков дрозофилы (эмбриональная, двигательная активность, стресс-резистентность) в условиях токсигенной нагрузки микрочастицами полиэтиленерефталата.

Библиографический список

1. Igalavithana A. D. et al. Microplastics and Potentially Toxic Elements: Potential Human Exposure Pathways through Agricultural Lands and Policy Based Countermeasures //Microplastics. – 2022. – Т. 1. – №. 1. – С. 102-120.
2. Jambeck J. R. et al. Plastic waste inputs from land into the ocean //Science. – 2015. – Т. 347. – №. 6223. – С. 768-771.
3. Benson N. U., Bassegy D. E., Palanisami T. COVID pollution: impact of COVID-19 pandemic on global plastic waste footprint //Heliyon. – 2021. – Т. 7. – №. 2. – С. e06343.

4. Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made //Science advances. – 2017. – T. 3. – №. 7. – C. e1700782.
5. Thompson R. C. et al. Lost at sea: where is all the plastic? //Science. – 2004. – T. 304. – №. 5672. – C. 838-838.
6. Hoang T. C., Mitten S. Microplastic accumulation in the gastrointestinal tracts of nestling and adult migratory birds //Science of The Total Environment. – 2022. – T. 838. – C. 155827.
7. Huerta Lwanga E. et al. Field evidence for transfer of plastic debris along a terrestrial food chain //Scientific Reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-7.
8. Al-Jaibachi R., Cuthbert R. N., Callaghan A. Up and away: ontogenic transference as a pathway for aerial dispersal of microplastics //Biology Letters. – 2018. – T. 14. – №. 9. – C. 20180479.
9. D'Souza J. M. et al. Food web transfer of plastics to an apex riverine predator //Global change biology. – 2020. – T. 26. – №. 7. – C. 3846-3857.
10. Leslie H. A. et al. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood //Environment international. – 2022. – T. 163. – C. 107199.
11. Jenner L. C. et al. Detection of microplastics in human lung tissue using μ FTIR spectroscopy //Science of The Total Environment. – 2022. – T. 831. – C. 154907.
12. Ragusa A. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta //Environment International. – 2021. – T. 146. – C. 106274.
13. Ma Y. et al. Effects of nanoplastics and microplastics on toxicity, bioaccumulation, and environmental fate of phenanthrene in fresh water //Environmental Pollution. – 2016. – T. 219. – C. 166-173.
14. Lu Y. et al. Uptake and accumulation of polystyrene microplastics in zebrafish (*Danio rerio*) and toxic effects in liver //Environmental science & technology. – 2016. – T. 50. – №. 7. – C. 4054-4060.

БИОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЗЕЛЕНЕНИЯ ДОШКОЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ

Страздаускене С.Р., Сунгурова Н.Р.

*Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова, Архангельск,
Россия*

Аннотация. Дошкольные учреждения относятся к объектам ограниченного пользования. Озеленение таких территорий проводится при строгом соблюдении санитарных норм и правил. Деревья и кустарники, произрастающие на прилегающей к детскому саду территории, должны выполнять ряд функций, а именно: защитную, рекреационную, познавательную, декоративную, маскировочную, оздоровительную. Поэтому подбор древесных растений должен проводиться в соответствии с климатическими условиями их местопроизрастания, учитывая их биологические и экологические особенности.

Ключевые слова: озеленение, древесные породы, биоэкологические свойства, дошкольное учреждение.

BIOECOLOGICAL PROPERTIES OF TREE SPECIES USED FOR LANDSCAPING OF PRESCHOOL INSTITUTIONS

Strazdauskene S.R., Sungurova N.R.

Northern (Arctic) Federal University named after M.V. Lomonosov, Arkhangelsk, Russia

Abstract. Preschool institutions belong to objects of limited use. Landscaping of such territories is carried out in strict compliance with sanitary norms and rules. Trees and shrubs growing on the territory adjacent to the kindergarten must perform a number of functions, namely: protective, recreational, educational, decorative, camouflage, wellness. Therefore, the selection of woody plants should be carried out in accordance with the climatic conditions of their growing place, taking into account their biological and ecological characteristics.

Keywords: landscaping, tree species, bioecological properties, preschool institution.

В решении проблемы охраны окружающей среды важную роль выполняет озеленение населенных мест. Огромное значение зелёные насаждения играют в снижении шума и запылённости воздуха, в улучшении санитарного состояния почв и микроклимата, что оптимально отражается на комфортном пребывании человека в урбанизированной среде и формирует благоприятные гигиенические условия.

В озеленении дошкольных учреждений можно проследить два направления:

1) озеленение территорий учреждений, выполненное еще в 20 веке, когда высаживались местные аборигенные виды деревьев и кустарников и ассортимент имеющейся растительности не отличался видовым разнообразием. В последующем совместными

усилиями педагогов с родителями единично подсаживались декоративные на их взгляд растения, при этом, не всегда соблюдая требования санитарных норм и правил к эколого-биологическим свойствам древесных видов.

2) озеленение территорий дошкольных учреждений, строящихся в 20-е годы 21 века по программе «Комфортная городская среда». В связи с ускоренными темпами строительства и сдачи объектов застройщиками, созданию зеленых насаждений на территории отводилась не первостепенная задача. В итоге наблюдается однообразность и монотонность посадок и, как в первом случае, не точное соблюдение требований санитарных норм и правил к эколого-биологическим свойствам древесных видов.

Особенностью дошкольных учреждений в системе озеленения городов является отнесение их территорий к объектам ограниченного пользования. На дворовой территории, примыкающей к зданию детского сада проводится зонирование. При этом выделяют участки (игровые, спортивные, зоны отдыха, учебно-опытные, хозяйственные и т.п.), выполняющие различные функции. На плане территории проектируют озеленение каждой зоны в соответствии с санитарными нормами и правилами [1].

Многочисленными исследованиями установлено [2, 3], что на сегодняшний день существует проблема оздоровления воздушной среды дошкольных учреждений. Наиболее экологически безопасный и естественным способом очистки воздушного пространства – метод биологического оздоровления, основанный на посадке деревьев и кустарников с газопоглонительными и фитонцидными свойствами. Поэтому очень важно высаживать такие растения на дворовых участках дошкольных учреждений.

При подборе ассортимента деревьев и кустарников для дошкольных учреждений необходимо строго учитывать их биологические и экологические свойства.

Среди биологических свойств растений берут во внимание жизненную форму вида в конкретных климатических условиях, форму и цвет листы, коры ствола, цветков и соцветий, плодов и соплодий, а также продолжительность цветения, выделение летучих веществ (например, пыльцы), размер и форму плодов, внешний облик особей.

По этой причине здесь должны быть высажены и деревья (клен, ясень, лиственница, ель, сосна, липа, ива и др.), и кустарники (пузыреплодник, рябинник, можжевельник), и лианы (лимонник, девичий виноград и др.). Особую декоративность имеют продолжительно цветущие виды: спирея, лапчатка и др. Растения с разной формой и фактурой листы используют в познавательных целях: ильм, рябина, лох, береза и т.д. Согласно санитарным нормам и правилам при озеленении дошкольных учреждений не должны использоваться колючие и ядовитые растения, а также растения, цветение которых может вызвать аллергические реакции.

Среди экологических свойств растений важными являются их отношение к свету, теплу, влажности воздуха и почвы, к неблагоприятным городским условиям (устойчивость к пыли, дыму и газу, уплотнение и засоленность почвы, сухость воздуха и почвы).

По отношению к свету древесные растения объединяются в 3 группы [4]:

- светолюбивые – более приспособлены для произрастания на открытых освещенных местах (лиственница сибирская, сосна обыкновенная, береза повислая, осина (тополь дрожащий) и тополь, белая акация, ясень обыкновенный, можжевельники казацкий и высокий и др.);

- теневыносливые – наилучшим образом растут и развиваются при достаточно полной освещенности, но могут приспособиваться и к небольшому затенению (ель, самшит, пихта, бук, липа, граб);

- тенелюбивые – не используются в городских условиях.

Тепло является важнейшим экологическим фактором, определяющим жизнь растений. Древесные растения характеризуются различным отношением к теплу и его сезонным изменениям. В научных изданиях выделяют 4 экологические группы растений [5]:

- очень теплолюбивые – эвкалипты, криптомерия, дуб пробковый,

- теплолюбивые – каштан съедобный, платан восточный, дуб пушистый, орех грецкий, гледичия, белая акация, вяз граболистный;

- среднетребовательные к теплу – дуб черешчатый, граб обыкновенный, клен остролистный, ясень обыкновенный, бархат амурский, ольха;

- малотребовательные к теплу – тополя душистый и бальзамический, ольха серая, березы повислая и пушистая, рябина обыкновенная, ели сибирская и обыкновенная, пихта сибирская, сосна обыкновенная, сосны кедровые – сибирская и стланиковая, ольховник кустарниковый.

Вода – один из важнейших экологических факторов жизни и распространения растений на нашей планете. Для жизни растений участие воды необходимо в качестве растворителя и метаболита. Вода является обязательным компонентом в реакции фотосинтеза, минеральные соли поступают в растение из почвы только в виде водных растворов. Вода составляет большую часть массы растения.

Большую роль в оценке водообеспеченности растений играет соотношение осадков и испаряемости. Обеспеченность влагой в вегетационный период и соотношение осадков с годовым ходом температуры критически важно для жизни растений.

3 основные экологические группы древесных растений по отношению к содержанию воды в атмосфере и почве – гигрофиты, ксерофиты и мезофиты.

К эдафическим, или почвенно-грунтовым, условиям относят совокупность показателей, характеризующих почву, материнскую породу и грунтовые воды.

По отношению к почвенным условиям выделяют несколько эдафических типов растений [2]:

– олиготрофы – растения, способные расти на бедных минеральными веществами почвах (сосны обыкновенная, лапландская и горная, кедровый стланик, лиственницы Гмелина и Каяндера, можжевельники обыкновенный и сибирский, лещина);

– эутрофы (мегатрофы) – виды растений, распространенные на богатых, с большим содержанием зольных элементов и благоприятным сочетанием других почвенных факторов почвах (пихты кавказская, сибирская и цельнолистная, дуб черешчатый, вяз гладкий, ольха черная, орех грецкий и маньчжурский, липа амурская, ясень обыкновенный, груша обыкновенная, черешня, яблони лесная и домашняя);

– мезотрофы – виды древесных растений успешно произрастающие на почвах среднего плодородия (ели аянская, обыкновенная и сибирская, кедр сибирский, лиственница сибирская, дубы скальный и монгольский, березы даурская, каменная и плосколистная, клен остролистный, тополя белый и черный, рябина обыкновенная).

Воздух как экологический фактор следует рассматривать с точки зрения газового состава и движения (циркуляции атмосферы). Газовый состав воздуха имеет исключительное значение для жизни растений: углекислый газ необходим для фотосинтеза, а кислород – для дыхания. В воздушных бассейнах крупных городов содержится большое количество промышленных выбросов – сажи, сернистого ангидрида, соединений фтора, аммиака и др., а вдоль автострад воздух загрязнен выхлопными газами. Растения по-разному реагируют на загазованность и задымленность воздушного бассейна.

Некоторые виды отличаются высокой пыле-, дымо- и газоустойчивостью (ель колючая, лиственница сибирская, туя западная, клен татарский и остролистный, акация желтая, сирень венгерская, липа мелколистная, ильмы, тополя, спиреи).

Отдельные породы деревьев и кустарников по своим экологическим свойствам не желательно высаживать близ автомобильных дорог, так как при повышенном загрязнении воздушной среды они теряют декоративность, поражаются вредителями и болезнями и гибнут. К ним можно отнести сосну обыкновенную, ель европейскую, пихту сибирскую и др. Исследованиями установлено, что лиственные деревья и кустарники устойчивее к неблагоприятным городским условиям, чем хвойные виды.

Весьма многообразна экологическая роль ветра. Он является важнейшим фактором формирования климата, обеспечивает общее перемешивание газов атмосферы, воздействует на транспирацию растений. В районах с сильными ветрами у деревьев образуются флагообразные кроны, неравномерное нарастание древесины, формирование приземистых и стелющихся форм.

Жизненный цикл древесных растений имеет большое значение в озеленении территорий, как по экономическим, так и по эстетическим соображениям, так как старые, мощно развитые деревья представляют большую декоративную ценность, чем более молодые. Быстрорастущие виды (тополя, ивы, березы) обычно менее долговечны, чем медленно растущие (дуб, липа, клен остролистный). Но из этого правила есть и исключения. Например, платан, ясень обыкновенный и секвойя вечнозеленая являются быстрорастущими и, в то же время, весьма долговечными.

В заключении отметим, что только при строгом соблюдении биоэкологических особенностей выбираемых древесных пород для озеленения территории дошкольных учреждений можно получить положительный желаемый результат. Только при произрастании в благоприятных условиях растение способно выполнять свои функции (декоративную, защитную, оздоровительную, рекреационную, защитную и т.п.).

Гармоничное развитие ребенка – дошкольника не представляется возможным без тесной связи с природой. Экологическое воспитание служит мощным средством познания закономерности жизни и развития чувства прекрасного. Правильное размещение зеленых насаждений на территории дошкольного учреждения способствует общению с природой и, в значительной мере, давая разрядку растущему человеческому организму, снижает нагрузки.

Библиографический список

1. Горохов В.А. Городское зеленое строительство: Учеб. пособие для вузов. М.: Стройиздат, 1991. 416 с.
2. Рубцов Л.И. Деревья и кустарники в ландшафтной архитектуре: справочник / Л.И. Рубцов; изд-во «Наукова думка», 1977. – 270 с.
3. Тарасова И.Н., Брезинская Л.В., Тарасова В.В. Организация и планирование садово-паркового и ландшафтного строительства: учебное пособие / отв. ред. И. Н. Тарасова. М-во образования и науки Рос. Федерации, Федер. гос. бюджет. образоват. учреждение высш. проф. образования "Сиб. гос. технол. ун-т". Красноярск: [СибГТУ], 2013. 143 с.
4. Горохов В.А. Зеленая природа города. Садово-парковое искусство России: учебное пособие. М.: Архитектура-С. ISBN 978-5-9647-0226-9. Т. II. 2012. 588 с.
5. Озеленение населенных мест: справочник / В.И. Ерохина, Г.П. Жеребцова, Т.И. Вольфтруб; под ред. В. И. Ерохиной. М.: Стройиздат, 1987. 480 с.

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ФОСФАТОВ АКТИВНЫМ ИЛОМ

Хабибуллина А.Р., Лядов Ф.В., Самойленко М.М., Джо-Мадугу А.С., Вдовина Т.В.,
Сироткин А.С.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия.

Аннотация. Проведен анализ степени влияния факторов среды на биологическую дефосфатацию сточных вод. На основании статистически обработанных производственных данных выявлено что температура, активная реакция среды, доза ила и концентрация органических веществ оказывают незначительное влияние на процесс поглощения фосфат-ионов микроорганизмами активного ила. При этом показана существенная зависимость эффективности дефосфатации от успешного протекания процесса нитрификации и концентрации растворенного кислорода.

Ключевые слова: сточные воды, фосфат-ионы, дефосфатация, регрессионная модель.

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF EXTERNAL FACTORS ON THE EFFICIENCY OF PHOSPHATE REMOVAL WITH ACTIVE SLUDGE

Khabibullina A.R., Lyadov F.V., Samoilenko M.M., Jo-Madugu A.S., Vdovina T.V., Sirotkin A.S.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia.

Abstract. An analysis of the degree of influence of environmental factors on the biological phosphate removal of wastewater was carried out. On the basis of statistically processed production data, it was revealed that the temperature, the active reaction of the medium, the dose of sludge and the concentration of organic substances have an insignificant effect on the process of absorption of phosphate ions by microorganisms of activated sludge. At the same time, a significant dependence of the efficiency of phosphate removal on the successful flow of the nitrification process and the concentration of dissolved oxygen was shown.

Keywords: wastewater, phosphate ions, phosphate removal, regression model.

Биологическая очистка сточных вод от соединений фосфора происходит в процессе его удаления с биомассой избыточного активного ила, в составе которого присутствуют, в том числе бактерии, способные накапливать фосфор в виде полифосфатов в гранулах волютина, причем количество аккумулированного фосфора значительно превышает потребности самих бактерий [1]. Успешное протекание процесса накопления бактериями полифосфатов предполагает чередование кислородных режимов, а также регулирование ряда параметров, представленных в таблице 1.

Таблица 1 – Условия протекания аккумуляции фосфат-ионов микроорганизмами [2]

Параметр	Значение
Температура, °С	10-30
Активная реакция среды, рН	7-9
Концентрация растворенного кислорода, мг/дм ³	2-4
Количество органических веществ	ХПК:Р _{общ} = 45:1 и более БПК ₅ :Р _{общ} = 20:1 и более
Количество нитрат-ионов	ХПК:N-NO ₃ = 6:1 и более
Возраст активного ила, сут.	3-25

Цель данной работы состоит в оценке влияния факторов среды на биологическую дефосфатацию сточных вод в узлах биологической очистки городских очистных сооружений. Степень влияния каждого из параметров оценивалась на основании лабораторных данных очистных сооружений АО «ЗВКС» (г. Зеленодольск, Россия).

Для подтверждения гипотезы о влиянии вышеперечисленных факторов на фосфатаккумуляционную способность бактерий в составе активного ила были рассчитаны коэффициенты корреляции для каждого из рассмотренных параметров – факторов среды [3]. Количество анализируемых факторов равно 6, следовательно, минимальное количество точек для определения коэффициентов корреляции составляет 64 точки [4]. Результаты расчетов приведены в таблице 3.

Таблица 2 – Коэффициенты корреляции параметров, влияющих на микробную фосфатаккумуляцию

Параметр	Минимальное значение	Максимальное значение	Коэффициент корреляции
Температура, °С	11	26	-0,027
Активная реакция среды, рН	7	7,7	-0,106
Концентрация растворенного кислорода, мг/дм ³	2,03	4,0	-0,268
Доза ила, мг/дм ³	1,5	4,0	-0,127
Концентрация органических веществ по БПК ₅ , мг/дм ³	152	985	0,112
Коэффициент нитрификации (K _N)	0,004	0,518	0,084

Согласно результатам, приведенным в таблице 3, наибольшее значение коэффициента корреляции (по модулю) соответствует концентрации растворенного кислорода, что говорит о большой значимости данного параметра для эффективности дефосфатации. Однако, довольно низкие числовые значения коэффициентов корреляции каждого параметра по отдельности, обуславливают необходимость более детальной обработки лабораторных данных с определением коэффициентов регрессии для каждого фактора.

Для построения регрессионной модели были исключены такие параметры, как температура и активная реакция среды, как слабо влияющие и взаимовлияющие факторы. Для оставшихся факторов был произведен расчет линейных коэффициентов регрессии с помощью пакета программ МО Excel [5]. Уравнение регрессии для достижения максимальной эффективности в пределах 90-100% имеет вид (формула 1).

$$\varepsilon = 92,003 - 0,603 \cdot [O_2] + 0,880 \cdot [ДИ] + 0,002 \cdot [БПК_5] + 3,190 \cdot K_N, \quad (1)$$

где ε – эффективность биологической дефосфатации, %; $[O_2]$ – концентрация растворенного кислорода, мг/дм³; $[ДИ]$ – доза ила, мг/дм³; $[БПК_5]$ – концентрация органических веществ, мг/дм³; K_N – коэффициент нитрификации.

Данное выражение справедливо для изменения параметров в следующих диапазонах: концентрация растворенного кислорода 2-4 мг/дм³; доза ила 1,7-2,9 мг/дм³; концентрация органических веществ 172-411 мг/дм³; коэффициент нитрификации 0,009-0,325.

Значения коэффициентов регрессии (урав.1) позволяют определить степень и характер зависимости эффективности дефосфатации от каждого фактора с учетом многофакторности процесса. Так, коэффициент регрессии перед концентрацией растворенного кислорода указывает на обратно пропорциональную зависимость с незначительной степенью влияния. При этом коэффициент регрессии перед коэффициентом нитрификации описывает зависимость как прямую и значительную по величине, что свидетельствует о взаимосвязи успешного протекания процессов нитрификации и микробной дефосфатации. Последнее может быть связано с тем, что образующиеся в процессе нитрификации нитрат-ионы используются в дальнейшем денитрифицирующими бактериями, которые согласно литературным данным обладают способностью к фосфатаккумуляции [2].

Таким образом, мониторинг работы очистных сооружений по удалению фосфат-ионов показал, что на микробную фосфатаккумуляцию могут оказывать влияние концентрация растворенного кислорода, степень нитрификации, температура, активная реакция среды, доза ила, концентрация органических веществ. С целью оценки степени влияния каждого из перечисленных факторов в ходе анализа лабораторных данных за 2020-2021 года были определены коэффициенты корреляции и регрессии, на основании которых выявлены значительные прямое влияние на эффективность биологической дефосфатации процесса нитрификации и обратное – с концентрацией растворенного кислорода.

Библиографический список

1. Дубовик О.С., Маркевич Р.М. Совершенствование биотехнологии удаления азота и фосфора из городских сточных вод // Труды БГТУ. 2016. – №4. – С. 232-238
2. Харькина О.В. Эффективная эксплуатация и расчет сооружений биологической очистки сточных вод / О. В. Харькина. – Волгоград: Панорама, 2015. – 433 с.
3. Бараз В. Р. Использование MS Excel для анализа статистических данных: учеб. пособие / В. Р. Бараз, В. Ф. Пегашкин; М-во образования и науки РФ; ФГАОУ ВПО «УрФУ им. первого Президента России Б.Н.Ельцина», Нижнетагил. техн. ин-т (филиал). – 2-е изд., перераб. и доп. – Нижний Тагил: НТИ (филиал) УрФУ, 2014. – 181 с.
4. Макаричев Ю.А. Методы планирование эксперимента и обработки данных: учеб. пособие / Ю.А. Макаричев, Ю.Н. Иванников – Самара: Самар.гос. техн. ун-т, 2016. – 131 с.: ил.
5. Спирин Н.А. Методы планирования и обработки результатов инженерного эксперимента: Учебное пособие / Н.А. Спирин, В.В. Лавров, Л.А. Зайнуллин, А.Р. Бондин, А.А. Бурькин; Под общ. ред. Н.А. Спирина. – Екатеринбург: ООО «УИНЦ», 2015. – 290 с.

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ БИОЦЕНОЗА АКТИВНОГО ИЛА

Хасанова А.А., Перушкина Е.В., Сироткин А.С.

Казанский национальный исследовательский технологический университет, Казань, Россия

Аннотация. Исследование микробных сообществ в искусственных экосистемах актуально при разработке технологий очистки сточных вод с глубоким удалением соединений фосфора. Для активного ила очистных сооружений г. Зеленодольск удельная фосфатаккумулирующая способность составила 9,3 мг PO_4^{3-} /гАСБ. Установлено, что дегидрогеназная активность ила снижается при достижении концентрации растворенного кислорода 4,5 мг/дм³ при моделировании биологической дефосфатации сточных вод в лабораторных условиях.

Ключевые слова: активный ил, биологическая дефосфатация, фосфатаккумулирующие микроорганизмы, сточные воды, эвтрофикация.

INFLUENCE OF WASTEWATER DEPHOSPHATATION CONDITIONS ON ENZYMATIC ACTIVITY OF ACTIVATED SLUDGE BIOCECENOSIS

Khasanova A.A., Perushkina E.V., Sirotkin A.S.

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

Abstract. The study of microbial communities in artificial ecosystems is relevant in the development of wastewater treatment technologies with deep removal of phosphorus compounds. For the activated sludge from the treatment facilities in Zelenodolsk, the specific phosphate accumulating capacity was 9.3 mg PO_4^{3-} /gADB. It has been established that the dehydrogenase activity of the sludge decreases when the concentration of dissolved oxygen reaches 4.5 mg/dm³ when modeling the biological dephosphatation of wastewater in laboratory conditions.

Keywords: Activated sludge, biological dephosphatation, phosphate-accumulating microorganisms, wastewater, eutrophication.

Избыточное поступление биогенных элементов в водные объекты оказывает существенное влияние на степень их трофности, способствуя развитию процесса эвтрофикации с превышением скорости продукции по отношению к деструкции. Впоследствии в водных системах осуществляется рост сине-зеленых водорослей, повышается мутность и усиливается процесс гипоксии в глубоких частях водоемов [1]. Источником поступления соединений азота и фосфора в водные объекты являются недостаточно очищенные коммунально-бытовые стоки, сбрасываемые очистными сооружениями. В настоящее время концентрация фосфатов в загрязненных водах составляет не более 10-15 мг/дм³ для РФ и 7-10 мг/дм³ для западноевропейских стран [2].

Одной из современных технологий интенсивной биологической дефосфатации сточных вод является EBPR [3]. Рассматриваемый процесс основан на рециркуляции биомассы в анаэробных и аэробных зонах биореактора в условиях оптимальных значений температуры и рН. Микроорганизмы в составе биоценоза активного ила, осуществляющие процесс удаления фосфат-ионов из сточных вод, относятся к фосфатаккумулялирующим бактериям (ФАБ). Это аэробные гетеротрофные бактерии, способные на стадии анаэробно-анаэробного преобразования легкоусвояемые органические соединения в полимеры – полигидроксиполыфосфаты. Энергия, необходимая для их усвоения, вырабатывается в результате гидролиза фосфодиэфирных связей, входящих в состав полифосфатов [4].

В одном из первых исследований, посвященных изучению ФАБ, были идентифицированы бактерии рода *Acinetobacter* класса *Gammaproteobacteria* [5]. Согласно результатам Barker и Dold бактерии р. *Acinetobacter* впервые были предложены в качестве типичных представителей ФАБ. С помощью методов флуоресцентной *in situ* гибридизации и библиотеки клонов на основе 16S рРНК доказано, что способность к биоаккумуляции соединений фосфора выявлена у различных филогенетических групп: рр. *Accumulibacter*, *Pseudomonas*, *Tetrasphaera*, *Microthrix*, *Bacillus*, *Escherichia* и многие другие [6]. Известны примеры обнаружения гранул полифосфатов (волютина) размером около 20 нм в клетках мутантного штамма *Escherichia coli*, идентифицированные методом электронной микроскопии [7]. В других работах сообщается о штамме *Rhodospirillum rubrum*, содержащем полифосфаты размером около 100 нм, как и в случае *Pseudomonas aeruginosa* [8]. Отмечено, что фосфаты накапливаются в ацидокальцисомах у *Agrobacterium tumefaciens* [9].

Исследование активности микробных сообществ ФАБ в искусственных экосистемах представляет особый интерес для специалистов-экобиотехнологов, разрабатывающих технологические приемы интенсификации процесса глубокого удаления соединений фосфора в составе сточных вод, поступающих на биологические очистные сооружения. Так, применение реагентных препаратов в аэротенке влияет на микробиологический состав сообщества и в большинстве случаев приводит к снижению численности диазототрофных, фосфатмобилизующих, актинобактерий, микромицетов и др. [10].

Целью работы являлась оценка дегидрогеназной активности биоценоза активного ила в процессе биологической дефосфатации сточных вод.

Объектом исследования выступил активный ил, отобранный из аэротенка технологической линии биологических очистных сооружений (БОС) г. Зеленодольск.

В результате проведения морфологического анализа микробного сообщества активного ила экспериментально были обнаружены: круглоресничные инфузории *Peritricha*, *Aspidisca costata*, *Opalina*, *Notommata ansata*, *Rotathria marcoceria*, *Calthypha luna*, *Carchesium spectabile*, *Epistylis plicatilis*, *Nematoda*, *Bodo* и другие.

В лабораторных условиях были проведены модельные эксперименты по изучению процесса дефосфатации сточных вод. Установлено, что при изменении массовой концентрации растворенного кислорода в диапазоне 4,5-8,2 мг/дм³ удельная дефосфатирующая способность активного ила составила в среднем 9,3 мгPO₄³⁻/гАСБ.

В ходе моделирования процесса биологической дефосфатации осуществлялось измерение дегидрогеназной активности (ДГА) агрегатов микробного сообщества. В качестве субстратов для проведения эксперимента была выбрана модельная сточная вода и водопроводная вода, согласно описанной методике [11].

В состав модельной сточной воды вносили органические источники углерода (глицерин, сахара, крахмал), фосфат калия двузамещенный (концентрация фосфатов в среде составила 20 мг/дм³).

Установлено, что исходная суспензия активного ила из аэротенка БОС отличалась высокой активностью ферментов группы дегидрогеназ, ДГА составила 20,5 мгф/гАСБ. Однако при использовании в качестве субстрата модельного раствора сточной воды и водопроводной воды отмечается снижение дегидрогеназной активности микроорганизмов на 26% и 20%, соответственно. Это свидетельствует о том, что полное биоокисление органических загрязнений сточных вод не достигнуто.

Условия проведения модельного эксперимента отличались последовательным изменением режимов аэрации опытных систем. После аэрирования исследуемой системы в течение 2 часов отмечено увеличение ДГА при культивировании активного ила в среднем на 4,6 мгф/гАСБ. Таким образом, процесс биологического удаления загрязняющих веществ из сточной воды завершился, но восстановление активного ила не произошло. Последующее прекращение принудительной аэрации системы привело к снижению ДГА ила до первоначального значения (в среднем 22,05 мгф/гАСБ).

Важным элементом технологического подхода биологической дефосфатации сточных вод является возобновление аэрации среды на последней стадии очистки. После 2-часовой стадии культивирования микробного сообщества в аэробных условиях (концентрация растворенного кислорода в среднем 5 мг/дм³) ДГА активного ила увеличивается в модельной сточной воде в среднем на 56 % по сравнению с исходной суспензией. Это свидетельствует о том, что в системе отсутствуют токсичные соединения и активно происходит биосорбция и биоокисление загрязнителей сточных вод.

Таким образом, в микробном сообществе активного ила из аэротенка традиционной схемы биологических очистных сооружений присутствуют микроорганизмы, способные к фосфатаккумуляции для удаления соединений фосфора. Моделирование процесса ЕРВР в лабораторных условиях позволило оценить удельную фосфатаккумуляционную способность ила. Изменение кислородного режима в процессе культивирования активного ила повлияло на активность ферментов групп дегидрогеназ. Снижение дегидрогеназной активности отмечено на стадии прекращения принудительной аэрации, что часто связано с развитием нитрифицирующих бактерий, которые чувствительны к содержанию растворенного кислорода в среде. Ферментативная активность бактерий повышается при аэрировании опытной системы, так как доля гетеротрофных микроорганизмов в активном иле остается достаточно высокой.

Библиографический список

1. Role of phosphate-accumulating bacteria in biological phosphorus removal from wastewater / A. G. Dorofeev [et al.] // *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2020. №56. P. 1-14.
2. Петухова Е.О., Ручкинова О.И. Дефосфатация сточных вод // *Прикладная экология. Урбанистика*. 2017. №2. С. 123-141.
3. Zhiguo Y., Steven P., Damien J. Phosphorus recovery from wastewater through microbial processes // *Current Opinion in Biotechnology*. 2012. №23. P. 878-883.
4. Mino T., Van Loosdrecht M.C.M., Heijnen J. Microbiology and biochemistry of the enhanced biological phosphate removal process // *Water Res.* 1998. № 11. P. 3193-3207.

5. Fuhs G.W., Chen M. Microbiological basis of phosphate removal in the activated sludge process for the treatment of wastewater // *Microb. Есопрекращения принудительной аэрации*. 1975. № 2. P. 119–138.
6. Seviour R.J., Mino T., Onuki M. The microbiology of biological phosphorus removal in activated sludge systems // *FEMS Microbiol. Rev.* 2003. №1. P. 99-127.
7. Bacterial phosphate metabolism and its application to phosphorus recovery and industrial bioprocesses / R. Hirota [et al.] // *Journal of bioscience and bioengineering*. 2010. №5. P. 423-432.
8. The Anaerobic Regulatory Network Required for *Pseudomonas aeruginosa* Nitrate Respiration / K. Schreiber [et al.] // *Journal of Bacteriology*. 2007. №189. P. 4310-4314.
9. The H(+)-pyrophosphatase of *Rhodospirillum rubrum* is predominantly located in polyphosphate-rich acidocalcisomes / M. Seufferheld [et al.] // *J. Biol. Chem.* 2004. №279. P. 51193-51202.
10. Состав микробного сообщества активного ила в процессах совместной биологической и реагентной очистки сточных вод / Л.М. Сибиева [и др.] // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2019. №2. С. 302-311.
11. Залетова Н. А., Залетов С. В. Изучение отклика дегидрогеназной активности ила на изменение технологических параметров работы аэротенка // *Водоснабжение и санитарная техника*. 2020. № 1. С. 22-26.

***CLOSTRIDIUM SPP.*, КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИКРОБНЫЕ ИНДИКАТОРЫ
МИНЕРАЛИЗАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ
В СОСТАВЕ ДОННЫХ ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ**

Чечкова Н.А.

Петрозаводский государственный университет, Петрозаводск, Россия.

Аннотация. Оценено разнообразие *Clostridium spp.*, обнаруженных в составе микрофлоры донных отложений северной части Ладожского озера. Для микробиологического анализа использовано 13 образцов донных отложений, отличающихся глубиной и слоем залегания, содержанию минеральных и органических фракций. Полученные первичные данные могут быть использованы для разработки микробных индикаторов интенсивности минерализации органических загрязнителей различного происхождения на дне поверхностных водоемов.

Ключевые слова: анаэробы, донные отложения, микробные индикаторы, органическое загрязнение, *Clostridium spp.*

***CLOSTRIDIUM SPP.* AS PROMISING MICROBIAL INDICATORS OF
MINERALIZATION OF ORGANIC SUBSTANCES
IN THE COMPOSITION OF BOTTOM SILT SEDIMENTS**

Chechkova N.A.

Petrozavodsk State University, Petrozavodsk, Russia

Abstract. The diversity of *Clostridium spp.* found in the microflora of bottom sediments in the northern part of Lake Ladoga was assessed. For microbiological analysis, 13 samples of bottom sediments were used, differing in depth and layer of occurrence, content of mineral and organic fractions. The primary data obtained can be used to develop microbial indicators of the intensity of mineralization of organic pollutants of various origins at the bottom of surface water bodies.

Keywords. anaerobes, bottom sediments, microbial indicators, organic pollution, *Clostridium spp.*

К одному из опасных воздействий на поверхностные водоемы можно отнести увеличение нагрузки органического вещества на дно, связанное со снижением растворенного кислорода и изменением окислительно-восстановительного потенциала донных отложений. При повышении потока органических веществ в отложениях формируются гипоксические условия, что пагубно влияет на гидробионты, вызывает развитие эвтрофикации и может создавать элективные условия для эпидемически значимых микроорганизмов, которые легко сорбируются на взвешенных в воде частицах, оседают и накапливаются на дне.

Считают, что это связано с высокими показателями выживаемости микроорганизмов в донных отложениях по сравнению с толщей воды из-за отсутствия абиотических (ультрафиолетового излучения, присутствия токсичных соединений) и биотических факторов (хищничества, паразитизма, низкой доступности питательных веществ), которые в поверхностных водах действуют синергически, подавляя рост бактерий [1-7]. В поверхностных слоях донных отложений встречается наибольшее количество органического вещества, чем на глубине за счет чего с увеличением слоя донных отложений создаются специфические условия для обитания различных видов факультативно облигатных и облигатных анаэробов [8, 9] к которым относятся и представители рода *Clostridium spp.* – грамположительные, хемоорганогетеротрофные, облигатно анаэробные бактерии с протеолитической и липолитической активностью [10]. По таксономическому профилю клостридии относятся к Domain: *Bacteria*, Phylum: *Firmicutes*, Class: *Clostridia*, Order: *Clostridiales*, Family: *Clostridiaceae*, Genus: *Clostridium*. В процессе роста на селективных средах микроорганизмы редуцируют сульфит до сульфида, который в реакции с ионами железа образует черный преципитат в зонах роста и развития клостридий. На агаризованных средах формируют колонии S-формы с ровным краем и гладкой поверхностью и R-формы с неровным краем и шероховатой поверхностью. Споры овальные или сферические с терминальным, субтерминальным и центральным расположением в клетке. Характерным признаком для представителей рода является полиморфизм при спорообразовании. Акцент на исследовании клостридий в составе микрофлоры донных отложений связан с тем, что они широко распространены в природе и обладают способностью адаптироваться к различным средам обитания [11].

Для изучения особенностей распределения представителей рода *Clostridium spp.* в составе микрофлоры донных отложений выполняли выделение клостридий в чистую культуру и оценивали их вклад в общую долю микробного сообщества донных отложений в зависимости от глубины и слоя залегания, содержания минеральных и органических фракций. С этой целью использованы 13 образцов донных отложений, сформировавшихся в северной части Ладожского озера в Сортавальском заливе и заливе Хиденселькя и отличающихся по глубине залегания (20, 30 и 42 м), слою донных отложений (0– 22 см) и характеристикам фракций (минеральные фракции, глинистые пылеватые минеральные фракции, органические фракции в виде мелкого детрита, ил). Фракции донных отложений оценивали согласно ГОСТ 17.1.2.04-77 Охрана природы. Гидросфера. Микробиологический анализ отобранных образцов донных отложений выполняли в лабораторных условиях согласно Методики изучения биогеоценозов внутренних водоемов (1975) [12]. Для исследования использовали навеску донных отложений в количестве 100 мг, которую помещали в 100 мл стерильного физиологического раствора для дальнейшего десятикратного разведения. Выделение клостридий проводили из последних трёх разведений в микроанаэроостате «АЭ-01» с использованием газогенерирующих пакетов «Анаэрогаз» [13]. Основными компонентами питательной среды для выделения клостридий служили, г/л: панкреатический гидролизат казеина – 15.0; дрожжевой экстракт -10.0; цитрат железа – 1.0; натрия сульфит – 0.5; агар микробиологический – 17.0. До рода микроорганизмы определяли по фенотипическим признакам, регламентированным в Определителе бактерий Берджи (1997) [14].

По данным микробиологического анализа, во всех образцах донных отложений, сформировавшихся в Сортавальском заливе и в заливе Хиденселькя Ладожского озера,

присутствовали клостридии. На сульфитном агаре выделенные культуры вызывали формирование черного преципитата (рис. 1).



Рисунок 1 – Культуральный рост клостридий на сульфитном агаре.

На фиксированных и окрашенных по Граму препаратах присутствовали грампозитивные спорогенные палочки, расположенные одиночно, парами или короткими цепочками. Средний размер клеток составлял $3-10 \times 0.4-1.2$ мкм.

Распределение доли клостридий в зависимости от глубины залегания и слоя донных отложений представлено на лепестковых диаграммах с маркерами (рис. 2 – 4), используемых для сравнения относительной доли исследуемых микроорганизмов в общую структуру микробного сообщества донных отложений. На 20- метровой глубине залегания донных отложений было изучено 3 горизонта: 0-4 см, 4-9 см, 9-14 см. В составе перечисленных горизонтов донные отложения были представлены минеральными фракциями в виде среднего песка размером 0.25-0.50 мм и органическими фракции в виде мелкого детрита. Процент клостридий, обнаруженных на 20-метровой глубине изменялся от 1.20 до 2.28%. Наибольшая доля клостридий соответствовала слою донных отложений 9-14 см (рис. 2).



Рисунок 2 – Доля клостридий в составе микробного сообщества донных отложений на глубине 20 м залегания.

При увеличении глубины залегания донных отложений до 30 метров обнаружено изменение не только состава фракций донных отложений, но и доли клостридий в структуре сообщества в зависимости от величины слоя донных отложений (рис. 3).

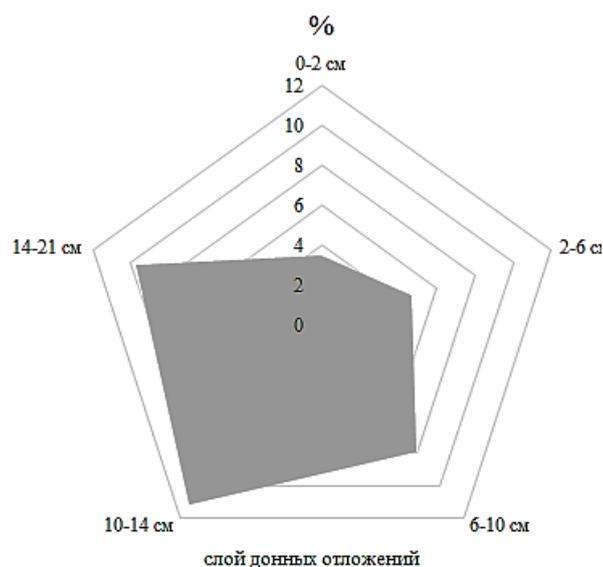


Рисунок 3 – Доля клостридий в составе микробного сообщества донных отложений на глубине 30 м залегания.

На глубине 30 м донные отложения состояли из глинистых пылеватых минеральных фракции размером менее 0.05 мм с преобладанием органических фракций в виде ила и представляли 5 горизонтов: первый – 0-2 см, второй – 2-6 см, третий – 6-10 см, четвертый – 10-14 см, пятый – 14-21 см. Минимальная доля клостридий – 3.5% соответствовала первому слою, а максимальная – 11.2% была обнаружена в четвертом слое донных отложений.

На 42-метровой глубине донных отложений доля клостридий от общего состава микробного сообщества изменялась от 2.5% до 22.4%. На указанной глубине донные отложения состояли, в основном, из органических иловых фракций и были исследованы на 5 горизонтах: первый – 0-3 см, второй – 2-7 см, третий – 7-12 см, четвертый – 12-17 см, пятый – 17-22 см. Наименьшая доля клостридий – 2.5% соответствовала первому горизонту, а наибольшая – 22.4% была обнаружена в четвертом горизонте донных отложений (рис. 4).

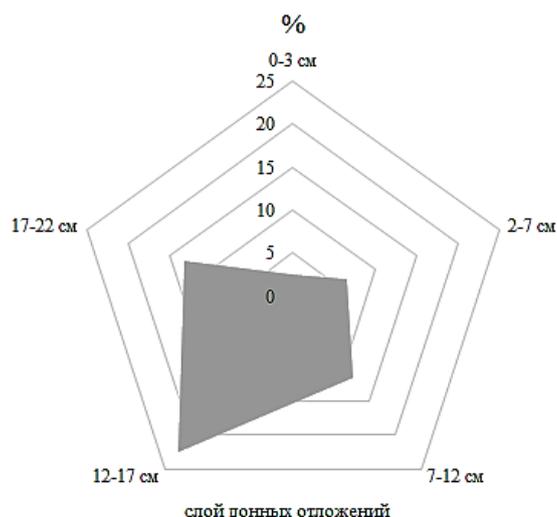


Рисунок 4 – Доля клостридий в составе микробного сообщества донных отложений на глубине 42 м залегания.

Работа выполнена при поддержке гранта Главы Республики Карелия на 2022 год, проект №. КГРК-21/НЗ-12.

Библиографический список

1. Jones G. E. Effect of chelating agents on the growth of *Escherichia coli* in seawater // *J. Bacteriol.* – 1964. – № 87. – P. 484-499.
2. Enzinger E. M., Cooper R. C. Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters // *Appl Environ Microbiol.* – 1976. – № 31. – P. 758-763.
3. Bitton G., Henis Y., Lahav N. Effect of Several Clay Minerals and Humic Acid on the Survival of *Klebsiella aerogenes* Exposed to Ultraviolet Irradiation // *Appl Microbiol.* – 1972. – № 23. – P. 870-874.
4. Roper M. M., Marshall K. C. Effects of salinity on sedimentation and of particulates on survival of bacteria in estuarine habitats // *Geomicrobiol J.* – 1979. – №1. – P.103-116.
5. Ghoul M., Bernard T., Cormier M. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine betaine from marine sediment // *Appl Environ Microbiol.* – 1986. – № 56:55. – P.551-554.
6. Gauthier M. J., Munro P. M., Breittmayer V. A. Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *Escherichia coli* in seawater // *Can J Microbiol.* – 1989. – № 35. – P. 379-383.
7. Davies C. M., Julian A., Long H., Donald M., Ashbolt N. J. Survival of faecal microorganisms in marine and freshwater sediments // *Appl Environ Microbiol.* – 1995. – № 61. – P.1888-1896.
8. Cavallo R. A., Latorre F., Acquaviva M. I., Montagna M. T., Mele M. S. Indicatori microbiologici di inquinamento: corrispondenzaacqua-sedimenti del Mar Piccolo di Taranto // *Inquinamento.* – 1996. – № 3. – P. 54-57.
9. Li J., Purdy K.J., Takii S., Hayashi H. Seasonal changes in ribosomal RNA of sulphate-reducing bacteria and sulphate reducing activity in a freshwater lake sediment // *FEMS Microbiol Ecol.* – 1999. – № 28. – P. 31-39.
10. Емцев В.Т. Ассоциации анаэробных бактерий почв различных типов. В сборнике: Микробные сообщества и их функционирование в почве.– Киев: Наукова Думка. – 1981. – С. 23-30.
11. Skanavis C., Yanko W.A. *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the Presence of Sewage Solids in Marine Sediments // *Mar Pollut Bull.* – 2001. – № 42. – P. 31-35.
12. Методика изучения биогеоценозов внутренних водоемов. – Москва: Наука. – 1975. – 239 с.
13. Соловьев Л. Б. Изучение сухой споровой культуры *Clostridium chauvoei* для проверки иммуногенной активности вакцин против эмфизематозного карбункула // Дисс. канд. вет. наук / Л.Б. Соловьев – Москва, 1970. – С.173.
14. Определитель бактерий Берджи / Под ред. Дж. Хоулта. – Москва: Мир. – 1997. – 444 с.

ДЕГРАДАЦИЯ МАЛЫХ ВОДОТОКОВ, КАК ОДНА ИЗ ГЛАВНЫХ ПРОБЛЕМ ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ

Чуканов А.К.

*Владимирский государственный университет имени А.Г. и Н.Г. Столетовых, Владимир,
Россия*

Аннотация. В работе рассматривается проблема деградации малых водотоков во Владимирской области. Рассмотрены основные причины их исчезновения, а также выявлены источники загрязнения малых рек. Отдельное внимание уделяется проблеме чистоты воды в верхних звеньях речной системы, так как они во многом определяют чистоту воды в средних и крупных реках региона.

Ключевые слова: малые реки, экологическая проблема региона, деградация, источники загрязнения.

DEGRADATION OF SMALL WATERCOURSES AS ONE OF THE MAIN PROBLEMS OF THE VLADIMIR REGION

Chukanov A.K.

Vladimir State University named after A.G. and N.G. Stoletov, Vladimir, Russia

Annotation. The paper considers the problem of degradation of small watercourses in the Vladimir region. The main causes of their disappearance are considered, as well as the sources of pollution of small rivers are identified. Special attention is paid to the problem of water purity in the upper links of the river system, as they largely determine the purity of water in medium and large rivers of the region.

Keywords: small rivers, ecological problem of the region, degradation, sources of pollution.

Одним из важнейших элементов речной системы являются малые реки, которые представляют собой верхние звенья речной системы. Критерием отнесения реки к малой служит ее длина, площадь водосборного бассейна и количество воды. Таким образом, все реки, длина которых менее 250 км, площадью водосбора менее 10 тыс. кв. км, считаются малыми. Все они имеют особый характер гидрологических процессов и определенные возможности хозяйственного использования природных ресурсов.

Важно отметить, что малые реки являются самостоятельными лотическими экосистемами, которые обеспечивают средорегулирующие функции в геосистемах. В то же время эти реки являются одной из наиболее уязвимых и хрупких пресноводных систем. Любые изменения качества воды или режима питания рек влияют на русловые процессы и биоценозы [6].

Они формируют более 50% суммарного объема речного стока, определяют характер речной сети бассейнов крупных рек, кроме того в пределах бассейнов малых рек концентрируется почти половина городского населения и более 80% сельского.

Проблема сохранения малых рек региона вызывает тревогу экологов и общественности региона, приобретая все большую актуальность, и это обусловлено целым рядом важных факторов. Первый из них состоит в том, что именно они снабжают водой крупные реки, а также во многом определяют их экологическую чистоту. Эти вопросы являются актуальными для Владимирской области.

Речная сеть Владимирского региона представлена 746 реками общей протяжённостью около 8,6 тыс. км (густота речной сети 0,3 км/км²), большая часть которых относится к малым рекам. Согласно данным Департамента природопользования, малых рек в области стало значительно меньше, тогда как 50-60 лет назад было в два раза больше.

Негативная экологическая обстановка в бассейнах малых рек области резко обострилась в течение последних 10-15 лет. Происходит истощение их водных ресурсов, существенное ухудшение качества вод и часто даже необратимая деградация и отмирание. Согласно последним данным отдела водных ресурсов Департамента природопользования Владимирского региона, в области наблюдается дефицит гидростовов: если на крупных реках их около 10, то на малых реках нет вообще, таким образом контроль за их стоянием не ведется и данной проблемой никто не занимается, поэтому многие реки на сегодняшний день либо вовсе пересохли, либо близки к этому, кроме того свыше 30% малых рек региона по экотоксикологической характеристике являются грязными. Основной причиной уменьшения количества малых рек, это высокий уровень антропогенной нагрузки, которую они испытывают [5].

Антропогенное влияние выражается в развитии промышленных производств и расширении сельскохозяйственных угодий в регионе, которые испытывают потребность в ресурсной базе для своего существования. Таким образом, максимально приближенные к мощным потребителям, малые реки не могут сдержать своим потенциалом самоочищения мощного потока техногенных нагрузок [1].

Как правило, хозяйственная деятельность человека непосредственным образом затрагивает не только русловую часть малой реки на всем ее протяжении, но и водосборную площадь, поскольку все поселения и подавляющее большинство промышленных предприятий и сельскохозяйственных комплексов располагаются и в большинстве случаев используют открытые водотоки (таблица 1).

Таблица 1 – Главные потребители воды во Владимирской области [3]

Отрасль экономики	Доля потребляемой воды (в %)
Непроизводственные отрасли	46
Машиностроение	25
Электроэнергетика	13,5
Легкая промышленность	11
Химическая и нефтехимическая промышленность	5

Чрезмерный забор воды из рек приводит к нарушению естественного режима речного стока, что вызывает уменьшение скоростей движения воды, и как следствие, заиливание,

зарастание русел; понижение уровня грунтовых вод. С каждым годом, процент воды при заборе увеличивается (таблица 2).

Таблица 2 – Доля некоторых малых рек при водозаборе во Владимирском регионе [3]

Река	Процент воды при водозаборе (в %)
Ворша	4,6
Шерна	3,8
Пекша	2,9
Рпень	2,9
Киржач	1,5
Судогда	2,1

В последнее время снижается качество воды в реках, в том числе и малых реках, от чистоты которых во многом зависит чистота средних и крупных водных артерий. Поступающие в реки различные стоки зачастую сопоставимы по своему объему с объемом стока самой малой реки. В реки сбрасывают отработанные воды предприятия химической, машиностроительной и легкой промышленности, а также предприятий ЖКХ.

Перечень региональных предприятий, лидирующих по объемам сбросов загрязненных сточных вод в области, выглядит так:

- МУП «Владимирводоканал» города Владимира – 29,74 миллиона м³ сточных вод;
- ОАО «Завод им. В.А. Дегтярева» – 15,66 миллиона м³ сточных вод;
- МУП округа Муром «Водопровод и канализация» – 9,20 миллиона м³ сточных вод;
- Муниципальное унитарное водопроводно-канализационное предприятие г. Гусь Хрустальный – 4,24 миллиона м³ сточных вод;
- МУП г. Кольчугино «Коммунальник» – 3,95 миллиона м³ сточных вод;
- МУП «Александров водоканал» МО г. Александров – 3,39 миллиона м³ сточных вод.

Отрицательно сказывается на качестве воды сброс сточных вод от свиноводческих и животноводческих комплексов. Например, экологическая ситуация на реке Большая Липня, которая является притоком Клязьмы, в Петушинском районе, в 2021 году там был зафиксирован сброс отходов местного фермерского хозяйства [7]. Все более значительным фактором, ухудшающим экологическое состояние малых рек, становится сброс в них твердых бытовых отходов, а также попадание фильтрата от многочисленных свалок через подземные воды (таблица 3).

Более 2/3 сточных вод, подвергаются очистке, однако до нормы очищаются всего 3%. Проблема заключается прежде всего в износе очистных сооружений, часть которых устарела и не может качественно производить очистку (рис.1). Примером может служить износ очистных сооружений на реке Ундолка ниже Лакинска, некоторые показатели загрязненности очень высокие.

Таблица 3 – Валовый сброс загрязняющих веществ в некоторые малые реки Владимирской области [3]

Река	Процент загрязняющих веществ (в %)
Шерна	13
Пекша	7,2
Вольга	2,9
Колокша	2,7
Судогда	2,5
Рпень	1,8
Киржач	1,8
Суворощь	1,2



Рисунок – Среднегодовой объем сточных-отведенных вод по Владимирской области.

Таким образом, можно констатировать, экологическая проблема малых рек во Владимирском регионе очень острая, большая часть их испытывает очень высокую антропогенную нагрузку, поэтому водные ресурсы малых рек деградируют, а часть их и вовсе исчезает, проблема носит комплексный характер, поэтому необходимо уделять особое внимание ее решению.

Библиографический список

1. Алтунин В.С., Днейрук В.И., Панкратов В.Ф. Изучение, использование и охрана малых и средних рек. Гидротехническое строительство, 1988 №9
2. Бабкина И. В., Кореньков В. А. Гидрологическое обоснование лицензирования водопользования – необходимое условие сохранения малых рек ЭКО-бюллетень ИнЭКА 2002 № 1
3. Карлович И.А. Экология Владимирской области: Учебное пособие – Владимир: ВГПУ,1998. – 224 с.
4. Михайлов В.Н, Добровольский А.Д., Добролюбов С.А. Гидрология: Учебник для вузов – М.: Высш. шк., 2005. – 463 стр.

5. Новикова Я.Э., Арустамов Э.А., Калинина А.А. О состоянии малых рек в год экологии России [Электронный ресурс] // Отходы и ресурсы: электрон. научн. журн. 2017 №2 , <https://resources.today/PDF/06RRO217.pdf> (дата обращения: 9.10 2022)
6. Ткачев Б.П., Булатов В.И. Малые реки: современное состояние и экологические проблемы = Small rivers: state-of-the act and ecological problems: Аналит. обзор / ГПНТБ СО РАН. – Новосибирск, 2002. – 114 с. – (Сер. Экология. Вып. 64).
7. <https://vladimir-smi.ru/item/494869> [Электронный ресурс] (дата обращения: 9.10 2022)

СОДЕРЖАНИЕ

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Абубакирова А.М., Лутфуллина Г.Ф.

АНТИМИКРОБНЫЕ СВОЙСТВА ЛИПОПЕПТИДОВ БАКТЕРИЙ РОДА *BACILLUS* 4

Алеев В.С., Пьянкова А.А., Плотникова Е.Г.

РАЗЛОЖЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ГАЛОФИЛЬНЫМИ
БАКТЕРИЯМИ СЕМЕЙСТВА *SALINISPHERACEAE* 11

Баташева С.Н., Крючкова М.А.

МОДИФИКАЦИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА СИНТЕТИЧЕСКИМИ
И БИОПОЛИМЕРАМИ..... 16

Волосникова Е.А., Есина Т.И., Сысоева Г.М., Каплина О.Н., Даниленко Е.Д.

ПОЛУЧЕНИЕ НОВЫХ ВАКЦИННЫХ АДЬЮВАНТОВ НА ОСНОВЕ
БЕТА-ГЛЮКАНОВ ДРОЖЖЕЙ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА..... 19

Гапонова И.И., Щетко В.А., Романова Л.В.

НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ
LACTOBACILLUS HELVETICUS 23

Гольшиева А.А., Литвиненко Л.В., Ившина И.Б.

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ *RHODOCOCCLUS RUBER*
ИЭГМ 455 К ХЛОРИДУ РТУТИ..... 28

Горина С.Ю., Гайдина А.С., Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.

РАЗНООБРАЗИЕ ГРИБНЫХ ЦЕЛЛОБИОЗОДЕГИДРОГЕНАЗ: НОВЫЕ ПОДХОДЫ
К ИХ ПОИСКУ И ХАРАКТЕРИСТИКЕ..... 33

*Горовцов А.В., Вибе В.В., Гладкая А.Н., Григоренко В.В., Дубовая Д.Д., Токарева Ф.Ю.,
Вечканов Е.М.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКЦИИ КАРОТИНОИДОВ У ПОЧВЕННЫХ
МИКРООРГАНИЗМОВ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ УФ-ЛУЧЕЙ..... 37

Губейко А.С., Деменчук Т.В., Воробьёва М.М.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ СОВМЕСТНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРОБИОТИКОВ
И АНТИБИОТИКОВ В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*..... 41

Двойнина Е.В., Сарагашев М.В., Соболева О.М.

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ПРЕОДОЛЕНИЯ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ БАКТЕРИЙ..... 46

Додина М.В., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ШТАММА *ESCHERICHIA COLI* K12
И ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *E. COLI* ПРОДУЦИРОВАТЬ АГМАТИН 52

Евстратенко А.Л., Метлева А.С.

ВЛИЯНИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ НА БИОПЛЕНКИ
УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ 56

<i>Елисеева А.Д., Мочалова Е.М. Максимов А.Ю.</i> ФИТОСТИМУЛИРУЮЩАЯ АКТИВНОСТЬ КУЛЬТУРЫ АКТИНОБАКТЕРИЙ <i>RHODOCOCCLUS ERYTHROPOLIS</i> NG28 – ПРОДУЦЕНТА НИТРИЛГИДРАТАЗЫ.....	61
<i>Зырянова П.И., Уласевич С.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА ЧЕРЕЗ ИОННЫЕ КАНАЛЫ.....	65
<i>Инчагова К.С.</i> КОМБИНИРОВАНИЕ 4-ГЕКСИЛРЕЗОРЦИНОЛА С САЛИЦИЛОВОЙ КИСЛОТОЙ И 7-ГИДРОКСИКУМАРИНОМ ПРИВОДИТ К УСИЛЕНИЮ QS- ИНГИБИРУЮЩЕГО ЭФФЕКТА У <i>CHROMOBACTERIUM SUBSTRUGAE</i>	69
<i>Искужина Л.И., Рожина Э.В., Баташева С.Н.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ БАКТЕРИЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ БИОГЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА.....	73
<i>Калашиникова Т.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.</i> ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЕЙ ВНУТРИ- И ВНЕКЛЕТОЧНОГО ГЛУТАТИОНА У <i>ESCHERICHIA COLI</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА ЗАВИСЯТ ОТ СОСТАВА СРЕДЫ.....	77
<i>Кирюхина А.С., Лозовая Т.С., Привалова Е.А., Адамович С.Н.</i> ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ <i>CANDIDA ETHANOLICA</i>	83
<i>Клементьев С.В., Куликова Ю.В., Сироткин А.С.</i> ОЦЕНКА ИНТЕГРАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ВОДНОЙ ФАЗЫ, ПОЛУЧЕННОЙ ПРИ ГИДРОТЕРМАЛЬНОЙ КОНВЕРСИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ОСАДКОВ ОЧИСТНЫХ СООРУЖЕНИЙ.....	87
<i>Комарова Л.П., Ширяева Е.Н., Криворучко А.В.</i> ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ АЛКАН-1- МОНООКСИГЕНАЗ В КЛЕТКАХ <i>RHODOCOCCLUS RUBER</i> ИЭГМ 231	92
<i>Коннова С.А., Фахруллин Р.Ф.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СИЛАН-МОДИФИЦИРОВАННЫХ НАНОТРУБОК ГАЛЛУАЗИТА В СТАБИЛИЗАЦИИ КАПЕЛЬ ВОДНЫХ СУПЕНЗИЙ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР.....	96
<i>Кравченко А.С., Соболева О.М.</i> МЕДИЦИНСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БАКТЕРИЙ РОДА <i>SAMPYLOBACTER</i>	99
<i>Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В.</i> ВКЛАД МЕЛАТОНИНА В ФОРМИРОВАНИЕ Т-ХЕЛПЕРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МАРКЕРЫ TN17/TREG	105
<i>Кулеш П.А., Корсакова Е.С.</i> ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ТЕРЕФТАЛЕВОЙ КИСЛОТЫ <i>PSEUDOMONAS</i> SP. Ю14	110
<i>Макарова М.В., Суслонорова А.Ф., Куюкина М.С.</i> СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ НАНОЧАСТИЦ МЕДИ И ОКСИДА МЕДИ НА ДЗЕТА-ПОТЕНЦИАЛ АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА <i>RHODOCOCCLUS</i>	114

<i>Малыгина Е.В., Моргунова М.М., Имидоева Н.А., Власова А.А., Дмитриева М.Е., Бельшенко А.Ю., Тельнова Т.Ю., Аксёнов-Грибанов Д.В.</i>	
ПЕРВИЧНАЯ ОЦЕНКА СОСТАВА ПРОКАРИОТИЧЕСКИХ СООБЩЕСТВ РОССИЙСКОГО ТРЮФЕЛЕВОГО ГРИБА <i>TUBER MACROSPORUM</i>	119
<i>Мальчевский В.А., Субботин А.М., Петров С.А., Хрупа Д. А.</i>	
РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ УСТОЙЧИВОСТИ К ВЫСОКОМУ ДАВЛЕНИЮ МИКРООРГАНИЗМОВ ШТАММА <i>ASCHROMOBACTER SPANIUS 10-50-TS2</i> , ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ ПРОБ МНОГОЛЕТНЕМЁРЗЛЫХ ПОРОД.....	124
<i>Мандрик М.И., Дмитренко А.А., Суржик Д.В., Арепьева И.Ю., Охремчук А.Э., Валентович Л.Н.</i>	
ОСОБЕННОСТИ СИНТЕЗА АНТИМИКРОБНЫХ МЕТАБОЛИТОВ БАКТЕРИЯМИ <i>RHODOCOCCUS PYRIDINIVORANS 5AP</i>	129
<i>Михайловская В.С., Юдина К.А., Жданова И.Н., Масленникова И.Л., Кузнецова М.В.</i>	
<i>ESCHERICHIA COLI</i> В СПЕКТРЕ МИКРОБНЫХ КУЛЬТУР, ИЗОЛИРУЕМЫХ ОТ ЗДОРОВЫХ И БОЛЬНЫХ МАСТИТОМ КОРОВ.....	132
<i>Нуриева Д.С., Криворучко А.В.</i>	
ВЛИЯНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ БИОПЛЕНОК РОДОКОККАМИ.....	138
<i>Переломов Л.В., Сизова О.И., Мухторов Л.Г., Сиголаева Т.В., Третьякова А.В., Атрощенко Ю.М.</i>	
ПОГЛОЩЕНИЕ СВИНЦА И МЕДИ БАКТЕРИЯМИ <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	143
<i>Прохорова А.А., Ястребова О.В., Плотникова Е.Г.</i>	
ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА-ДЕСТРУКТОРА ФТАЛАТОВ <i>RHODOCOCCUS SP. S6</i>	147
<i>Пьянкова Е.В., Максимова Ю.Г.</i>	
АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫЕ БАКТЕРИИ БИОТОПОВ АНТРОПОГЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СПОСОБНЫЕ ФИКСИРОВАТЬ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ АЗОТ	152
<i>Ренфельд Ж.В., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i>	
ТИПИЧНЫЕ И АЛКАЛОФИЛЬНЫЕ ЛАККАЗЫ: СХОДСТВА И ОТЛИЧИЯ	157
<i>Рожина Э.В., Ахатова Ф.С., Крючкова М.А., Баташева С.Н., Фахруллин Р.Ф.</i>	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОГЕННЫХ СЕРЕБРЯНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.....	161
<i>Сагидуллина В.И., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i>	
ПОЛУЧЕНИЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КЛЕТОК <i>ESCHERICHIA COLI</i> С ВЫСОКОЙ ЛИЗИНДЕКАРБОКСИЛАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ.....	164
<i>Самойлова З.Ю., Сутормина Л.В., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.</i>	
МОДУЛЯЦИЯ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ КИШЕЧНЫХ БАКТЕРИЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРАКТА <i>RHARONTICUM CARTHAMOIDES</i>	169

<i>Субботина М.В., Тюмина Е.А., Бажутин Г.А.</i> АДАПТАЦИИ КЛЕТОК <i>RHODOCOCCLUS CERASTII</i> ИЭГМ 1243 НА МОЛЕКУЛЯРНО-СТРУКТУРНОМ УРОВНЕ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ИБУПРОФЕНА	174
<i>Ташкинова П.А., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.</i> ПОДБОР УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> С ЦЕЛЬЮ УВЕЛИЧЕНИЯ ПРОДУКЦИИ КАДАВЕРИНА.....	180
<i>Тервонен В.В., Сидорова Н.А.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФЛАВОМИЦИНА НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИКРООРГАНИЗМОВ В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ БИОФИЛЬТРА	184
<i>Трушлис Э.В., Мандрик М.И.</i> ДЕГРАДАЦИЯ МОНОЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ БАКТЕРИЯМИ <i>RHODOCOCCLUS PYRIDINIVORANS</i> 5AP.....	191
<i>Ушаков В.Ю., Чурин Г.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.</i> ДИНАМИКА ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ ТИОЛОВ, SO_3^- и H_2S В РАСТУЩИХ КУЛЬТУРАХ <i>VACILLUS SUBTILIS</i> ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ И ГОЛОДАНИИ ПО ИСТОЧНИКУ УГЛЕРОДА И ЭНЕРГИИ	194
<i>Фролов Д.С., Черных А.М., Коломыцева М.П.</i> АММИАК-ЛИАЗЫ АРОМАТИЧЕСКИХ АМИНОКИСЛОТ: ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ, СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА, БИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ И ПРИМЕНЕНИЕ	199
<i>Шелковникова В.Н., Дмитриева М.Е., Малыгина Е.В., Бельшенко А.Ю., Имидоева Н. А., Тельнова Т.Ю., Власова А.А., Рулёва А.Ю., Дмитриев И.А., Емшанова В.А., Коновалов А.С., Аксёнов-Грибанов Д.В.</i> ТЕРМОФИЛЬНЫЙ ШТАММ <i>STREPTOMYCES</i> КАК ПРОДУЦЕНТ ПРИРОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ	206
МЕДИЦИНА, ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА, ИММУНОЛОГИЯ	
<i>Баданина Д.М., Конторщикова К.Н.</i> ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ ПРИ ГЛИАЛЬНЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ГОЛОВНОГО МОЗГА	209
<i>Берсенева А.А., Комарова Л.Н., Выпова Е.Р., Купцова П.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ОЖИРЕНИЯ У СТУДЕНТОВ.....	215
<i>Благодурова А.С., Сафаралиева С.А.</i> СОВРЕМЕННЫЕ ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ГИПОТЕЗЫ СИНДРОМА ХРОНИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ	218
<i>Воробьева А.В., Дробот А.А., Диденко Я.В.</i> ЭКСПРЕССИЯ <i>IL10</i> и <i>TNFα</i> В СЛЮНЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА.....	225

<i>Выпова Е.Р., Комарова Л.Н., Купцова П.С., Берсенева А.А.</i> ИЗУЧЕНИЕ РАДИОПРОТЕКТОРНЫХ СВОЙСТВ ФУМАРАТА 3- ОКСИПИРИДИНА ПРИ ДЕЙСТВИИ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ РАЗНОГО КАЧЕСТВА НА НОРМАЛЬНЫЕ И ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА	230
<i>Гаврин А.А., Терёхина М.Э.</i> РАЗРАБОТКА РЕКОМЕНДАЦИЙ ДЛЯ ТРЕНИРОВОК ПРИ СКОЛИОТИЧЕСКОЙ ДЕФОРМАЦИИ ПОЗВОНОЧНИКА I И II СТЕПЕНИ	234
<i>Дедушенко А.В., Гончарова Ю.С.</i> СОЦИО-ПСИХОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ РИСКА, НАРУШАЮЩИЕ ЗДОРОВЬЕ ЧЕЛОВЕКА	238
<i>Горислав А.А., Мащенко П.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ АФФИННОСТИ УКРОЧЕННЫХ АНАЛОГОВ БОМБЕЗИНА К ГАСТРИН-РИЛИЗИНГ ПЕПТИДНОМУ РЕЦЕПТОРУ	242
<i>Гутина Е.В. Бочкова М.С.</i> ВЛИЯНИЕ КОРОТКИХ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ТРОФОБЛАСТИЧЕСКОГО β -1 ГЛИКОПРОТЕИНА НА МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ КРЫС ПРИ АЛЛОГЕННОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ КОСТНОГО МОЗГА	248
<i>Дробот А.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СОСТОЯНИЯ МИКРОФЛОРЫ ПОЛОСТИ РТА	253
<i>Егидарова Е.Ю., Грудина Н.А., Карасева А.Б., Суворов А.Н., Соколов А.В.</i> ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ АРГИНИН ДЕИМИНАЗЫ STREPTOCOCCUS PYOGENES M22 И АНАЛИЗ ЕЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ	258
<i>Еримбетов К.Т., Обвинцева О.В.</i> РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ УДОВЛЕТВОРЕНИЯ ПОТРЕБНОСТЕЙ В ПОЛНОЦЕННОМ ПИЩЕВОМ БЕЛКЕ	262
<i>Ермаков Е.А., Меламуд М.М., Балахонова Е.А., Степанов Г.А., Невинский Г.А., Бунева В.Н.</i> КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИРКУЛИРУЮЩЕЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК ПРИ ШИЗОФРЕНИИ	266
<i>Жуланова Л.К.</i> ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ ВИРУСНЫМИ ГЕПАТИТАМИ В И С, ОПРЕДЕЛЯЕМЫХ В «ЦЕНТРАЛИЗОВАННОЙ КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ».....	270
<i>Забельникова А.М., Файнгольд И. И., Санина Н.А., Смолина А.В.</i> ОЦЕНКА АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО NO-ДОНОРА ТЕТРАНITРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С ПЕНИЦИЛЛАМИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ НА МЫШИНОЙ МОДЕЛИ КАРДИОТОКСИЧНОСТИ	275
<i>Захарова Ю. В., Отдушкина Л. Ю., Марковская А. А.</i> МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГРИБОВ <i>CANDIDA ALBICANS</i> С БАКТЕРИЯМИ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ	281

<i>Ксенофонтов Д.А., Ксенофонтова А.А.</i> РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ХИМУСА И ПЛОТНОЙ ЭНДОГЕННОЙ ФРАКЦИИ ХИМУСА ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА	286
<i>Кузнецова Э.О., Лащенко Л.И.</i> УДЕЛЬНАЯ ПЛОЩАДЬ ОСТРОВКОВ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КАК МОРФОМЕТРИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ НАРУШЕНИЯ ЕЕ СТРУКТУРЫ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ	292
<i>Куклина Е.М., Глебездина Н.С., Некрасова И.В.</i> ВКЛАД МЕЛАТОНИНА В ФОРМИРОВАНИЕ Т-ХЕЛПЕРНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ, КОЭКСПРЕССИРУЮЩИХ МАРКЕРЫ TH17/TREG	296
<i>Кунцына А. Е., Калюжная Ю.Н., Пугачева М.А., Силачев Д.Н., Демьяненко С.В.</i> НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА НЕЙРОНЫ ГАНГЛИОНОВ ЗАДНИХ КОРЕШКОВ СПИННОГО МОЗГА КРЫСЫ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ СДАВЛИВАНИЕМ	301
<i>Литвинова В.Р., Рудомётов А.П., Шарабрин С.В., Рудомётова Н.Б., Новопашина Д.С., Карпенко Л.И., Ильичёв А.А.</i> ОПТИМИЗАЦИЯ СТРУКТУРЫ мРНК GFR И РАЗРАБОТКА МЕТОДА АНАЛИЗА ЭФФЕКТИВНОСТИ ЕЕ ДОСТАВКИ	306
<i>Лихотворик Ю.Е., Лоркипанидзе А.Е., Каргалинина К.Г.</i> ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ CHRISTENSENELLA MINUTA В КАЧЕСТВЕ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРОБИОТИКА И СРЕДСТВА ДЛЯ БОРЬБЫ С ОЖИРЕНИЕМ	312
<i>Логинова О.А., Орлова Е.Г., Ширшев С.В.</i> ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ГОРМОНОВ ЛЕПТИНА И ГРЕЛИНА В КОНЦЕНТРАЦИЯХ, ХАРАКТЕРНЫХ ДЛЯ БЕРЕМЕННОСТИ, НА ЭКСПРЕССИЮ KI-67 И CD127 ТИМОЦИТАМИ	317
<i>Марущак А. В., Елисейкин А. М., Яковлева А. А.</i> ВЛИЯНИЕ ПОЛА И ВОЗРАСТА НА РАЗВИТИЕ ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ЖИТЕЛЕЙ КУЗБАССА	322
<i>Молчанов И.П., Медведева О.А., Воркуль А.О.</i> МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ТОЛСТОЙ КИШКИ КРЫС WISTAR ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА И СЕЛАНКА	328
<i>Москвина Е.В., Соболева О.М.</i> ПЕРСИСТЕНЦИЯ ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА КАК ФАКТОР РИСКА РАЗВИТИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА II ТИПА	334
<i>Никитина А.П., Панкратов Д.Л.</i> ИЗУЧЕНИЕ ПОТЕНЦИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ СТАФИЦИНА В КОМБИНАЦИИ С РИФАМПИЦИНОМ, ТИКАРЦИЛЛИН+КЛАВУЛАНАТОМ И ФОСФОМИЦИНОМ В ОТНОШЕНИИ НЕКОТОРЫХ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ	340

<i>Оборин Д.А., Годовалов А.П.</i> ОСОБЕННОСТИ СИМБИОТИЧЕСКИХ ВЗАИМООТНОШЕНИЙ <i>NEISSERIA GONORRHOEAЕ</i> В МИКРОБИОТЕ ГЕНИТАЛЬНОГО ТРАКТА	344
<i>Орлова Е.Г., Логинова О.А., Ширшев С.В.</i> ТРАНСФОРМАЦИЯ ФЕНОТИПА НК КЛЕТОК ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ	348
<i>Раззорова Е.А., Чурина Т.С., Горшкова Е.Н.</i> ВЛИЯНИЕ ОБРАБОТАННОГО ИОНАМИ ДВУХВАЛЕТНОГО ЖЕЛЕЗА СЫВОРОТОЧНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛОВ	352
<i>Ракутина М.Н., Ужвиюк С.В., Тимганова В.П.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЛЮМИНОЛ И ЛЮЦИГЕНИН- ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА.....	357
<i>Рахмонов М.Х.</i> ВЛИЯНИЕ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКИ НА ЗДОРОВЬЕ ПОЛОСТИ РТА.....	363
<i>Рахмонов М.Х.</i> БОЛЕЗНЬ БЕХЧЕТА И ЕЕ ПРОЯВЛЕНИЯ В ПОЛОСТИ РТА.....	367
<i>Шамова П.М., Фильштынская В.С., Соболева О.М.</i> СВЯЗЬ МЕЖДУ СОСТОЯНИЕМ МИКРОБИОТЫ КИШЕЧНИКА ЧЕЛОВЕКА И РАЗВИТИЕМ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ	369
<i>Тиунова К.Р., Соболева О.М.</i> БОКАПАРВОВИРУСЫ – НОВОЕ «ЛИЦО» В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА	375
<i>Усанина Д.И., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Шардина К.Ю., Ужвиюк С.В.</i> ВЛИЯНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ГРАФЕНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ АКТИВИРОВАННЫХ Т-ХЕЛПЕРОВ, ПОЛЯРИЗОВАННЫХ В ФЕНОТИП ТН17	379
<i>Федорова Е.Ю.</i> ВЛИЯНИЕ КОШАЧЬЕГО АЛЛЕРГЕНА FEL D 1 НА ЧЕЛОВЕКА И МЕТОДЫ ЕГО НЕЙТРАЛИЗАЦИИ.....	385
<i>Чурина Т.С., Курасова Д.А., Раззорова Е.А., Кулакова Ю.С., Горшкова Е.Н.</i> ВОЗДЕЙСТВИЕ КИСЛОЙ СРЕДЫ КАК СТРАТЕГИЯ ПОВЫШЕНИЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА (КИП)	388
<i>Шутова С.В., Сегеда А.С., Сазонова А.Д.</i> РЕАКЦИЯ МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОЙ СИСТЕМЫ НА ОККЛЮЗИОННУЮ ПРОБУ У КУРЯЩИХ И НЕКУРЯЩИХ ЮНОШЕЙ.....	394
 БОТАНИКА, ГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ	
<i>Абдульмянова Л.И., Буриева М.Р., Гулямова Т.Г.</i> ЭНДОФИТНЫЕ ГРИБЫ КАК ПРОДУЦЕНТЫ МЕЛАНИНОВЫХ ПИГМЕНТОВ.....	398

<i>Ажимова В.А., Масленникова А.П., Боронникова С.В., Данилова М.А., Майсак Г.П.</i> ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОЗИМЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ	405
<i>Арапова А.О., Шибанова Н.Л.</i> ВВЕДЕНИЕ В КУЛЬТУРУ IN VITRO НЕКОТОРЫХ ДЕКОРАТИВНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СЕМ. ТОЛСТЯНКОВЫЕ (CRASSULACEAE J. ST.-NIL.)	409
<i>Бабина К.В., Амосова Н.В.</i> ВЛИЯНИЕ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ И γ -ОБЛУЧЕНИЯ НА ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ <i>HORDEUM VULGARE</i> L.	415
<i>Багиров О.Р.</i> ВЫЧИСЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОМЕТРИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ НА УРОЖАЙНОСТИ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ФОРМ ЧЕРЕШНИ.....	420
<i>Ваганова Е.А., Боронникова С.В., Жуланов А.А., Корякова А.С.</i> ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ <i>PICEA OBOVATA</i> LEDEB.	424
<i>Вострикова А.В., Гребёнкина Е. И., Ситникова Е.А., Степанова О.А., Боронникова С.В.</i>	428
ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ <i>ACE</i> , <i>NOS3</i> И <i>PPARGC1A</i> У ЕДИНОБОРЦЕВ С РАЗНОЙ СПОРТИВНОЙ УСПЕШНОСТЬЮ	428
<i>Галиакберова В.Н., Архипова Н.С., Шимкович Е.Д.</i> ИНТРОДУКЦИЯ РАСТЕНИЙ В ТАТАРСТАНЕ	434
<i>Дробышева А.А.</i> МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ПОРТУЛАК ОГОРОДНЫЙ (<i>PORTULACA OLERACEA</i> L.).....	438
<i>Дубровин Д.И., Золотарева Н.В., Подгаевская Е.Н., Пустовалова Л.А., Коржневская А.А., Дубровина Д.П., Веселкин Д.В.</i> ВСТРЕЧАЕМОСТЬ <i>ACER NEGUNDO</i> В МЕСТООБИТАНИЯХ ЕКАТЕРИНБУРГА И ПРИЛЕГАЮЩИХ ТЕРРИТОРИЙ	442
<i>Кинёва Ж.А., Шумихин С.А.</i> ИНТРОДУКЦИОННОЕ ИЗУЧЕНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ГЛАДИОЛУСА (<i>GLADIOLUS</i> L.) БОТАНИЧЕСКОГО САДА ИМ. А. Г. ГЕНКЕЛЯ ПГНИУ	446
<i>Ковшарева В.С., Серебрянская В.В., Веденеев А.М.</i> БИОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ФЛОРЫ ЛИШАЙНИКОВ ПРИРОДНОГО ПАРКА «ЩЕРБАКОВСКИЙ»	450
<i>Лапаева Т.А.</i> МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПЕРЕНОСИМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ ТАЕЖНЫМИ КЛЕЩАМИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ.....	455
<i>Недилько О.В., Бацунов А.И., Федоров Д.Р.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ ЧЕРЕШКА В ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА <i>GLYCYRRHIZA</i> L.....	460
<i>Рябова Е.А., Бельтюкова Н.Н., Огородов И.П., Дмитриева И.В.</i> ПОДБОР ЭФФЕКТИВНЫХ ISSR-ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ СОРТОВ <i>BRASSICA NAPUS</i> L.	464

<i>Саркисян И.К., Яницкая А.В., Гашева М.С., Тишина А.И.</i> ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ТРАВЫ ПИЖМЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКОВОЙ.....	468
<i>Соломенникова Ю.Н., Трубников Ю.Н.</i> ДИКИЕ РОДИЧИ ГОРОХА КАК ИСТОЧНИК ГЕНОВ ХОЗЯЙСТВЕННО-ЦЕННЫХ ПРИЗНАКОВ.....	474
<i>Стоян В.А., Серебряная Ф.К.</i> ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИХ И МОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ EMPETRUM NIGRUM ФЛОРЫ МАГАДАНСКОЙ ОБЛАСТИ.....	478
<i>Тимкин П.Д., Пензин А.А.</i> МОДИФИКАЦИЯ СТАВ-МЕТОДА НА МОДЕЛИ СЕМЯН СОИ СОРТА «ЛИДИЯ».....	484
<i>Хайруллин Б.И.</i> ТЁМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ РАСТИТЕЛЬНЫХ СООБЩЕСТВ РЕСПУБЛИКИ ТАТАРСТАН	488
<i>Чертов Н.В., Боронникова С.В.</i> ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ <i>PINUS SYLVESTRIS</i> L. В ПЕРМСКОМ КРАЕ	495
<i>Черятова Ю.С.</i> СЕКРЕТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ <i>MYRTUS COMMUNIS</i> L.	500
<i>Чумакова Е.М., Макарова Е.А.</i> ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ГОРОДА ПО ФЛУКТУИРУЮЩЕЙ АСИММЕТРИИ ЛИСТЬЕВ КЛЕНА ОСТРОЛИСТНОГО.....	504
<i>Шестакова А.А., Шибанова Н.Л.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛИСТОВОГО ЭКСПЛАНТА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КАЛЛУСНОЙ ТКАНИ У ГЕРБЕРЫ	508
<i>Щипанова Е.А., Печенкина К.О., Селиванов А.Е., Новоселова Л.В.</i> ЛИШАЙНИКИ ПРОЕКТИРУЕМОГО ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ПАРКА «ДОЛИНА Р. ДАНИЛИХА» ГОРОДА ПЕРМИ.....	514

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ЭКОЛОГИЯ ПОЧВ

<i>Андреева Т.Е., Махин Назифуллах, Марданова А.М.</i> ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ВОЗБУДИТЕЛЯ СУХОЙ ГНИЛИ КЛУБНЕЙ КАРТОФЕЛЯ.....	520
<i>Бояршинова Ю.К., Ушаков В.Ю., Алимова Г.С.</i> СОДЕРЖАНИЕ ОДНОГО ИЗ ИЗОТОПОВ РАДОНА (Rn-222) В ПОЧВАХ ТОБОЛЬСКОГО И ВАГАЙСКОГО РАЙОНА ТЮМЕНСКОЙ ОБЛАСТИ.....	526
<i>Вишневкова А.И., Тарбеев И.А., Марон К.А., Бельтюкова Н.Н., Данилова М.А., Печенкина В.А.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА ОЗИМЫХ СОРТОВ <i>SECALE CEREALE</i> L., ВЫРАЩИВАЕМЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ	531

<i>Ембатурова Е.Ю.</i> СЕКРЕТОРНЫЕ СТРУКТУРЫ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ РОДА <i>TREVESIA VIS</i>	536
<i>Еремченко О.З., Сапцын Р.В.</i> ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ РЕКУЛЬТИВЦИИ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ СЕРОЙ ПОЧВЫ.....	539
<i>Зинченко В.Д., Серебряная Ф.К.</i> ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРЕДЫ ОЛИСТВЕННОЙ (<i>VIDENS FRONDOSA L.</i>) ФЛОРЫ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ И РЕСПУБЛИКИ АДЫГЕЯ.....	546
<i>Карнаухова В.М., Кайгородов Р.В.</i> ВЛИЯНИЕ КОРОДРЕВЕСНЫХ ОТХОДОВ НА ФИТОТОКСИЧНОСТЬ ТЯЖЕЛЫХ МЕТАЛЛОВ В ОРГАНОМИНЕРАЛЬНЫХ РЕКУЛЬТИВАЦИОННЫХ МАТЕРИАЛАХ.....	550
<i>Лесникова М.В., Сапцын Р.В.</i> ОЦЕНКА ЭКОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕННОЙ ТЕМНОГУМУСОВОЙ ПОЧВЫ	555
<i>Мальцева А.Д., Четина О.А.</i> ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ВОДЫ В ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ЗАСОЛЕНИЯ И РАЗНОГО УРОВНЯ PH	559
<i>Мурзина А.Е., Шейджен А.Ш., Решетников М.В., Плевакова Е.В.</i> ЭКОЛОГО-ГЕОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПОЧВ ГОРОДА КОГАЛЫМА И ПОКАЗАТЕЛИ БИОТЕСТИРОВАНИЯ	565
<i>Мартиросян Л.Ю., Мяжкова Е.Р., Мартиросян В.В.</i> АНАЛИЗ И МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ КУЛЬТУРЫ ИЗОЛИРОВАННЫХ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КОРНЕЙ <i>TARAXACUM KOK-SAGHYZ</i> И ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ В НЕЙ ЦЕЛЕВЫХ ВЕЩЕСТВ (КАУЧУКА И ИНУЛИНА)	571
<i>Пахоруков И.В.</i> ВЛИЯНИЕ ТЕХНОГЕННЫХ СОЛЕННЫХ ВОД НА КИСЛОТНО-ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА АЛЛЮВИАЛЬНЫХ ПОЧВ ТАЕЖНО-ЛЕСНОЙ ЗОНЫ ПРИКАМЬЯ	578
<i>Ратегов Н.Е., Ушаков В.Ю., Ефимик Е.Г.</i> СОСТОЯНИЕ ПОЧВ И РАСТИТЕЛЬНОСТИ НА ТЕРРИТОРИИ, РЕКУЛЬТИВИРОВАННОЙ ПОСЛЕ НЕФТЕРАЗЛИВА	583
<i>Сапцын Р.В., Чудинова Н.В., Еремченко О.З., Баландина А.В.</i> ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ РЕДОКС–ПРОЦЕССОВ, СОДЕРЖАНИЕ БЕЛКОВ И РАЗВИТИЕ КРЕСС-САЛАТА	590
<i>Сафьянникова У.И., Алескерова Л.Э.</i> ИСПОЛЬЗОВАНИЕ АССОЦИАЦИИ УГЛЕВОДОРОДОКИСЛЯЮЩИХ БАКТЕРИЙ ДЛЯ БИОРЕМЕДИАЦИИ НЕФТЯНЫХ ЗАГРЯЗНЕНИЙ.....	594

<i>Сиголаева Т.Е., Переломов Л.В., Иванищев В.В.</i> ФОРМИРОВАНИЕ ПРОРОСТКОВ ПШЕНИЦЫ (<i>TRITICUM AESTIVUM L.</i>) В УСЛОВИЯХ ЗАГРЯЗНЕНИЯ ТЯЖЕЛЫМИ МЕТАЛЛАМИ	597
<i>Симакова В.С.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ НАИБОЛЕЕ ПРОДАВАЕМЫХ ЖИДКОСТЕЙ ДЛЯ СНЯТИЯ ЛАКА НА РОСТ И РАЗВИТИЕ КРЕСС-САЛАТА (<i>LEPIDIUM SATIVUM L.</i>) СОРТА «ДАНСКИЙ»	601
<i>Хасанова К.А., Замалиева Ф.Ф., Лутфуллин М.Т.</i> ВЛИЯНИЕ ЭКССУДАТОВ РАСТЕНИЙ КАРТОФЕЛЯ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ ДЕЙСТВИИ АБИОТИЧЕСКОГО СТРЕССА, НА ПРОДУКЦИЮ ИУК БАКТЕРИЯМИ РОДА <i>PSEUDOMONAS</i>	607
<i>Чайкина А.П., Горовцов А.В.</i> ДИНАМИКА ЧИСЛЕННОСТИ МИКРОМОНОСПОР В ПОЧВАХ ГОРОДА РОСТОВ-НА-ДОНУ С РАЗНЫМ УРОВНЕМ АНТРОПОГЕННОЙ НАГРУЗКИ.....	613
<i>Боталова К.И., Черных А.Д., Боталов А.А.</i> ВЛИЯНИЕ КИСЛОТНОСТИ И ЩЕЛОЧНОСТИ КОРНЕВОЙ СРЕДЫ НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ НА <i>TRITICOSECALE WITTM. EX A. SAMUS</i>	616
<i>Шутский Н.А., Вашукова К.С., Покрышкин С.А., Аникеенко Е.А., Пиковской И.И., Косяков Д.С., Чухчин Д.Г.</i> ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЛИГНИНА ВО ВТОРИЧНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКЕ ЕЛИ	622
<i>Щербёнок С.В., Четина О.А.</i> НАКОПЛЕНИЕ ГЛИЦИНБЕТАИНА И ПРОЛИНА В НАДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ РАСТЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ЗАСОЛЕНИЯ	631
<i>Юзбеков А.К.</i> ДИНАМИКА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ ХВОЙНОГО ДРЕВОСТОЯ ВАЛДАЯ	637

ЗООЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

<i>Абу Дийак К.Т.</i> СЕНСОРНЫЕ ПОЛЯ НА АНТЕННАХ РУЧЕЙНИКОВ ПОДОТЯДА ANNULIPALPIA (INSECTA: TRICHOPTERA).....	643
<i>Абу Дийак К.Т.</i> РАЗНООБРАЗИЕ СЕНСИЛЛ НА ЩУПИКАХ РУЧЕЙНИКОВ ИЗ СЕМЕЙСТВ PHILOROTAMIDAE И STENOPSYCHIDAE (TRICHOPTERA: ANNULIPALPIA)	648
<i>Баркова М.А., Железнова Т.К.</i> ЛЕТНЕЕ НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ Г. ЧЕХОВА (ЮЖНОЕ ПОДМОСКОВЬЕ).....	653
<i>Безверхая Е.С., Железнова Т.К.</i> ЛЕТНЕЕ НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ ПОСЕЛКОВ ЮЖНОГО ПОДМОСКОВЬЯ.....	656

<i>Боровкова А. Д., Боярова М. Д., Цыганков В. Ю.</i> ПОЛИХЛОРИРОВАННЫЕ БИФЕНИЛЫ В МОЛЛЮСКАХ СЕМЕЙСТВА MUTILIDAE ЗАЛ. ПЕТРА ВЕЛИКОГО (ЯПОНСКОЕ МОРЕ).....	660
<i>Варушкина Т.С., Матвеева Г.К.</i> НАСЕЛЕНИЕ ПТИЦ ДОЛИНЫ РЕКИ ИВЫ	665
<i>Власов С.В.</i> ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ ПО ФАУНЕ И БИОТОПИЧЕСКОМУ РАСПРЕДЕЛЕНИЮ ПАУКОВ ПРЕДУРАЛЬСКОЙ СТЕПИ	671
<i>Галиулин Д.М., Печенкина К.О., Четанов Н.А.</i> КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ТИПИЧНЫХ БИОТОПОВ ЧЕТЫРЕХ ВИДОВ РЕПТИЛИЙ В КАМСКОМ ПРЕДУРАЛЬЕ	677
<i>Ефимик В.Е., Соловьева Е.Е., Славнова Е.А.</i> ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В УНБ «ПРЕДУРАЛЬЕ»	682
<i>Индриксон Я.В., Комисаренко А.А.</i> ВОЗМОЖНЫЕ ПИЩЕВЫЕ ИСТОЧНИКИ ГОЛОЖАБЕРНОГО МОЛЛЮСКА CADLINA LAEVIS (LINNAEUS, 1767) В БУХТЕ РУДНОЙ, ЯПОНСКОГО МОРЯ	688
<i>Карнаухов Д.Ю., Ермолаева Я.К., Долинская Е.М., Бирицкая С.А., Масленникова М.А., Пушница В.А., Бухаева Л.Б., Лавникова А.В., Шукова Е.А., Голубец Д.И., Зилов Е.А.</i> МИГРАЦИОННОЕ ПОВЕДЕНИЕ ПРЕСНОВОДНОЙ ПЕЛАГИЧЕСКОЙ АМФИПОДЫ MACRONESTORPUS BRANICKII (DYBOWSKY, 1874) В ПЕЛАГИАЛИИ ОЗЕРА БАЙКАЛ.....	691
<i>Кинарейкина А.Г.</i> ВЛИЯНИЕ ИНСЕКТИЦИДНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КОМНАТНОЙ МУХИ MUSCA DOMESTICA L.	695
<i>Князева Е.В.</i> СРАВНЕНИЕ НЕКОТОРЫХ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ОСОБЕЙ CORONELLA AUSTRIACA РАЗНОЙ ОКРАСКИ	701
<i>Корнилова Е.А., Смирнов А.С.</i> МЕЖПОРОДНЫЕ РАЗЛИЧИЯ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ГОСУДАРСТВЕННЫХ ВОЕНИЗИРОВАННЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ ПО УРОВНЮ ИНТЕЛЛЕКТА.....	705
<i>Крайнева Т.С., Паньков Н.Н.</i> ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ Р. УРАЛ В ПРЕДЕЛАХ ОРЕНБУРГСКОГО ЗАПОВЕДНИКА (АЙТУАРСКАЯ СТЕПЬ) ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ.....	712
<i>Крылова И.О., Лапай М.И.</i> ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ КИШЕЧНОГО МИКРОБИОМА СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА ПРИ КОРМЛЕНИИ ПОЛНОРАЦИОННЫМ СУХИМ КОРМОМ	716

<i>Ксенофонтова А.А., Гурьянов С.И.</i> КОМПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ БЛАГОПОЛУЧИЯ ЛОШАДЕЙ ПРЖЕВАЛЬСКОГО (<i>EQUUS FERUS PRZEWALSKII</i>) В ЗООПАРКЕ – ВКЛАД В СОХРАНЕНИЕ ЭКОСИСТЕМЫ СТЕПИ	720
<i>Масленникова М.А., Ермолаева Я.К., Долинская Е.М., Бирицкая С.А., Бухаева Л.Б., Пушница В.А., Голубец Д.И., Лавникова А.В., Щукова Е.А., Карнаухов Д.Ю., Зилов Е.А.</i> ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СВЕТОВЫХ УСЛОВИЙ НА ДВИГАТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ <i>RADIX AURICULARIA</i>	725
<i>Михеев П.Б. Прусов С.В., Эркинаро Я., Клосс Дж.</i> АНАЛИЗ ПРОИСХОЖДЕНИЯ ОЗЕРНОЙ КУМЖИ <i>SALMO TRUTTA</i> ВОСТОЧНОЙ ФЕННОСКАНДИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛИЗА МИКРОХИМИИ ОТОЛИТОВ	728
<i>Михеев П.Б., Мухина М.В., Костицына Н.В., Бакланов М.А., Пузик А.Ю.</i> ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОВЫШЕННОЙ МИНЕРАЛИЗАЦИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ НА РЕЧНОГО ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i>	732
<i>Плакхина Е.В.</i> ВИДЫ РОДА <i>PARDOSA</i> (С. L. KOCH, 1847) В БОТАНИЧЕСКОМ САДУ ПГНИУ	737
<i>Пушкова А.Е., Мосолова Е.Ю.</i> ЗИМОВКА КРЯКВЫ (<i>ANAS PLATYRHYNCHOS</i>) В ГОРОДЕ САРАТОВ: ФОРМИРОВАНИЕ, СОСТОЯНИЕ, АДАПТАЦИИ	744
<i>Ржечицкая К.Е., Цыганков В.Ю.</i> ОЦЕНКА УРОВНЕЙ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРООРГАНИЧЕСКИХ ПЕСТИЦИДОВ В ТРЕСКЕ ТИХООКЕАНСКОЙ (<i>GADUS MACROCEPHALUS</i>) ИЗ БЕРИНГОВА МОРЕЯ	747
<i>Садыков Р.Э., Потапов К.О., Садыкова Ю.Р.</i> АНАЛИЗ ТЕРМОФИЛЬНОСТИ МИКСОМИЦЕТОВ ГОРОДА КАЗАНИ И ЕГО ОКРЕСТНОСТЕЙ	752
<i>Садыкова Ю.Р., Норев А.И.</i> СЕЗОННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПАРАМЕТРОВ КИСЛОТНО-ОСНОВНОГО БАЛАНСА У СЛУЖЕБНЫХ СОБАК ПОРОДЫ НЕМЕЦКАЯ ОВЧАРКА	758
<i>Семухина А.С.</i> СОДЕРЖАНИЕ ГЛИКОГЕНА В ПЕЧЕНИ ПЕРЕД РАЗМНОЖЕНИЕМ У ТРАВЯНОЙ ЛЯГУШКИ <i>RANA TEMPORARIA</i>	764
<i>Тельнова Т.Ю., Моргунова М.М., Шапкина С.С., Власова А.А., Мишарина Е.А., Имидоева Н.А., Дмитриева М.Е., Малыгина Е.В., Бельиенко А.Ю., Аксенов – Грибанов Д.В.</i> КАЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ НАКОПЛЕНИЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ В БАЙКАЛЬСКИХ ЭНДЕМИЧНЫХ АМФИПОДАХ	768
<i>Харин Р.В.</i> ЭКОЛОГО-ОРНИТОЛОГИЧЕСКАЯ ОБСТАНОВКА В АЭРОПОРТУ «ХАТАНГА»	771

ЭКОЛОГИЯ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЕ

<i>Стойнова В.И., Кондратов Н.А.</i> ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТРОПА И ЭКОЛОГИЧЕСКИЙ МАРШРУТ КАК СПОСОБЫ РАЗВИТИЯ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ТУРИЗМА.....	778
<i>Волкова Е.Н.</i> ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОЛИГОНА ТКО НА ОКРУЖАЮЩУЮ СРЕДУ В МОСКОВСКОЙ ОБЛАСТИ.....	782
<i>Гречка Е.А.</i> ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КАЧЕСТВА ВОДЫ РЕКИ ДОН В СТАНИЦЕ МЕЛИХОВСКАЯ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	786
<i>Гуссамова А.Д.</i> ОБЕСПЕЧЕНИИ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО ПРАВОПОРЯДКА ПРАВОПРИМЕНЕНИТЕЛЬНЫМИ ОРГАНАМИ.....	792
<i>Данилов Д.И., Гайворонская А.А., Анищенко Л.Н.</i> СТАРИННЫЕ УСАДЕБНЫЕ ПАРКИ НЕЧЕРНОЗЕМЬЯ РФ КАК УНИКАЛЬНЫЕ ЭКОЛОГО-РЕКРЕАЦИОННЫЕ ОБЪЕКТЫ.....	796
<i>Жучков Д.В., Макаренко В.П., Фетисов Д.М.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АВТОМОБИЛЬНОГО ТРАНСПОРТА НА ЖИЗНЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ДРЕВЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА МАГИСТРАЛЬНЫХ УЛИЦАХ Г. БИРОБИДЖАНА.....	803
<i>Ишмухаметов И.Р., Фахруллина Г.И., Фахруллин Р.Ф.</i> ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ БУРОВЫХ ШЛАМОВ ПРИ ПОМОЩИ БАКТЕРИИ <i>ALCANIVORAX BORKUMENSIS</i>	810
<i>Кузнецова А.П., Грескова П.П.</i> БИОСИНТЕЗ БИОРАЗЛАГАЕМЫХ ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТОВ ИЗ ПИЩЕВЫХ И АГРОПРОМЫШЛЕННЫХ ОТХОДОВ	816
<i>Лемаев Т.В.</i> ЗУБР: ИСТОРИЯ ВЫМИРАНИЯ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ВИДА В ПРИОКСКО-ТЕРРАСНОМ ЗАПОВЕДНИКЕ	823
<i>Михайлов М.А., Черных В.Д., Смолий М.В.</i> ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РЕКИ ДОН.....	828
<i>Нечаева Ю.И., Белкин П.А., Плотникова Е.Г.</i> АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ ДОННЫХ ОСАДКОВ ТЕХНОГЕННОГО ВОДОЕМА (Г. БЕРЕЗНИКИ, ПЕРМСКИЙ КРАЙ).....	833
<i>Новокшионова А.Д.</i> ПОИСК СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА И ПРОДУКТИВНОСТИ <i>CHLORELLA VULGARIS</i>	838
<i>Олькова А.С., Баньковская Е.В., Матанина В.В., Вьялкова А.А.</i> ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕФТЕЙ И НЕФТЕПРОДУКТОВ	840

<i>Пономарева А.Л., Полоник Н.С.</i> УГЛЕВОДОРООКИСЛЯЮЩИЙ ПОТЕНЦИАЛ ДОННЫХ ОТЛОЖЕНИЙ ЯПОНСКОГО МОРЯ В РАЙОНАХ АНОМАЛЬНЫХ ГАЗОВЫХ ПОЛЕЙ	844
<i>Прокопенко Д.П., Кравцова А.В.</i> ХАРАКТЕРИСТИКА СПЕКТРАЛЬНЫХ ИНДЕКСОВ ШЕРШНЕВСКОГО ВОДОХРАНИЛИЩА	850
<i>Рожин А.О., Фахруллина Г.И., Ишмухаметов И.Р., Ахатова Ф.С.</i> ИЗУЧЕНИЕ ПЕРСПЕКТИВ ОЧИСТКИ НЕФТЕСОДЕРЖАЩИХ БУРОВЫХ ШЛАМОВ ПРИ ПОМОЩИ НЕМАТОДЫ <i>TURBOTRIX ACETI</i>	854
<i>Рожин А.О., Искужина Л.И., Фахруллин Р.Ф.</i> АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИИ <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i>	860
<i>Ротъкин А.Т.</i> ВОЗДЕЙСТВИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИРЕТРОИДОВ НА НЕЦЕЛЕВЫЕ ОРГАНИЗМЫ (ОБЗОР)	864
<i>Сайфутдинова А.Р., Костенко В.В.</i> ВЛИЯНИЕ МИКРОПЛАСТИКА НА ФОРМИРОВАНИЕ ПРИЗНАКОВ ПРИСПОСОБЛЕННОСТИ ЛИНИИ <i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> МУТАНТНЫХ ПО ГЕНУ <i>FOXO</i>	868
<i>Страздаускене С.Р., Сунгурова Н.Р.</i> БИОЭКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД, ИСПОЛЪЗУЕМЫХ ДЛЯ ОЗЕЛЕНЕНИЯ ДОШКОЛЬНЫХ УЧРЕЖДЕНИЙ.....	873
<i>Хабибуллина А.Р., Лядов Ф.В., Самойленко М.М., Джо-Мадугу А.С., Вдовина Т.В., Сироткин А.С.</i> ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ВНЕШНИХ ФАКТОРОВ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ УДАЛЕНИЯ ФОСФАТОВ АКТИВНЫМ ИЛОМ	877
<i>Хасанова А.А., Перушкина Е.В., Сироткин А.С.</i> ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ДЕФОСФАТАЦИИ СТОЧНЫХ ВОД НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ БИОЦЕНОЗА АКТИВНОГО ИЛА	880
<i>Чечкова Н.А.</i> <i>CLOSTRIDIUM SPP.</i> , КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МИКРОБНЫЕ ИНДИКАТОРЫ МИНЕРАЛИЗАЦИИ ОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В СОСТАВЕ ДОННЫХ ИЛОВЫХ ОТЛОЖЕНИЙ	884
<i>Чуканов А.К.</i> ДЕГРАДАЦИЯ МАЛЫХ ВОДОТОКОВ, КАК ОДНА ИЗ ГЛАВНЫХ ПРОБЛЕМ ВЛАДИМИРСКОЙ ОБЛАСТИ	889

Научное издание

СИМБИОЗ-РОССИЯ 2022

*Сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов
(г. Пермь, ПГНИУ, 24–25 октября 2022 г.)*

Издается в авторской редакции
Техническая подготовка материалов: *М. Я. Лямин*

Объем данных 30,7 Мб
Подписано к использованию 14.04.2023

Размещено в открытом доступе
на сайте www.psu.ru
в разделе НАУКА / Электронные публикации
и в электронной мультимедийной библиотеке ELiS

Управление издательской деятельности
Пермского государственного
национального исследовательского университета
614990, г. Пермь, ул. Букирева, 15