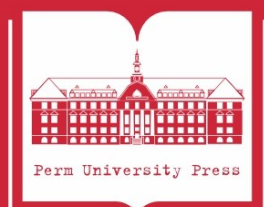


ПЕРМСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ

Сборник статей Международной
конференции ученых-биологов

(г. Пермь, ПГНИУ,
30 октября – 3 ноября 2023 г.)



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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 «Компания Хеликон»

Инновационный центр «БИРЮЧ»

ООО «Имбиоком»

ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ

*Сборник статей Международной конференции ученых-биологов
(г. Пермь, ПГНИУ, 30 октября – 3 ноября 2023 г.)*



Пермь 2024

УДК 57/59
ББК 28.4+28.5
Ф947

Фундаментальные и прикладные аспекты биологии [Электронный ресурс]: сборник статей Международной конференции ученых-биологов (г. Пермь, ПГНИУ, 30 октября – 3 ноября 2023 г.) / гл. ред. А. А. Елькин; отв. ред. М. Я. Лямин; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2024. – 15,66 Мб ; 381 с. – Режим доступа: <http://www.psu.ru/files/docs/science/books/sborniki/Fundamentalnye-i-prikladnye-aspekty-biologii-2024.pdf>. – Заглавие с экрана.

ISBN 978-5-7944-4093-5

Сборник включает статьи Международной конференции ученых-биологов «Фундаментальные и прикладные аспекты биологии». 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, экологии и природопользованию. Статьи сборника охватывают широкий спектр научных проблем и представляют интерес для научных работников, преподавателей вузов, аспирантов и студентов.

УДК 57/59
ББК 28.4+28.5

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

ISBN 978-5-7944-4093-5

© ПГНИУ, 2024

ПРЕДСЕДАТЕЛИ ОРГКОМИТЕТА

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

Лямин М.Я., к.б.н., доцент, заместитель декана биологического факультета по научной работе, Пермь, Россия

ЧЛЕНЫ ПРЕДСТАВИТЕЛЬСКОЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА

Бакланов М.А., к.б.н., заведующий кафедрой зоологии позвоночных и экологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Боронникова С.В., д.б.н., заведующий кафедрой ботаники и генетики растений ПГНИУ, Пермь, Россия

Еремченко О.З., д.б.н., заведующий кафедрой физиологии растений и экологии почв ПГНИУ, Пермь, Россия

Ефимик В.Е., к.б.н., заведующий кафедрой зоологии беспозвоночных и водной экологии 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

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», Минск, Республика Беларусь

ЧЛЕНЫ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ ОРГКОМИТЕТА

Арисова А.К., ассистент кафедры физиологии растений и экологии почв ПГНИУ, Пермь, Россия

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

Бочкова Мария Станиславовна, к.б.н., Институт экологии и генетики микроорганизмов, ПФИЦ УрО РАН, доцент кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Ефимик Е.Г., к.б.н., доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, Пермь, Россия

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

Кропанева М. Д., к.б.н., ассистент кафедры микробиологии и иммунологии, м.н.с. лаборатории молекулярной иммунологии «ИЭГМ УрО РАН», Пермь, Россия

Кайгородов Р.В., к.б.н, доцент кафедры физиологии растений и экологии почв ПГНИУ, Пермь, Россия

Крашенинников А.Б., к.б.н., доцент кафедры зоологии беспозвоночных и водной экологии ПГНИУ, Пермь, Россия

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

Максимов А.Ю., к.б.н., с.н.с. «ИЭГМ УрО РАН», доцент кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Матвеева Г.К., к.б.н., доцент кафедры зоологии позвоночных и экологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Печенкина В. А., ассистент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, Пермь, Россия

Сайдакова Е.В., д.б.н., зав. лаб. «ИЭГМ УрО РАН», профессор кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Ушаков В.Ю., к.б.н., доцент кафедры физиологии растений и экологии почв ПГНИУ, Пермь, Россия

Храмцов П.В., д.б.н., н.с. ИЭГМ УрО РАН, доцент кафедры микробиологии и иммунологии ПГНИУ, Пермь, Россия

Чертов Н.В., ассистент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, Пермь, Россия

Шибанова Н.Л., к.б.н., доцент кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ, Пермь, Россия

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI* ПРОДУЦИРОВАТЬ ПУТРЕСЦИН

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

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

Аннотация. Исследована способность 4 природных изолятов *Escherichia coli* продуцировать путресцин при культивировании на различных средах. Изучено влияние pH среды на скорость продукции путресцина. Установлено, что наибольшие концентрации путресцина достигаются при культивировании на среде с добавкой орнитина.

Ключевые слова: полиамины, 1,4-диаминобутан, путресцин, *Escherichia coli*, орнитин

ASSESSMENT OF THE ABILITY OF NATURAL ISOLATES OF *ESCHERICHIA COLI* TO PRODUCE PUTRESCINE

Averina M.V.¹, Akhova A.V.^{1, 2}, Tkachenko A.G.²

¹ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

² 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 ability of 4 *Escherichia coli* isolates to produce putrescine when cultivated in various media was investigated. The influence of pH on the rate of putrescine production was studied. It has been shown that the highest concentrations of putrescine are achieved when cultivated in a medium supplemented with ornithine.

Keywords: polyamines, 1,4-diaminobutane, putrescine, *Escherichia coli*, ornithine

Путресцин (1,4-диаминобутан) – это биогенный диамин, играющий важную роль в развитии эукариотических и прокариотических клеток, а также вирусов. Путресцин обладает некоторыми неспецифическими функциями (обусловленными его химическими свойствами, например, положительным зарядом при физиологическом pH), которые включают взаимодействие с нуклеиновыми кислотами, фосфолипидами и белками, благодаря чему он участвует в регуляции процессов транскрипции и трансляции. Также есть информация, что полиамины растений способствуют их росту, развитию, передаче клеточных сигналов, фотосинтезу, а также реакции на абиотический и биотический стресс. [1] Кроме того, этот диамин может использоваться в качестве мономера при синтезе полиамидов на биологической основе, в частности путресцин в настоящее время используется для синтеза нейлона-4,6 (Stanyl1,

DSM) путем поликонденсации с адипиновой кислотой. Этот пластик благодаря хорошим механическим свойствам и термостойкости находит применение в машиностроении [2].

Задача развития технологий получения полиамидов из биологического сырья становится тем более актуальной, чем сильнее возрастают в мире объёмы производства и потребления пластика, большая часть которого производится с использованием невозобновляемых продуктов нефтехимии в качестве сырья. Поскольку такие реагенты высокотоксичны и легко воспламеняются, химический путь синтеза также нежелателен с точки зрения охраны окружающей среды и здоровья человека. Таким образом, в связи с растущим вниманием к экологическим проблемам использование возобновляемого сырья для синтеза диаминов имеет решающее значение для создания устойчивой индустрии пластмасс [3, 4].

Пути биосинтеза путресцина идентифицированы у различных микроорганизмов и включают путь орнитиндекарбоксилазы (ОДК) и путь аргининдекарбоксилазы (АДК) [3]. По пути ОДК путресцин синтезируется путем декарбоксилирования L-орнитина с помощью орнитиндекарбоксилазы SpeC или SpeF, биосинтетической и биodeградативной форм этого фермента. Наибольшую активность обе изоформы ОДК проявляют в нейтральных и слабощелочных условиях (оптимум pH для SpeC равен 8.1; а для SpeF – 7). В ряде исследований есть информация о следующих различиях в функционировании этих изоформ: ОДК SpeC вовлечена в процесс биосинтеза полиаминов, в то время как физиологическая функция ОДК SpeF – это деградация орнитина. Кроме того, предполагается, что данная орнитиндекарбоксилаза может быть частью системы кислотоустойчивости, функционирующей при слабом кислотном стрессе [5]. По пути АДК у многих бактерий путресцин обычно синтезируется в результате двухстадийного процесса, начинающегося декарбоксилированием L-аргинина под действием аргининдекарбоксилаз SpeA и SpeB. В настоящее время активно ведутся исследования по применению для производства диаминов бактерий *Escherichia coli* и *Corynebacterium glutamicum* [4].

Цель данной работы – оценка способности природных изолятов *Escherichia coli* продуцировать путресцин при культивировании на разных средах.

Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования были использованы 4 природных изолята *Escherichia coli* (N30, N31, N32, N14). Их способность синтезировать путресцин сравнивали с лабораторным штаммом *Escherichia coli* K12, полученным из Всероссийской коллекции микроорганизмов.

В данной работе исследована способность синтезировать путресцин из простых соединений (глюкоза, аминокислоты/олигопептиды) в процессе ферментации и катализировать реакцию биотрансформации орнитина в путресцин.

Культивирование на минимальной среде M9 с добавлением 0,4% глюкозы позволила нам оценить способность штаммов синтезировать путресцин из сахаров. Биосинтез путресцина из глюкозы клетками *E. coli* осуществляется по метаболическому пути C5 и включает ряд превращений глюкозы (по пентозофосфатному пути, в пируватдегидрогеназной реакции и в цикле трикарбоновых кислот) до α -кетоглутарата и дальнейший синтез на его основе путресцина. Использование в качестве среды бульона LB позволило оценить способность штаммов синтезировать путресцин из аминокислот. При выращивании на мясо-пептонной среде в качестве субстратов для синтеза путресцина бактериями могут быть использованы L-орнитин и L-аргинин в реакциях декарбоксилирования, катализируемых ферментами орнитиндекарбоксилазой и аргининдекарбоксилазой соответственно. Кроме того, для оценки спо-

способности микроорганизмов катализировать реакцию трансформации орнитина в путресцин их выращивали на среде М9 с добавлением 1 г/л орнитина и 0,4% глюкозы в качестве источника углерода и энергии.

Также рассматривалось влияние pH среды на продукцию путресцина, для чего эксперименты проводились на перечисленных средах с pH 7,4 и 5,0.

В ходе эксперимента бактерии переносили со скошенного агара LB в пробирки с ватно-марлевыми пробками, содержащими 5 мл среды, и выращивали в течение 18-19 часов при температуре 37°C в термостате без перемешивания. Полученную культуру затем разводили в 5 мл свежей среды в пробирках с ватно-марлевыми пробками до оптической плотности ОП₆₀₀=0,3 и выращивали при тех же условиях в течение 24 часов.

Концентрация полиаминов определялась методом тонкослойной хроматографии после предварительной дериватизации проб, отобранных в разные промежутки времени (0, 2, 4 и 24 ч) после разведения ночной культуры, дансилхлоридом.

Так как количество полиаминов определялось в среде культивирования, для осаждения клеток культуру центрифугировали в течение 2 мин при 16000g. Дансирование проб проводилось в термостате при 37°C в течение 2 часов.

Результаты и их обсуждение

Анализируя максимальные достигнутые концентрации путресцина, можно сделать заключение, что при культивировании на минимальной среде с pH 7,4 и добавкой глюкозы в качестве единственного источника углерода и энергии природные изоляты N30, N31, N32 и N14 синтезируют больше путресцина чем лабораторный штамм K12 в 4,1, 2,0, 2,4 и 3,6 раза соответственно. В целом, максимальных значений концентрация путресцина в среде достигала к 24 ч выращивания. При культивировании на той же среде с pH 5,0 изоляты N30 и N31 продуцировали примерно такое же количество путресцина, как и лабораторный штамм K12, а N32 и N14 – больше в 1,8 раза. При этом значения максимальных концентраций увеличились в целом в 2-4 раза для всех продуцентов в сравнении с результатами, полученными при их культивировании на среде с нейтральным pH.

При культивировании на среде LB с pH 7,4 природные изоляты N30, N31, N32 и N14 синтезировали больше путресцина чем лабораторный штамм K12 в 13,9, 14,2, 23,7 и 4,0 раза соответственно. Максимальная концентрация путресцина в среде при культивировании штамма K12 наблюдалась уже на 4 ч выращивания, а в случае природных изолятов (N30, N31, N32, N14) высокие концентрации целевого продукта регистрировались на 24 ч культивирования. При выращивании на среде LB с pH 5,0 природные изоляты N30, N31 и N14 синтезировали примерно такое же количество путресцина, как и штамм K12, а N32 – в 1,4 раза больше. Максимальные концентрации для K12 и N14 повысились в 17 и 4 раза соответственно, а для остальных изолятов остались на прежнем уровне.

При культивировании на средах LB и М9 с добавлением глюкозы, pH которых был равен 5,0, накопление путресцина проходило быстрее, чем на этих же средах с нейтральным pH. Максимальные концентрации путресцина достигались уже на 2 ч выращивания, однако далее шло снижение его количества.

В случае выращивания микроорганизмов на среде М9 с добавлением глюкозы и орнитина, pH которой равен 7,4, природные изоляты N30, N31, N32 и N14 синтезируют больше путресцина чем лабораторный штамм K12 в 9,1, 7,4, 8,2 и 8,6 раз соответственно. При этом максимальная концентрация путресцина в среде как при культивировании штамма K12, так и при культивировании природных изолятов наблюдалась на 24 ч выращивания, за исключением изолята N32 – для него максимальная концентрация была зарегистрирована на 4 ч вы-

рацивания. При проведении эксперимента на той же среде с pH 5,0 природные изоляты N30, N31, N32 и N14 синтезировали больше путресцина чем лабораторный штамм K12 в 5,1, 5,2, 6,0 и 5,5 раз соответственно. При этом уровень максимальных концентраций незначительно снизился, по сравнению со значениями, достигнутыми при культивировании на среде с нейтральным pH.

В целом наибольшее количество путресцина исследуемые микроорганизмы синтезировали на среде M9 с добавлением глюкозы и орнитина с pH, равным 7,4. Так природный изолят N30 на 24 ч культивирования на этой среде синтезировал 2064 мкМ путресцина. На среде LB самый высокий результат был достигнут изолятом N32 на 24 ч выращивания при pH среды 7,4, он составил 347 мкМ. На среде M9 с добавлением глюкозы максимальная концентрация путресцина была достигнута при pH среды 5,0 изолятом N14 на 2 ч культивирования.

Заключение

Проведена оценка способности природных изолятов *E. coli* продуцировать путресцин на различных средах. Для разработки синтеза путресцина путём ферментации можно использовать штаммы *E. coli* N32 и *E. coli* N14 в зависимости от выбора субстрата, а для конверсии орнитина в путресцин – штамм *E. coli* N30. В целом максимальные показатели концентрации путресцина достигались при использовании среды M9 с добавлением глюкозы и орнитина.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер госрегистрации темы: АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Freudenberg R.A., Wittemeier L., Einhaus A., Baier T., Kruse O. Advanced pathway engineering for phototrophic putrescine production // Plant Biotechnology Journal. – 2022. – V. 20. – I. 10. – P. 1968–1982.
2. Qian Z.X., Xia X.X., Lee S.Y. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of putrescine: a four-carbon diamine // Biotechnology and Bioengineering. – 2009. – V. 104. – № 4. – P. 651–662.
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. Wang L., Li G., Deng Y. Diamine biosynthesis: research progress and application prospects // Applied and Environmental Microbiology. – 2020. – V. 86. – I. 23. – P. 1-15.
5. Ахова А.В., Шегина Е.С., Лаврикова А.Л., Кузнецова М.В., Ткаченко А.Г. Активность основных ферментов синтеза полиаминов в природных изолятах *Escherichia coli* // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. – 2019. – В. 3. – С. 291–299.

ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ДИОКТИЛТЕРЕФТАЛАТА *RHODOCOCCLUS* SP. AT5-2

Башкиров С.Д.¹, Корсакова Е.С.^{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. Из активного ила биологических очистных сооружений нефтехимического предприятия (г. Пермь) выявлен грамположительный штамм-деструктор диоктилтерефталата (ДОТФ), обозначенный как AT5-2. Анализ нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК изодята показал его наибольшее филогенетическое сходство (на уровне 99,78%) с типовым штаммом вида *Rhodococcus ruber*. В ходе исследования ростовые характеристики штамма *Rhodococcus* sp. AT5-2 отмечен эффективный рост на диоктилтерефталате при концентрации 1 г/л. Утилизация ДОТФ (200 мг/л) составляла 87,65% за 72 часа эксперимента. Также отмечен эффективный рост штамма на дибутилфталате, терефталевой и *орто*-фталевой кислотах.

Ключевые слова: бактерии-деструкторы, диоктилтерефталат, *Rhodococcus*

STRAIN DESTRUCTOR OF DIOCTYL TEREPHTHALATE *RHODOCOCCLUS* SP. AT5-2

Bashkirov S.D.¹, Korsakova E.S.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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. A gram-positive strain AT5-2 dioctyl terephthalate destructor was identified from activated sludge of biological treatment facilities of a petrochemical enterprise (Perm). Analysis of the nucleotide sequence of the 16S rRNA gene showed its greatest phylogenetic similarity (at the level of 99,78%) to the type strain of the species *Rhodococcus ruber*. During the study of growth characteristics of *Rhodococcus* sp. strain AT5-2, effective growth on dioctyl terephthalate at a concentration of 1 g/L was observed. The utilization of DOTP (200 mg/L) was 87.65% in 72 hours of experiment. Effective growth on dibutyl phthalate, terephthalic and *ortho*-phthalic acids was also noted.

Keywords: bacteria-destructors, dioctyl terephthalate, *Rhodococcus*

Введение

Использование пластика стало неотъемлемой частью нашей повседневной жизни. Фталаты, относящиеся к группе стойких органических загрязнителей и обладающие гепатотоксичными, тератогенными и канцерогенными свойствами, получили широкое применение в качестве пластификаторов, а также при синтезе полиэфирных волокон (в том числе диоктилтерефталат). Диоктилтерефталат (ДОТФ) – ароматический терефталатный пластификатор, получаемый путем этерификации 2-этилгексанола и терефталевой кислоты, который известен своими физическими и химическими свойствами (например, низкой летучестью, гибкостью, термостойкостью и кислотостойкостью), сходными с диэтилфталатом. Тем не менее,

ДОТФ менее токсичен и рекомендован Всемирной организацией здравоохранения в качестве альтернативы диэтилфталата [1] и используется во многих отраслях промышленности: в производстве искусственной кожи, напольных покрытий и настенных покрытий для стен [2, 3]. Мировое потребление ДОТФ растет с каждым годом, что повышает риски попадания и накопления данного соединения в окружающей среде в результате промышленного производства, диффундирования из пластмассовых материалов в течение времени, улетучивание при сжигании пластмасс, главным компонентом производства которых является ДОТФ.

Так как естественное разложение пластификаторов часто происходит чрезвычайно медленно, использование и утилизация ДОТФ также может представлять проблему для окружающей среды. К тому же из-за стабильной химической структуры и низкой растворимости в воде ДОТФ с меньшей вероятностью может быть удален путем гидролиза, фотолиза и улетучивания. Следовательно, наиболее удобным и рациональным методом разложения этого соединения можно считать биodeградацию при использовании метаболического потенциала микроорганизмов [4].

Цель работы – характеристика штамма-деструктора ДОТФ рода *Rhodococcus* и исследование его способности утилизации субстрата.

Материалы и методы

Для проведения исследования из рабочей коллекции лаборатории микробиологии техногенных экосистем «ИЭГМ УрО РАН» были отобраны 8 грамположительных штаммов бактерий, ранее выделенные из активного ила биологических очистных сооружений нефтехимического предприятия (г. Пермь).

Идентификацию бактерий осуществляли на основании анализа нуклеотидных последовательностей гена 16S рПНК. Амплификацию проводили с использованием бактериальных праймеров 27F/1492R [5]. Определение нуклеотидных последовательностей проводили с применением набора реактивов «GenSeq-100» («Синтол», Россия) на автоматическом секвенаторе Нанофор 05 («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Поиск гомологов генов 16S рПНК осуществляли с использованием базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей и построение филогенетического дерева проводили с использованием программы MEGA v.1.1 (<http://www.megasoftware.net>). При построении филогенетического дерева применяли кластерный метод «neighbor-joining». Эволюционные расстояния рассчитывали по методу «Jukes-Cantor». Оценку статистической достоверности ветвления («bootstrap»-анализ) проводили на основе 1000 альтернативных деревьев (показаны значения выше 50%). Масштаб соответствует 1 нуклеотидной замене на каждые 100 нуклеотидов.

Ростовые характеристики бактерий изучали в периодической культуре в жидкой минеральной среде K1 [6]. В качестве субстрата вносили диоктилтерефталат в концентрации 1,0 г/л.

Культуры бактерий выращивали в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (объем среды – 100 мл) при 28°C, с аэрацией на термокачалке при 100 об/мин. Оптическую плотность (ОП₆₀₀) 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 [6].

Концентрацию ДОТФ в среде измеряли через 72 часа культивирования бактерий в К1, в гексановых экстрактах на газовом хроматографе Agilent 7890В («Agilent», США) с трех-квадрупольным масс-спектрометром Agilent 7010В («Agilent», США) и с кварцевой колонкой RESTEK RTx-5MS («Restek», США). Расчет удельной скорости утилизации (μ) проводили по стандартной формуле: $\mu = (\ln C_1 - \ln C_2)/(t_2 - t_1)$, где C_1 , C_2 – концентрация субстрата в начальный и конечный момент времени t_1 и t_2 .

Результаты исследования

Все 8 грамположительных штаммов бактерий, выделенных из активного ила, были проверены на рост в минеральной среде К1 с ДОТФ в качестве источника углерода и энергии. Для дальнейшей работы был выбран наиболее активный штамм-деструктор АТ5-2, который при последующем секвенировании и биоинформационном анализе гена 16S рРНК был идентифицирован как представитель рода *Rhodococcus* (семейство *Nocardiaceae*). Наибольшее филогенетическое сходство (99,78%) штамм проявлял с типовым штаммом *Rhodococcus ruber* DSM 43338^T (LRRL01000064) (рис. 1).

Были исследованы ростовые характеристики штамма *Rhodococcus* sp. АТ5-2 при периодическом культивировании с ДОТФ в концентрации 1 г/л в минеральной среде К1. Зафиксированы и рассчитаны основные показатели роста штамма (табл.).

Таблица – Ростовые характеристики штамма *Rhodococcus* sp. АТ5-2 в минеральной среде К1 с ДОТФ (1 г/л)

Параметр	Штамм <i>Rhodococcus</i> sp. АТ5-2
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,0042
Максимальное значение ОП ₆₀₀	0,5453
Лаг-фаза роста, ч	72
Удельная скорость утилизации, сут ⁻¹	5,25
Утилизация, %	87,65

Установлены максимальная оптическая плотность (ОП₆₀₀=0,5453) после 316 часов культивирования и максимальная удельная скорость роста ($\mu=0,00531$ ч⁻¹) (табл., рис. 2). Также была исследована утилизация ДОТФ исследуемым штаммом. Установлено, что за 72 часа культивирования утилизация ДОТФ составляла 87,65%, удельная скорости утилизации ДОТФ – 5,25 сут⁻¹ (рис. 3). Из литературы известно, что бактериальное сообщество, представленное доминирующими грамположительными бактериями филума *Firmicutes*, способно утилизировать более высокие концентрации ДОТФ с 75% эффективностью (от начальной концентрации 11882 мг/кг до 180 мг/кг за 35 суток) [7]. В дальнейшем планируется провести ряд экспериментов по исследованию способности штамма *Rhodococcus* sp. АТ5-2 к утилизации более высоких концентраций ДОТФ.

Кроме того, исследуемый штамм был проверен на способность к росту на других фталатах. Отмечен эффективный рост на дибутилфталате, терефталевой и *орто*-фталевой кислотами при внесении субстратов в концентрации 1 г/л.

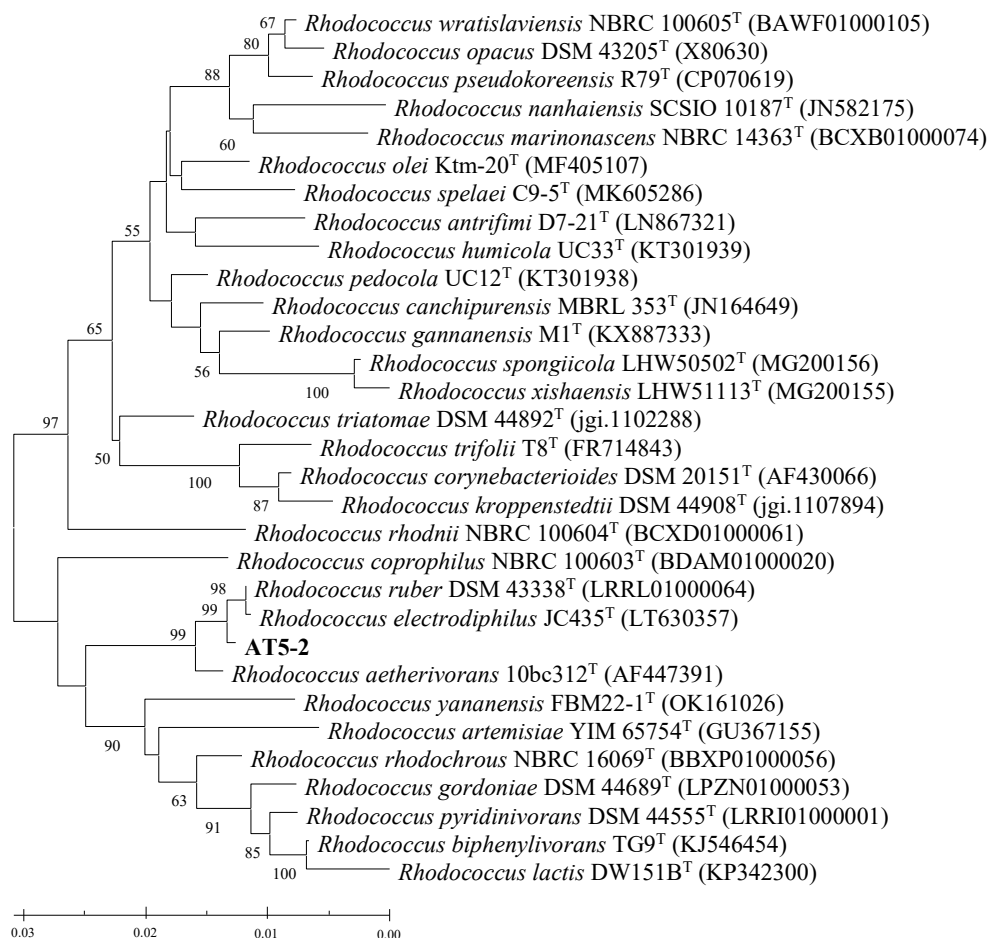


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное с использованием метода «neighbor-joining», показывающее положение исследуемых штаммов бактерий рода *Rhodococcus*, основанное на сравнении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК (длиной 1358 п.н.). Номера в базе данных GenBank указаны в скобках

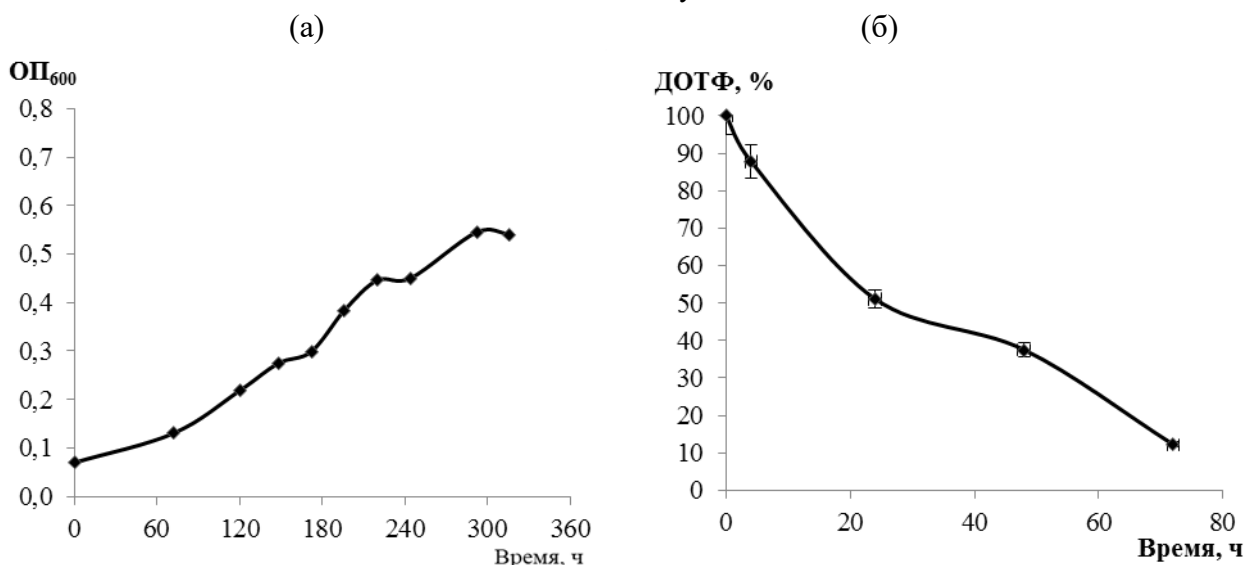


Рис. 2. Рост штамма AT5-2 при концентрации ДОТФ 1 г/л (а) и утилизация ДОТФ 200 мг/л (б) штаммом AT5-2 в жидкой минеральной среде К1

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования был изучен грамположительный штамм *Rhodococcus* sp. AT5-2, выделенный из биологических очистных сооружений нефтехимического предприятия (г. Пермь). Согласно полученным данным можно сделать вывод, что он способен к эффективной утилизации диоктилтерефталата и имеет потенциал к деструкции других эфиров фталевой кислоты, например, дибутилфталата, а также терефталата и *орто*-фталата, что делает его перспективным для использования в различных областях биотехнологий.

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

Библиографический список

1. Larsson K., Lindh C.H., Jönsson B.A., Giovanoulis G., Bibi M., Bottai M., Bergström A., Berglund M. Phthalates, non-phthalate plasticizers and bisphenols in Swedish preschool dust in relation to children's exposure // *Environ. Int.* – 2017. – V.102. – P. 114–124.
2. Demir A.P.T., Ulutan S. Migration of phthalate and non-phthalate plasticizers out of plasticized PVC films into air // *J. Appl. Polym. Sci.* – 2012. – V. 128. – P. 1948–1961.
3. Jia P., Haoyu X., Kehan T., Yonghong Z. Plasticizers derived from biomass resources: a short review. // *Polymers.* – 2018. – V.10. – №12. – P.1303.
4. Lee S.T., Tran H.T., Lin Ch., Hoang H.G., Vo T.D.H., Vu C.T., Bu X.T. Characterization of dioctyl terephthalate biodegradation by food waste composting // *Modern Physics Letters B.* – 2019. – V.33. – № 14n15. – P. 1940048.
5. Lane D.J. 16S/23S rRNA sequencing / D. J. Lane // *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* / Eds. E. Stackebrandt, M. Goodfellow. – New York.: John Wiley and Sons. – 1991. – P. 115–175.
6. 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.
7. Tran H.T., Lin C., Bui X.T., Itayama T., Dang B.T., Cheruiyot N.K., Hoang H.G., Vu C.T. Bacterial community progression during food waste composting containing high dioctyl terephthalate (DOTP) concentration // *Chemosphere.* – 2021. – V. 265. – P. 129064.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ АНТРОПОГЕННО ПРЕОБРАЗОВАННЫХ ПОЧВ

Белка М.В., Дёмин К.А., Горовцов А.В.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия*

Аннотация. Целью данной работы была оценка биоразнообразия почв с различной антропогенной нагрузкой методом учета колоний на плотной питательной среде и методом анализа метабеномов. По результатам исследования было установлено, что у почв с контрастной антропогенной нагрузкой схожая степень биоразнообразия, при этом результаты двух методических подходов коррелируют со средней силой ($r = 0,62$, $p < 0,05$).

Ключевые слова: биоразнообразие, метабеномика, микробиом, загрязнение

STUDY OF BIODIVERSITY OF MICROBIAL COMMUNITIES IN ANTHROPOGENICALLY TRANSFORMED SOILS

Belka M.V., Demin K.A., Gorovtsov A.V.

*Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology named after. D.I. Ivanovsky,
Rostov-on-Don, Russia*

Abstract. The purpose of this work was to estimate the biodiversity of soils with different anthropogenic loads by direct counting of the colonies on agar media and by analysis of the metagenomic data. According to the results of the study, it was found that soils with contrasting anthropogenic loads have similar degrees of biodiversity, with results from the two methodological approaches correlating moderately strongly ($r = 0.62$, $p < 0.05$).

Keywords: biodiversity, metagenomics, microbiome, pollution

Введение. Почва представляет собой сложную гетерогенную экосистему, выполняющую множество функций в биосфере. Большинство этих функций связаны с биогеохимическими циклами элементов, которые осуществляются при участии почвенных микроорганизмов. По разным оценкам, наиболее разнообразные микробные сообщества встречаются именно в почвах. В настоящее время для изучения микробиомов используют молекулярно-биологические методы, в первую очередь секвенирование и анализ тотальной ДНК из образца окружающей среды (метабеномный анализ). Они позволяют выявить микроорганизмы, относящиеся к некультивируемому большинству (90–99% сообщества). Одним из наиболее популярных в метабеномных исследованиях является анализ пула копий гена 16S рРНК, по разнообразию которого описывают прокариотические микробные сообщества и строят их филогенетические деревья [1]. В связи с актуальностью изучения микробных сообществ, был проведен опыт по оценке биоразнообразия микробных сообществ двух контрастирующих по уровню загрязнения почв.

Материалы и методы. Объектами данного исследования были почвы территории ботанического сада Южного федерального университета (пер. Ботанический Спуск, 7, Ростов-на-Дону, Ростовская обл., 344041) и бывшего оз. Атаманское (0,4 км на ЮЗ от дельты реки Северский Донец). Почвы территории ботанического сада характеризуются низким уровнем антропогенной нагрузки и по содержанию ТМ и ПАУ приближаются к фоновым значениям [2]. Для почв оз. Атаманское характерно экстремальное загрязнение тяжелыми металлами и полиароматическими углеводородами вследствие использования территории озера в качестве шламонакопителя. Почву бывшего оз. Атаманское можно классифицировать как технозём [3, 4]. В настоящее время Атаманское является вторичным источником загрязнения окружающей среды. Почву отбирали методом конверта. Сразу после отбора, пробы были доставлены в лабораторию, где был произведен посев почвенных разведений на питательные среды.

Произвели посев 0,05 мл суспензии четвертого разведения на среду ГПД, разбавленную в десять раз с целью имитации почвенных олиготрофных условий. Учёт колоний производился посуточно в течение 10 суток. Данные учёта использовались для вычисления ЕР и СД индексов биоразнообразия [5]. Для получения данных секвенирования образцы почв отправили в ИБФМ РАН им. Скрябина, Пущино, где была выделена и секвенирована тотальная почвенная ДНК, а также в Казанский федеральный университет, где были амплифицированы и секвенированы все копии гена 16S рРНК. Данные были использованы для анализа и расчёта индексов биоразнообразия (индекс Шеннона). Корреляции между оценками, полученными двумя разными методами, рассчитывались методом Спирмэна. Достоверность различий в оценках биоразнообразия между двумя контрастными группами почв оценивалась тестом Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение. Достоверно разнообразие отличалось и было выше в незагрязнённых почвах только для показателей ED и CD, рассчитанных на основе данных посева (тест Манна-Уитни, $p < 0,05$). Индекс Шеннона, рассчитанный на основе метагеномных данных, в среднем не различался между контрастными по антропогенной нагрузке почвами (тест Манна-Уитни, $p > 0,05$). Результаты подсчетов индексов биоразнообразия представлены в табл. 1.

Исходя из полученных данных был сделан вывод о том, что биоразнообразие почв оз. Атаманское близко к биоразнообразию почв ботанического сада. Анализ метагеномов показывает, что, даже несмотря на экстремальное загрязнение, интегральный показатель разнообразия остается высоким и достигает значений, схожих со значениями для ненарушенных почв. При оценке разнообразия культивируемой части сообщества разница становится более выраженной, по-видимому, вследствие того, что микробиота загрязнённого местообитания метаболически менее активна и не успевает приспособиться к новым условиям за установленное время инкубации. Оценки разнообразия, полученные по данным секвенирования тотальной ДНК, отличаются между образцами и между группами почв слабее всего, что может быть связано с высокой разрешающей способностью данного метода. В связи с этим сложнее определить уровень биоразнообразия только по таким данным. Исходя из результатов данной работы, рекомендуется применять анализ культивируемой части сообщества наряду с метагеномным анализом.

Таблица 1 – Значения индексов биоразнообразия, полученных на основе культуральных и метагеномных данных («НО» – не оценивалось)

Территория	Образец	Оценки по данным посева			Оценки по метагеномным данным	
		Шеннон	CD	EP	Шеннон(16S)	Шеннон (тотальный метагеном)
Атаманское	13	1,69	29,43	0,73	5,18	5,23
	28	2,03	29,56	0,88	6,07	5,76
	42	1,93	25,40	0,84	5,41	5,64
	d2	1,30	27,39	0,56	3,96	5,31
	d3	1,26	32,58	0,55	5,81	5,73
	d4	1,78	28,43	0,77	4,41	5,45
	t6	2,09	29,17	0,91	5,44	5,77
	tr1	1,91	29,43	0,83	5,33	5,06
Ботанический сад	1706	2,11	42,53	0,92	НО	5,77
	1708	2,02	42,78	0,88	НО	5,7
	1801	2,09	42,99	0,91	НО	5,67

Таблица 2 – Корреляционный анализ Спирмэна. Показаны пары индексов, для которых корреляции статистически достоверны

Индексы			Коэффициент корреляции	Уровень значимости, <i>p</i>
CD	Шеннон (по анализу тотальной ДНК)		0,69	0,0379
EP	Шеннон (по анализу копий 16S рРНК гена)		0,62	0,0308

Выводы. Индексы биоразнообразия Шеннона для анализируемых сообществ достоверно не отличаются по метагеномным данным, что свидетельствует о высоком биоразнообразии почв оз. Атаманское. Высокие ($r = 0,62$) корреляции установлены между индексом EP и индексом Шеннона, рассчитанным по данным числа копий 16s рРНК, а также между индексом CD и индексом Шеннона, рассчитанным по данным тотального секвенирования. Культуральный анализ, а именно расчёт CD и EP индексов на основе данных посуточного учёта колоний, позволяет увидеть разницу между почвенными микробиомами со схожим метагеномным разнообразием.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2023-587.

Библиографический список

1. Чернов Т.И. Метагеномный анализ прокариотных сообществ профилей почв европейской части России: дис. – Московский государственный университет им. МВ Ломоносова. Факультет почвоведения, 2016.
2. Корбань В.А., Сальник Н.В., Горбов С.Н. Сравнительная оценка транслокации цинка и свинца хвойными и лиственными породами деревьев, произрастающими на территории ботанического сада г. Ростова-на-Дону. //Проблемы загрязнения объектов окружающей среды тяжелыми металлами. – 2022. – С. 196–199.

3. Бауэр Т.В., Минкина Т.М., Линник В.Г., Манджиева С.С. Исследование статистической структуры поля загрязнения тяжелыми металлами в почвах территории оз. Атаманское (Ростовская область). XI Международная биогеохимическая школа. – Тула, 13–15 июня. – 2019 г. С. 218–221.
4. Дудникова Т.С. и др. Распределение суммарного содержания приоритетных ПАУ в химически загрязненных почвах бывшего озера Атаманского. Материалы Третьей Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы и перспективы биологического земледелия» и I Всероссийской конференции молодых ученых АПК «Актуальные вопросы развития отраслей сельского хозяйства». – Ростов-на-Дону. Изд-во: Рассвет. – 2019 г. С. 50–55.
5. Ishikuri S., Hattori T. Analysis of colony forming curves of soil bacteria // Soil science and plant nutrition. 1987. Vol. 33. № 3. P. 355–362.

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ЛЭГМ-18 И ЖР

Вожакова С.А.¹, Нестерова Л.Ю.^{1,2}, Елькин А.А.¹, Кузнецова М.В.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН, Пермь, Россия

Аннотация. В настоящее время поддержание кишечной микробиоты организма является одной из стратегий сохранения здоровья животных и человека. На основе пробиотических штаммов микроорганизмов производятся препараты, которые широко используются в ветеринарии и медицине. В данной работе изучены оптимальные условия культивирования потенциальных пробиотических штаммов *Escherichia coli* ЛЭГМ-18 и ЖР в лабораторном биореакторе на различных вариантах сред и уровень их антагонистической активности.

Ключевые слова: пробиотические штаммы, *E. coli* ЛЭГМ-18, *E. coli* ЖР, культивирование, антагонистическая активность

STUDYING THE BIOTECHNOLOGICAL PROPERTIES OF POTENTIAL PROBIOTIC STRAINS OF *ESCHERICHIA COLI* LEGM-18 AND ЖР

Vozhakova S.A.¹, Nesterova L.Y.^{1,2}, Elkin A.A.¹, Kuznetsova M.V.²

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

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

Abstract. Currently, maintaining the health of the body's intestinal microbiota is one of the strategies for maintaining the health of animals and humans. Based on probiotic strains of microorganisms, drugs are produced that are widely used in veterinary medicine and medicine. This work reflects the optimal conditions for cultivating potential probiotic strains *Escherichia coli* LEGM-18 and ЖР in a laboratory bioreactor on various media and the level of their antagonistic activity.

Keywords: *E. coli* LEGM-18, *E. coli* ЖР, cultivation, antagonistic activity

Введение. Поддержание работоспособности кишечной микробиоты животных и человека является одной из стратегий сохранения здоровья. В настоящее время с этой целью широко используются пробиотические препараты бактериального происхождения, которые способствуют формированию колонизационной устойчивости кишечника, что способствует снижению количества энтеропатогенов [1]. Особенно актуальным применение пробиотических препаратов является в связи с ограничениями использования антибиотиков, которое вызвано, в первую очередь, распространением антибиотикорезистентности бактерий. К штаммам, на основе которых изготавливаются пробиотические препараты, предъявляются специальные требования, в числе которых: способность бактерий продуцировать биологически

активные вещества с антагонистической активностью и способность бактерий к росту на различных субстратах с оптимальным урожаем [2].

Целью данной работы является выявление оптимальных условий культивирования потенциальных пробиотических штаммов *Escherichia coli* ЛЭГМ-18 и ЖР в лабораторном биореакторе и изучение их антагонистической активности.

Материалы и методы. Исследования проводились на базе лаборатории биотехнологии Естественного-научного института ПГНИУ. Все используемые штаммы получены, хранятся и поддерживаются в лаборатории молекулярной микробиологии Института экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН. Штамм *E. coli* ЖР, искусственно созданный Starčič Erjavec M. путем введения в клетки известного пробиотического штамма *E. coli* Nissle 1917 конъюгативной плазмиды pOX38a. Штамм *E. coli* ЖР перспективен в качестве основы пробиотического препарата за счет высокого уровня бактериоциногении посредством киллингового механизма, который осуществляется путем конъюгационно-опосредованной передачи гена колицина. *E. coli* ЛЭГМ-18 выделен от здорового пациента при плановом осмотре в 1993 г. на базе ИЭГМ УрО РАН коллективом исследователей под руководством профессора Р.А. Пшеничнова. В последующем, данный штамм был первично описан и депонирован во Всероссийскую коллекцию промышленных микроорганизмов под номером В-6240 [3]. В исследованиях антагонистической активности так же использовались как референтные тест-штаммы, так и природные изоляты: *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* K33, *E. coli* цип1, *E. coli* K40, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC (MRSA) 43300, *S. epidermidis* ATCC 12228, *S. epidermidis* природный изолят, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* природный изолят.

В вариантах эксперимента использовались следующие питательные среды:

- 1) «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ – бульон)», (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия);
- 2) «Панкреатический гидролизат казеина сухой ПС (ПГК сухой ПС)», (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия)

Штаммы *E. coli* ЛЭГМ-18 и ЖР выращивали в пробирке с 5 мл LB-бульона при 37°C 12 часов. Инокулят для культивирования получали путем добавления данной культуры, в колбу со 150 мл среды, соответствующей условиям эксперимента и культивирования при температуре 37°C в течение ночи. Утром инокулят стерильно вносили в ферментер, содержащий 1,5 л питательной среды. Культивирование потенциальных пробиотических штаммов проводили на различных вариантах сред в биореакторе Labfors 4 (INFORS HT, Швейцария) с использованием следующих режимов: 37°C, скорость перемешивания 800 об/мин, аэрация 10 л/мин; 37 °C, скорость перемешивания 1200 об/мин, аэрация 10 л/мин; 37°C, скорость перемешивания 1200 об/мин, аэрация 20 л/мин.

Пробы для определения оптической (ОП) плотности отбирали каждые 30-60 минут и измеряли ОП₆₀₀ на спектрофотометре DR-3900 (HACHLANGE, Германия) в кювете объемом 3 см³. Одновременно с измерением ОП определяли количество колониеобразующих единиц (КОЕ) стандартным методом высевов серийных десятикратных разведений на твердую питательную среду МПА (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия).

Определение количества КОЕ проводили методом посева серийных 10-кратных разведений на твердую питательную среду. Количество аминного азота в среде культивирования определяли методом формольного титрования [4].

Изучение антагонистической активности потенциальных пробиотических штаммов осуществляли методом отсроченного антагонизма на жидкой среде в 96-луночных планшетах [5]. Культивирование и измерение ОП проводили в мультимодальном планшетном ридере Tecan Infiniti M200 PRO (Tecan Austria GmbH, Австрия).

Результаты и их обсуждение. Первая серия экспериментов была посвящена отработке оптимальных условий культивирования *E. coli* ЖР и *E. coli* ЛЭГМ-18 на богатой питательной среде ГРМ в условиях лабораторного ферментера. При тестировании различных режимов перемешивания установлено, что максимальное накопление биомассы наблюдается при перемешивании со скоростью 1200 об/мин. Режимы с менее интенсивным перемешиванием (800 об/мин) значительно снижают как скорость роста, так и конечную плотность культуры. Ускорение перемешивания, приводит к значительной интенсификации массопереноса, что благоприятно с точки зрения прироста биомассы бактериальной культуры. Одновременно с этим были протестированы разные режимы аэрации, поскольку недостаточный уровень кислорода может негативно сказаться на продукции биомассы. Наилучший результат был достигнут при уровне аэрации 20 л/мин. Дальнейшее увеличение уровня аэрации к возрастанию скорости роста культуры и конечной ОП не приводила. Культивирование при условиях: 37 °С, скорость перемешивания 1200 об/мин, аэрация 20 л/мин сопровождалось быстрым достижением значений ОП₆₀₀ культуры выше 4,0 для обоих штаммов. Количество колониеобразующих единиц (КОЕ) *E. coli* ЛЭГМ-18 составило $2,85 \cdot 10^9$ и *E. coli* ЖР – $2,5 \cdot 10^9$. Таким образом, были подобраны оптимальные параметры для культивирования исследуемых штаммов бактерий в условиях лабораторного биореактора.

Следующий этап исследований был посвящен подбору оптимального состава питательной среды. На основании данных литературы, в том числе доступных производственных регламентов, в качестве основы питательной среды был взят панкреатический гидролизат казеина (ПГК). При культивировании на среде ПГК 5,5 г/л без внесения дополнительных компонентов уровень биомассы был низким и не достиг оптической плотности (ОП₆₀₀) 1,0. При увеличении концентрации ПГК до 22 г/л и добавке 1% пептона конечная плотность культуры увеличилась в 6,5 раз. В качестве альтернативной добавки к гидролизату казеина был использован дрожжевой автолизат, поскольку в сравнении с пептоном содержание аминного азота в дрожжевых автолизатах значительно выше [6]. Дрожжевой автолизат был добавлен к среде в количестве, которое позволило довести содержание аминного азота до показателя 1,75 мг/мл, что соответствует данным литературных источников при выращивании пробиотических штаммов микроорганизмов [7]. В данных условиях удалось достичь повышения биомассы на 18,8% в сравнении с культивированием на ПГК при добавлении пептона, а конечная ОП₆₀₀ культуры штамма *E. coli* ЖР составила 3,8, а *E. coli* ЛЭГМ-18 – 3,5. При указанной плотности было оценено количество живых клеток в культурах обоих штаммов: для штамма *E. coli* ЛЭГМ-18 оно составило $3,0 \cdot 10^9$ КОЕ/мл, а для *E. coli* ЖР – $2,9 \cdot 10^9$ КОЕ/мл.

Для определения антагонистической активности использовали бесклеточный супернатант, который получали из культур исследуемых штаммов с ОП₆₀₀ 2,5 и 3,5. О наличии/отсутствии антагонистической активности судили по подавлению роста биомассы тест – культур микроорганизмов в присутствии супернатантов исследуемых штаммов.

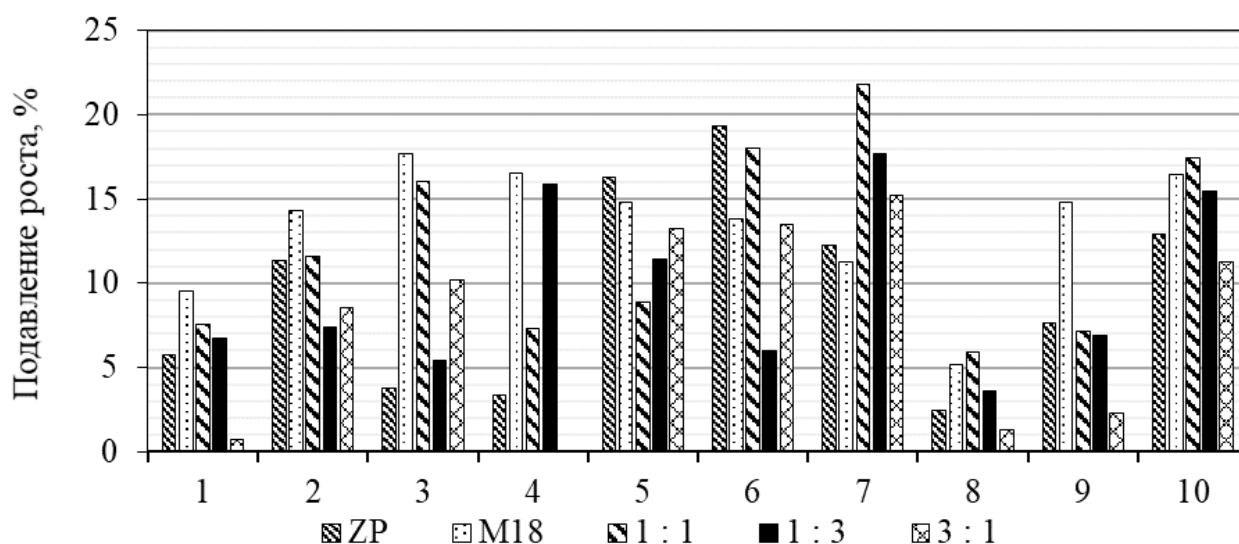


Рис. 1. Антагонистическая активность супернатантов культур *E. coli* ЛЭГМ-18 и *E. coli* ЖР (ОП₆₀₀ 2,5) (типичный эксперимент из серии). 1 – *K. pneumoniae* ATCC 700603, 2 – *K. pneumoniae* природный изолят, 3 – *S. epidermidis* ATCC 12228, 4 – *S. epidermidis* природный изолят, 5 – *S. aureus* ATCC 25923, 6 – *S. aureus* ATCC (MRSA) 43300, 7 – *E. coli* ATCC 25922, 8 – *E. coli* K33, 9 – *E. coli* K40, 10 – *E. coli* цип1

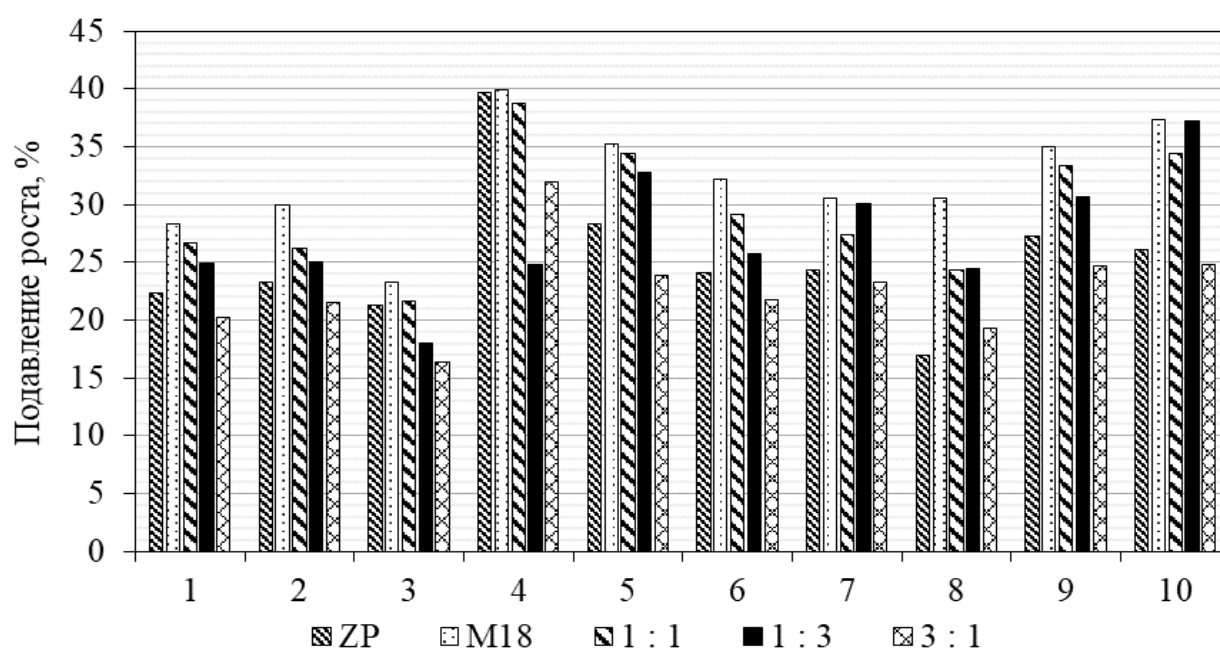


Рис. 2. Антагонистическая активность супернатантов культур *E. coli* ЛЭГМ-18 и *E. coli* ЖР (ОП₆₀₀ 3,5) (типичный эксперимент из серии). 1 – *K. pneumoniae* ATCC 700603, 2 – *K. pneumoniae* природный изолят, 3 – *S. epidermidis* ATCC 12228, 4 – *S. epidermidis* природный изолят, 5 – *S. aureus* ATCC 25923, 6 – *S. aureus* ATCC (MRSA) 43300, 7 – *E. coli* ATCC 25922, 8 – *E. coli* K33, 9 – *E. coli* K40, 10 – *E. coli* цип1

Наиболее выраженную антагонистическую активность при ОП₆₀₀ 2,5 штамм *E. coli* ЛЭГМ-18 проявлял по отношению к штаммам *K. pneumoniae* природный изолят, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC (MRSA), подавляя рост до 14%. Штамм *E. coli* ЖР ингибировал рост *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* K40, *E. coli* цип1 от 10 до 13%.

При исследовании активности супернатантов, отобранных из более плотных культур (ОП₆₀₀ 3,5), антагонистическая активность проявлялась сильнее. *E. coli* ЛЭГМ-18 подавлял рост тест-культур до 42%, в то время как *E. coli* ЖР до 30% (рис.). В большинстве случаев штамм *E. coli* ЛЭГМ-18 проявлял более высокую антагонистическую активность, чем *E. coli* ЖР.

Учитывая перспективу создания комбинированного препарата, тестировались смеси супернатанов исследуемых потенциальных пробиотических штаммов в соотношениях 1:1, 1:3 и 3:1 *E. coli* ЖР и ЛЭГМ-18 соответственно. Наиболее высокий уровень антагонистической активности по отношению к большинству тест-культур показала смесь супернатантов в соотношении 1:1, в частности наиболее значительное угнетение роста наблюдалось у тест-культур *E. coli* K40 и *E. coli* ATCC 25922, подавление роста которых достигало 43%.

Таким образом штамм *E. coli* ЛЭГМ-18 обладает более высокой антагонистической активностью, чем *E. coli* ЖР, к большинству тест-культур. Однако, не смотря на меньшую антагонистическую активность супернатантов, штамм ЖР способен уничтожать патогенные микроорганизмы посредством киллингового механизма, основанного на передаче конъюгативной плазмиды, содержащей ген колицина. Наилучшие результаты по антагонистической активности показала смесь супернатантов штаммов *E. coli* ЖР и ЛЭГМ-18 в соотношении 1:1.

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия культивирования потенциальных пробиотических штаммов *E. coli* ЛЭГМ-18 и *E. coli* ЖР в биореакторе Labfors 4 (INFORS HT, Швейцария): 37 °С с аэрацией 20 л/мин при скорости перемешивания 1200 об/мин.
2. В состав оптимальной среды культивирования входят: 33 г/л панкреатический гидролизат казеина с добавкой дрожжевого автолизата с общим содержанием аминного азота 1,75 мг/мл.
3. Исследуемые штаммы демонстрируют высокий уровень антагонистической активности, что выражается в подавлении роста тест-культур: *E. coli* ЛЭГМ-18 до 45%, *E. coli* ЖР до 31,7%.
4. Наибольшим антагонистическим эффектом среди различных сочетаний супернатантов штаммов *E. coli* ЖР и ЛЭГМ-18 обладает смесь в соотношении 1:1, при использовании которой антагонистическая активность регистрировалась на уровне до 34,5%

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/542 от 18.03.2021 г.

Библиографический список

1. Кузнецова М.В., Масленникова И.Л., Гизатуллина Ю.С., Žgur Bertok D., Starčič Erjavec M. «Биопрепарат на основе штамма *Escherichia coli* ЖР. Сообщение I. Оценка эффективности колицина при конъюгативной доставке *colE7* в клетки АРЕС in vitro И in vivo» Сельскохозяйственная биология, 2020, том 55, № 2, с. 364-377.
2. ОФС.1.7.2.0009.15 «Определение специфической активности пробиотиков»
3. <https://vkpm.genetika.ru/katalog-mikroorganizmov>

4. ОФС.1.2.3.0022.15 «Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования»
5. Бухарин О.В., Семенов А.В., Черкасов С.В. // Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер. 2010. Т. 12. №4. С. 347–352
6. Поляк М.С., Сухаревич В.И., Сухаревич М.Э. «Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии» СПб.: ЭЛБИ-СПб. – 2008. – 352 с.
7. Тимербаева Р.Х., Баталова Т.А. «Способ получения панкреатического белкового гидролизата и питательная среда для культивирования бифидобактерий с его использованием», 2002. RU 2 253 673 С2

ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ПРИ РАННЕМ ОТВЕТЕ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* НА ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК

Габова А.О.^{1,2}, Тюленев А.В.¹, Смирнова Г.В.¹

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

² Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

Аннотация. Аэробные культуры бактерий *Escherichia coli*, растущие на сульфате как единственном источнике серы, продуцируют сульфид на ранней стадии ответа на гиперосмотический шок. Использование нокаут мутантов показало, что продукция сульфидов тесно связана с наличием трипептида глутатиона (GSH) и активностью глобального регулятора RpoS, контролирующего адаптацию *E. coli* к стрессам. Результаты свидетельствуют о включении механизма поддержания гомеостаза цистеина в ответ *E. coli* на гиперосмотический шок.

Ключевые слова: гиперосмотический шок, продукция сульфидов, *Escherichia coli*

SULFIDE PRODUCTION IN THE EARLY RESPONSE OF *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA TO HYPEROSMOTIC SHOCK

Gabova A.O.^{1,2}, Tyulenev A.V.¹, Smirnova G.V.¹

¹ 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

² Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

Abstract. Aerobic cultures of *Escherichia coli* bacteria growing with sulfate as the only source of sulfur produce sulfide in an early response to hyperosmotic shock. The use of knockout mutants showed that sulfide production is strongly associated with the presence of glutathione (GSH) and the activity of the global regulator RpoS, which is responsible for the adaptation of *E. coli* to stress. The results indicate the inclusion of a mechanism for maintaining cysteine homeostasis in the response of *E. coli* to hyperosmotic shock.

Keywords: hyperosmotic shock, sulphide production, *Escherichia coli*

Введение. В процессе жизнедеятельности микроорганизмы регулярно встречаются с воздействием различных неблагоприятных факторов. К числу наиболее часто встречающихся стрессов в естественных условиях обитания можно отнести изменения осмотического давления. Механизмы адаптации бактерий к осмотическому шоку хорошо изучены, но остается мало исследованным процесс раннего ответа, протекающий сразу после изменения осмотического давления и связанный с быстрой перестройкой физиологических параметров, характеризующих дыхательную активность, трансмембранные ионные потоки и активацию стрессовых регулонов.

Ранее было показано, что у бактерий *Escherichia coli* важную роль в адаптации к осмотическому шоку могут играть низкомолекулярные тиолы, в первую очередь, трипептид глутатион (GSH) [1]. Менее изучены функции других низкомолекулярных серосодержащих соединений, таких как сульфид водорода (H_2S). В последние годы резко возрос интерес к изучению функции сульфида в связи с обнаружением его продукции бактериями *E. coli* при различных стрессах [2]. Было показано, что этот процесс вовлечен в регуляцию гомеостаза внутриклеточного цистеина. Свободный цистеин способен вступать в реакцию Фентона, в результате чего образуются токсичные гидроксильные радикалы, повреждающие ДНК, белки и мембраны [3]. Одним из способов поддержания низкого уровня цистеина является его деструкция с участием различных десульфидаз с образованием H_2S [4]. Представляет интерес изучение продукции сульфида при раннем ответе на осмотический шок у *E. coli*.

Объекты и методы. Объект исследования: бактерии *E. coli* из коллекции Keio: BW25113 (родительский штамм), JW2663 – дефектный по синтезу глутатиона (*gshA*), JW2414 – дефектный по синтетазе цистеина II (*cysM*), JW5437 – штамм, лишенный глобального регулятора RpoS, участвующего в адаптации к стрессам.

Бактерии культивировали при 37°C в 250-мл колбах на орбитальном шейкере на среде M9 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ – 15,13 г/л; KH_2PO_4 – 3 г/л; NH_4Cl – 1 г/л; NaCl – 0,5 г/л; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,246 г/л; $CaCl_2$ – 0,011 г/л) [5] с добавлением 0,15% глюкозы в качестве источника углерода и энергии. Неорганический сульфат является единственным источником серы.

Накопление биомассы (OD_{600}) и удельную скорость роста (μ) культуры определяли общепринятыми способами. Измерения с использованием электрохимических ион-селективных сенсоров проводили непосредственно в колбах с аэробно растущими культурами *E. coli* в режиме реального времени. Изменение уровней экстраклеточного сульфида определяли с помощью сульфид-специфичного ионоселективного халькогенидного электрода XC-S²⁻-001 («Сенсорные системы», РФ) [2].

Осмотический шок индуцировали добавлением в аэробную культуру 0,6 М NaCl в середине экспоненциальной фазы роста ($OD_{600} = 0,4$). При этой концентрации хлорида натрия наблюдалась значительное, но обратимое торможение скорости роста бактерий.

Изменения уровней ионов S^{2-} представлены в виде линий тренда (типичные в серии экспериментов).

Результаты и обсуждение. Добавление 0,6 М NaCl в среду, не содержащую клеток, изменяло базовые значения потенциала сульфид-специфичного электрода на постоянную величину в область положительных значений, что учитывалось при обработке полученных данных и интерпретации результатов.

При индукции осмотического шока в аэробно растущей культуре наблюдалось резкое снижение удельной скорости роста (μ) у всех используемых штаммов, после чего бактерии возобновляли рост в течение последующих 15 минут.

В период максимального ингибирования роста было выявлено резкое обратимое увеличение продукции эндогенного сульфида клетками в среду, о чем свидетельствовало изменение потенциала сульфидного сенсора на $10,8 \pm 1,0$ мВ продолжительностью 15 мин в клетках родительского штамма и на $53,0 \pm 1,1$ мВ в течение 90 мин у мутантов *gshA*, лишенных способности синтезировать глутатион. У штамма, дефектного по глобальному регулятору RpoS (*rpoS*), через 20 мин после индукции осмотического шока выявлен скачок потенциала

сульфидного сенсора на $63,5 \pm 5,3$ мВ, продолжающийся в течение 55 мин. У мутантов *cysM* изменение продукции эндогенного сульфида при осмотическом шоке не регистрировалось (рис.).

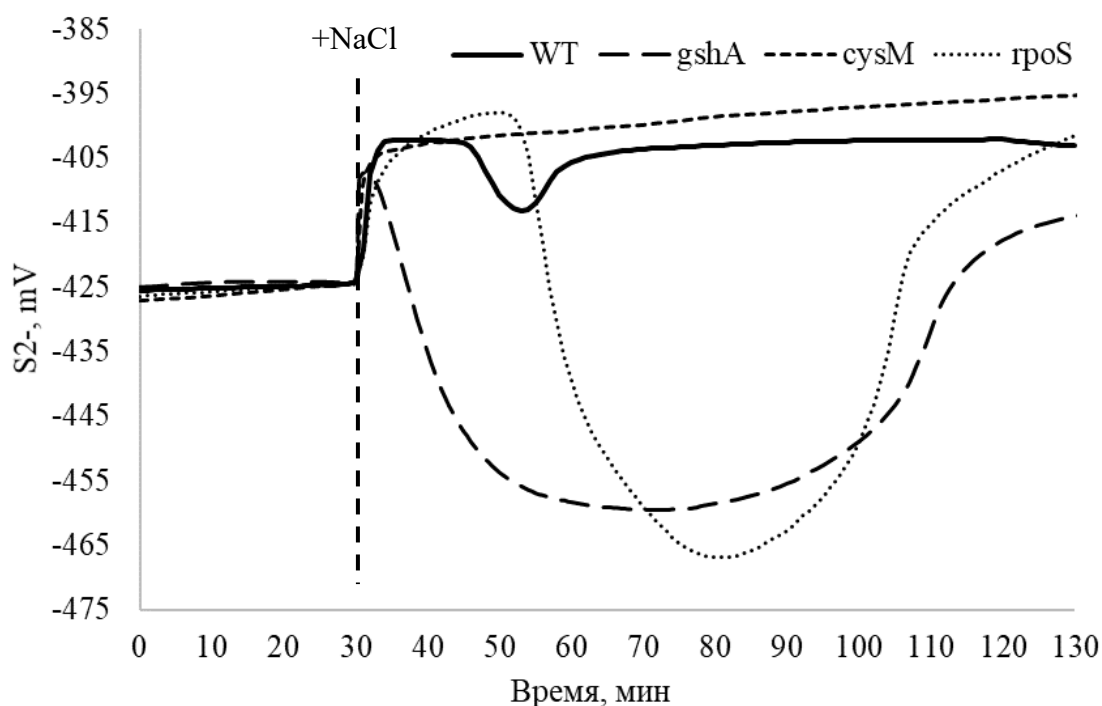


Рис. Изменения продукции эндогенного сульфида (S^{2-}) у аэробнорастущих штаммов *E. coli* при индукции осмотического шока (момент внесения NaCl обозначен стрелкой)

Заключение. Ранее у бактерий *E. coli* было обнаружено увеличение продукции эндогенного сульфида при таких стрессах как действие антибиотиков, голодание по источнику углерода или фосфора, сопровождающихся резким ингибированием роста [6]. Полученные в этой работе результаты показывают, что осмотический шок является еще одним стрессом, при котором остановка роста у этих бактерий сопровождается выбросом эндогенного S^{2-} в среду, что в свою очередь может указывать на важную роль как самого сульфида, так и глутатиона в поддержании гомеостаза цистеина при осмотическом шоке. Интересно, что у штамма с дефектом по синтетазе цистеина II (*cysM*), отсутствие изменения уровней сульфида при стрессе может быть обусловлено нарушением деструкции цистеина, при котором образуется H_2S . Кроме того, у штамма *rpoS* начало продукции сульфида было отсрочено по сравнению с другими штаммами, что свидетельствует об участии глобального регулятора RpoS в регуляции гомеостаз цистеина на раннем этапе адаптации к осмотическому шоку.

Работа поддержана грантом РФФИ № 22-14-00093 и гос. заданием АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Октябрьский О.Н. Изменения редокс-потенциала в культурах бактерий при стрессах / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Микробиология. 2012. Т. 81. № 2. С. 147-158.

2. Tyulenev A.V., Smirnova G.V., Muzyka N.G., Ushakov V.Y., Oktyabrsky O.N. The role of sulfides in stress-induced changes of Eh in *Escherichia coli* cultures // Bioelectrochemistry. – 2018. – V. 121. – P. 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2017.12.012>.
3. Park S., Imlay, J.A. High Levels of Intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton Reaction // Journal of Bacteriology. 2003. Vol. 185, P. 1942–1950. doi:10.1128/jb.185.6.1942-1950.2003
4. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternykh K.V. [et al.] Cysteine homeostasis under inhibition of protein synthesis in *Escherichia coli* cells // Amino Acids. 2019. Vol. 51. P. 1577-1592. DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2
5. Miller J.H. Experiments in molecular genetics / J.H. Miller // Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. – 1972. – 466 p.
6. 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. DOI: 10.1007/s00726-019-02795-2.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ ШТАММА *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* N59 – ПРОДУЦЕНТА НИТРИЛАЗЫ

Громова О.А.¹, Максимов А.Ю.^{1,2}, Елисеева А.Д.²

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия.

Аннотация. Исследовано влияние внесения в почву биомассы штамма протеобактерий *Pseudomonas fluorescens* N59, обладающего высокой нитрилазной активностью, на рост модельных растений томата. Показано, что *P. fluorescens* N59 оказывает стимулирующее влияние на рост растений, близкое к таковому у известного штамма *P. fluorescens* C2 – продуцента нитрилазы.

Ключевые слова: *Pseudomonas fluorescens*, нитрилаза, ауксин, томаты

PROSPECTS FOR USING *PSEUDOMONAS FLUORESCENS* N59 STRAIN – A NITRILASE PRODUCER IN PLANT PRODUCTION

Gromova O.A.¹, Maksimov A.Yu.^{1,2}, Eliseeva A.D.²

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Perm Federal Research Center of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences,
Perm, Russia.

Abstract. The effect of adding biomass of the proteobacteria strain *Pseudomonas fluorescens* N59, which has high nitrilase activity, to the soil on the growth of model tomato plants was studied. It was shown that *P. fluorescens* N59 has a stimulating effect on plant growth, close to that of the known strain *P. fluorescens* C2, a nitrilase producer.

Keywords: *Pseudomonas fluorescens*, nitrilase, auxin, tomatoes

В последнее время, в связи с развитием интереса к экологизации и необходимостью повышения устойчивости мирового земледельца, во всем мире все интенсивнее внедряются новые биотехнологические методы [1,2]. Такие подходы преимущественно основаны на использовании микробиологических препаратов, представляющих из себя находящиеся в суспензии или адсорбированные на нейтральном носителе живые клетки селекционированных по полезным свойствам микроорганизмов [3-5]. Известно, что такие препараты способны не только улучшать минеральное питание, но и фитосанитарное состояние корневой зоны. Поэтому обогащение ризосферы культурных растений ростостимулирующими микроорганизмами способствует повышению их продуктивности и стрессоустойчивости к неблагоприятным внешним факторам, таким как дефицит биогенных элементов или влаги в критические периоды развития растительного организма.

В связи с этим актуален поиск эффективных штаммов с новыми полезными свойствами. Перспективными для сельского хозяйства представляются бактерии, выделенные из экс-

тремальных сред, вследствие того, что их применение на практике позволяет расширить диапазон условий применения. В настоящее время наблюдается большой интерес исследователей к поиску, идентификации, изучению и разработке технологий промышленного применения экстремофильных бактерий, многие из которых являются продуцентами гидралаз – протеиназы, амилазы, липазы, используемых в производстве моющих средств, а также целлюлазы, нитрилазы и др. [6–10]. Однако в научной литературе мало освещены вопросы практического применения таких микроорганизмов в сельскохозяйственной биотехнологии качестве стимуляторов роста растений. Поэтому, несмотря на возрастающее количество публикаций в области биотехнологии продуцентов ферментов, полученные данные, не отображают весь спектр возможности сельскохозяйственного применения этих микроорганизмов, в частности, в растениеводстве. Перспективными для растениеводства представляются также микроорганизмы, продуцирующие нитрилазы. Известно, что некоторые штаммы, обладающие нитрилазной активностью, проявляют выраженное ростстимулирующее действие за счет трансформации индол-3-ацетонитрила, выделяемого в ризосферной зоне, с образованием фитогормона ауксина (индол-3-ацетата) [11, 12]. Разработка на основе таких культур искусственных ассоциаций с экстремофилами – продуцентами других ферментов, является перспективной для решения комплексных задач улучшения питания растений и получения биодобровений.

Цель работы: изучение влияния внесения в почву суспензии бактерий *Pseudomonas fluorescens* – продуцентов нитрилазы, на рост модельных растений томатов.

Штамм гаммапротеобактерий *Pseudomonas fluorescens* N59, проявляющий высокую нитрилазную активность, до 9 мкмоль/мг/мин, выделен ранее из природной дерново-луговой почвы, отобранной в Нытвенском р-не Пермского края, в пойменной зоне р. Сюзьва. Ранее показано, что данный штамм способен к трансформации индол-3-ацетонитрила до индол-3-ацетата (фитогормона ауксина), и к росту в широком диапазоне pH.

В качестве модельного растения для анализа фитостимулирующего действия бактерии был выбран сорт томата «Балконное чудо». В инокулированный бактериальной суспензией грунт высаживали 15-суточные проростки растений, выращенные предварительно в равных условиях в лотках в том же грунте без добавок. Выращивали растения в фитотроне, при искусственном освещении в условиях 14-часового фотопериода, при температуре 25°C. Для инокуляции использовали предварительно отмытую биомассу бактерий, выращенных до стационарной фазы, ресуспендированную в воде до концентрации 10^9 клеток/мл. Суспензию вносили в почву из расчета 10^{10} клеток на 100 г почвы.

Варианты опыта: К – Контроль: инокулирована термически инактивированная биомасса бактерий *P. fluorescens* N59; N59 – Инокулирована живая культура *P. fluorescens* N59, обладающий нитрилазной активностью; С2 – Инокулирована живая культура *P. fluorescens* С2 из коллекции ЛМБ ИЭГМ УрО РАН, обладающий нитрилазной активностью; 16М – Инокулирована живая культура *P. fluorescens* 16М без нитрилазной активности;

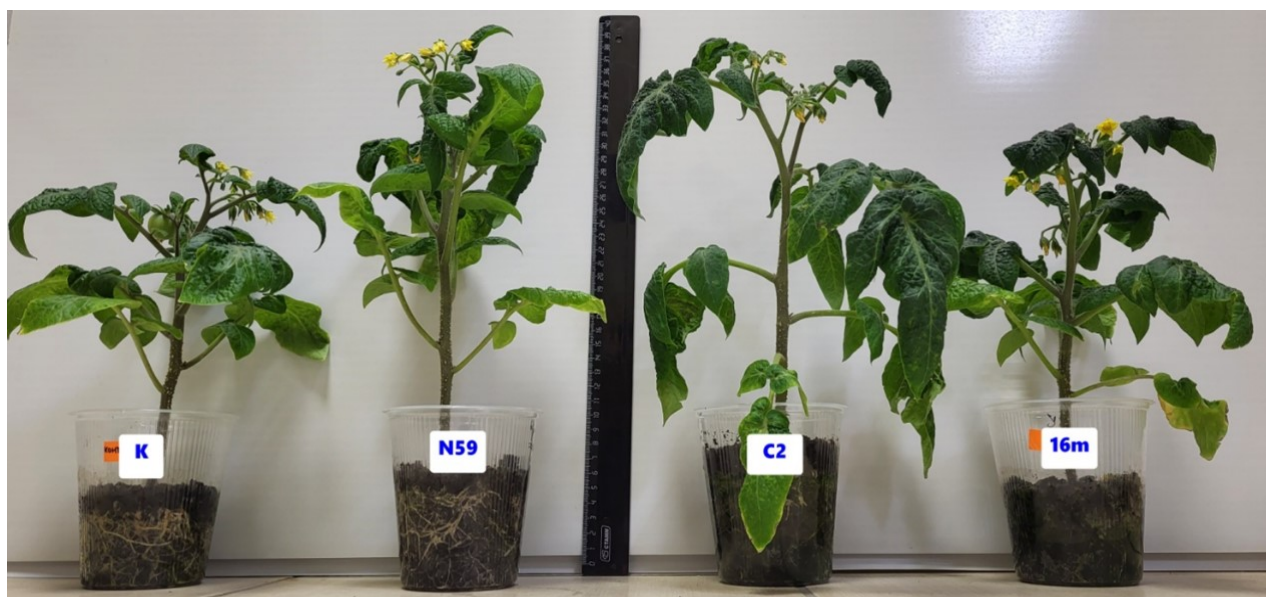


Рис. 1. Томаты на 40-е сутки роста после инокуляции

К– контроль: термически инактивированная биомасса бактерий *P. fluorescens* N59;
 N59 – суспензия живых клеток *P. fluorescens* N59 – продуцента нитриказы;
 C2 – суспензия живых клеток *P. fluorescens* C2 – продуцента нитриказы;
 16M – суспензия живых клеток *P. fluorescens* 16M, не обладающих нитриказной активностью.

Установлено, что инокуляция активными культурами исследуемых штаммов повышала прирост вегетативной массы растений (рис. 1). Показано, что добавление *P. fluorescens* N59 в почву увеличивает морфометрические параметры томатов по сравнению с контрольным вариантом (инокуляция термически инактивированной биомассой этой же культуры), а также с вариантом с инокуляцией суспензией живых клеток *P. fluorescens* 16M, не обладающих нитриказной активностью. Ростостимулирующая активность новой культуры *P. fluorescens* N59 была близка к таковой у ранее исследованного штамма *P. fluorescens* C2 – продуцента нитриказы, выделенного в Лаборатории молекулярной биологии ИЭГМ УрО РАН, депонированного во Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ) ИБФМ РАН, под номером В-2597Д (табл. 1).

Таблица 1 – Средние морфометрические параметры томатов на 40-ые сутки роста

№	Длина корня, см	Длина побега, см	Свежая масса, г		Сухая масса, г	
			корня	побега	корня	побега
К	6.8±1.9	12.9±2.8	0.56±0.22	4.34±1.22	0.05±0.02	0.49±0.43
1	6.9±2.5	13.4±2.9	0.57±0.21	8.24±1.34	0.06±0.02	0.49±0.39
2	12.4±1.5	25.5±3.8	1.41±0.46	14.91±1.57	0.14±0.05	1.58±0.42
3	13.3±1.2	24.3±4.0	1.38±0.21	13.95±1.54	0.14±0.06	1.52±0.53

Установлено, что в вариантах N59 и C2 наблюдается также увеличение количества междоузлий, соцветий и, по окончании эксперимента, увеличение общей продуктивности на 18 и 15%, соответственно.

Таким образом, установлено, что штамм *Pseudomonas fluorescens* N59, обладающий высокой нитрилазной активностью, стимулирует развитие корневой системы, общий рост растительной биомассы и продуктивность растений. Данная культура представляется перспективной для получения комплексных микробных препаратов, нормализующих корневую микрофлору и стимулирующих продуктивность растений.

Работа выполнена в рамках государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3, в части эксперимента в условиях светокультуры, а также в рамках научного проекта № С-26/507 Минобрнауки Пермского края, в части микробиологических исследований и получения активного микробного препарата.

Библиографический список

1. Занилов А.Х., Яхтанигова Ж.М. К органическому сельскому хозяйству через биологизацию // Инновации в АПК: проблемы и перспективы. – 2016. – № 1. – С. 47–52.
2. Петров В.Б. и др. Микробиологические препараты в практическом растениеводстве России: функции, эффективность, перспективы // Рынок АПК. – 2009. – № 7. – С. 16–18.
3. Мотина Т.Ю. и др. Биоудобрения комплексного действия на основе консорциума микроорганизмов и наноструктурных агроминералов для получения экологически безопасной продукции растениеводства // Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20. – № 12. – С. 122–126.
4. Соболева О.М. Роль ризосферных бактерий в повышении экологизации агроценозов // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32. – № 5. – С. 19–22.
5. Воробейков Г.А., Лебедев В.Н., Ураев Г.А. Сравнительная оценка влияния биопрепаратов и минеральных удобрений на рост и продуктивность горчицы сарептской (*Brassica juncea* Czern.) // Пермский аграрный вестник. – 2022. – № 1 (37). – С. 14–21.
6. Морозкина Е.В. и др. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение (обзор) // прикладная биохимия и микробиология. 2010. Т. 46, № 1. С. 5–20.
7. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Шилова А.В. Биотехнологический потенциал бактерий щелочных высокоминерализованных сред содового шламохранилища (Березники, Пермский край). // Вестник Пермского федерального исследовательского центра. – 2022. – № 4. – С. 16–25.
8. Шилова А.В., Максимов А.Ю., Максимова Ю.Г. Выделение и идентификация алкалолентных бактерий с гидролитической активностью из содового шламохранилища // Микробиология. – 2021. – Т. 90 (2). – С. 155–165.
9. Максимова Ю.Г., Шилова А.В., Егорова В.В., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Физиолого-биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал гидролитических галоалкалолентных бактерий содового шламохранилища // Изв. Росс. академии наук. Сер. биологическая. – 2023. – № 2. – С. 149–159.
10. Максимов А.Ю., Быкова Я.Е., Пьянкова Е.В., Щетко В.А., Максимова Ю.Г. Препараты гидролитических ферментов из галоалкалолентных бактерий для целей сельского хозяйства // Актуальная биотехнология. – 2022. – № 1. – С. 99–101.

11. 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.
12. Tang J., Li Y., Zhang L., Mu J., Jiang Y., Fu H., Zhang Y., Cui H., Yu X., Ye Z. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms // Microorganisms. – 2023. – V.11(8):2077. doi: 10.3390/microorganisms11082077.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ПРОДУКЦИЮ СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ АНТИБИОТИКОВ

Егорова В.В.¹, Ушаков В.Ю.^{1,2}, Смирнова Г.В.², Октябрьский О.Н.²

¹ Пермский национальный государственный исследовательский университет, Пермь, Россия

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

Аннотация. Бактерии *Bacillus subtilis*, растущие аэробно на глюкозо-минеральной следе М9, продуцировали H₂S при обработке антибиотиками, ингибирующими синтез белка, тетрациклином, эритромицином и хлорамфениколом. Продукция H₂S наблюдалась также при действии тетрациклина и эритромицина (но не хлорамфеникола) на *B. subtilis*, растущие на среде LB (Luria Bertani Broth), но в меньших концентрациях.

Ключевые слова: H₂S, антибиотики, питательная среда

INFLUENCE OF NUTRIENT MEDIUM COMPOSITION ON HYDROGEN SULFIDE PRODUCTION OF *BACILLUS SUBTILIS* TO THE ACTION OF ANTIBIOTICS

Egorova V.V.¹, Ushakov V.Yu.^{1,2}, Smirnova G.V.², Oktyabrsky O.N.²

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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. *Bacillus subtilis* bacteria growing aerobically on the glucose-mineral trace of M9 produced H₂S when treated with antibiotics inhibiting protein synthesis, tetracycline, erythromycin and chloramphenicol. H₂S production was also observed under the action of tetracycline and erythromycin (but not chloramphenicol) on *B. subtilis* growing on LB medium (Luria Bertani Broth), but in lower concentrations.

Keywords: H₂S, antibiotics, growth medium composition

У млекопитающих H₂S является важным эндогенным газотрансмиттером и сигнальной молекулой [1]. Накапливаются данные о важной роли эндогенно продуцируемого H₂S в физиологии бактерий. Было доложено, что H₂S может защищать бактерии от повреждений, вызванных антибиотиками [2]. и окислительного стресса [3], а также включен в механизм защиты бактерий от иммунного ответа хозяина. Модуляция уровня эндогенного сероводорода может существенно изменить чувствительность бактерий, в том числе патогенных, к антибиотикам.

При выращивании бактерий в лабораторных условиях источником H₂S может быть цистеин, который транспортируется из питательной среды или синтезируется *de novo* из сульфата. При этом повышенные концентрации внутриклеточного цистеина являются токсичными, поскольку могут потенцировать реакцию Фентона через восстановление Fe³⁺ до Fe²⁺ [4]. Образующий гидроксильный радикал может повреждать все важнейшие биомолеку-

лы (ДНК, белки и мембраны). Вследствие этого бактерии должны строго контролировать уровень свободного внутриклеточного цистеина. У грамотрицательных бактерий *E. coli* де-сульфурирование цистеина до H_2S является одним из способов снижения его внутриклеточной концентрации до безопасного уровня [5]. Показано, что у бактерий *E. coli* остановка роста, вызванная обработкой рядом антибиотиков, сопровождается увеличением экстраклеточного сульфида. При этом продукция H_2S , в значительной мере, зависела как от вида и дозы антибиотика, так среды культивирования [6].

Цель настоящей работы: исследовать продукцию H_2S при обработке грамположительных бактерий *Bacillus subtilis*, растущих на минимальной среде М9 и богатой среде LB, бактериостатическими антибиотиками, тетрациклином, эритромицином и хлорамфениколом. Бактериостатическое действие исследуемых антибиотиков связано с ингибированием синтеза белка на рибосомах.

Материалы и методы. Выращенные на твердой питательной среде клетки переносились в жидкую минеральную среду М9 + глюкоза (1%) или богатую среду LB (Sigma) и культивировались в орбитальном шейкере при 37 °С 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 концентрации 30 или 60 мкг/мл. После добавления антибиотика измерялась продукция H_2S . Детекцию газообразной формы сульфида водорода проводили полуколичественным методом, измеряя его концентрацию в воздушной среде над бактериальной культурой с помощью бумажных полосок, пропитанных ацетатом свинца. Количественно изменение окраски определяли по гистограмме цвета в программе ImageJ, интенсивность выражали в процентах. Данные анализировались при помощи пакета программ Excel 2010. В бесклеточной среде изменение цвета бумажных полосок выявляется при добавлении 0.1 мкм Na_2S , что свидетельствует о высокой чувствительности метода.

Результаты исследований. Удельная скорость роста бактериальных клеток в контроле зависела от состава среды культивирования и составляла 0.45 час⁻¹ на среде М9 и 1.3 час⁻¹ на среде LB (рис. 1, 2).

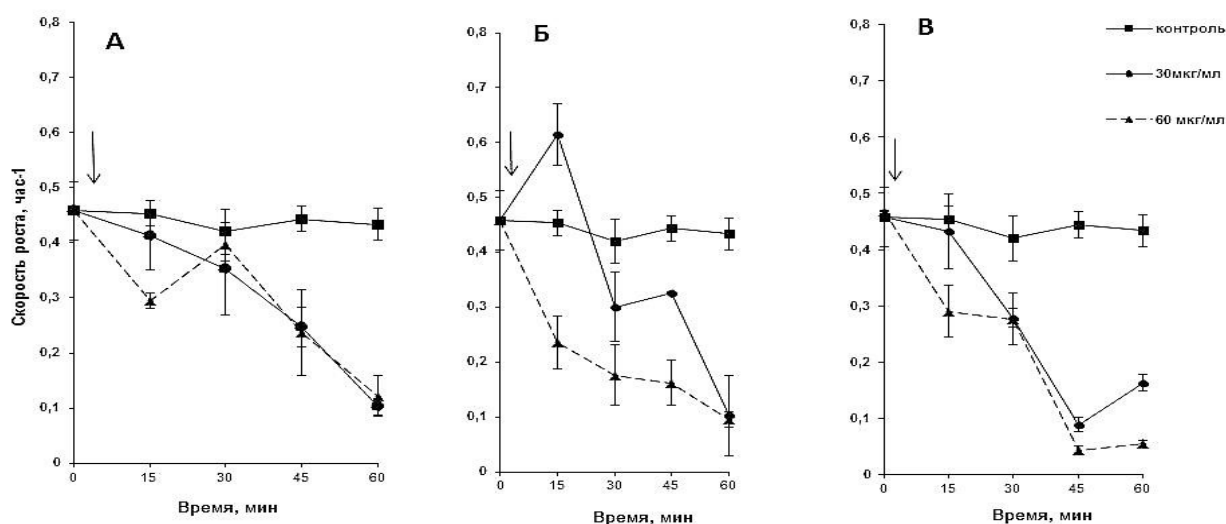


Рис. 1. Изменение удельной скорости роста при обработке бактерий *B. subtilis* антибиотиками на минимальной среде М9. А – тетрациклин; Б – эритромицин; В – хлорамфеникол.

Стрелкой указано время внесения антибиотика

Вероятно, такая разница обусловлена тем, что на среде М9 для синтеза всех биологических соединений *de novo* клеткам *B. subtilis* требуется большое количество энергии, чем при росте на среде LB.

На среде М9 через 60 мин после добавления 30 или 60 мкг/мл тетрациклина бактерии продолжали расти, но их удельная скорость роста была в 4 раза ниже, чем в контроле (рис. 1 А). Рост бактерий на среде LB полностью прекращался через 40 и 80 мин после обработки 60 и 30 мкг/мл тетрациклина, соответственно (рис.1, 2 А).

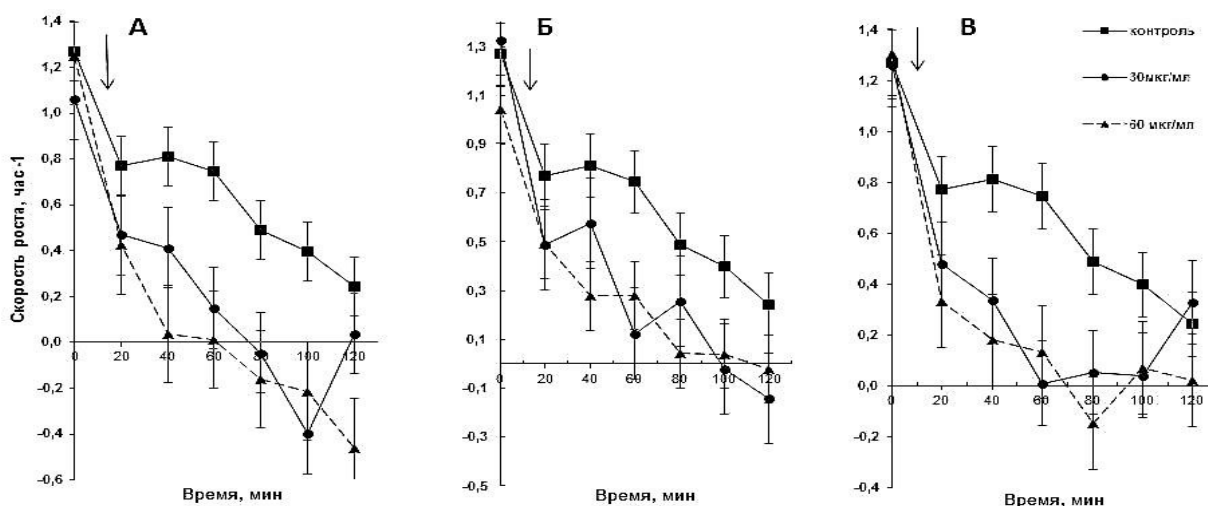


Рис. 2. Изменение удельной скорости роста при обработке бактерий *B. Subtilis* антибиотиками на богатой среде LB. А – тетрациклин; Б – эритромицин; В – хлорамфеникол. Стрелкой указано время внесения антибиотика

На среде М9 эритромицин и хлорамфеникол действовали таким же образом как тетрациклин (рис.1 Б, В). Рост бактерий на среде LB полностью прекращался через 80 и 100 мин после обработки 60 и 30 мкг/мл эритромицина, соответственно (рис. 2 Б).

При обеих дозах хлорамфеникола рост бактерий на среде LB прекращался примерно через 60 мин (рис. 2 В). В целом, результаты свидетельствуют о том, что бактериостатическое действие исследуемых антибиотиков значительно сильнее выражено при росте *B. subtilis* на богатой среде, чем на М9. Этот эффект может быть связан с более высокой скоростью роста в первом случае [7]

Не отмечено продукции сероводорода в культурах *B. subtilis*, растущих на обоих исследуемых средах без каких-либо добавок (рис. 3, 4, 5). Статистически достоверное выделение H_2S наблюдалось при экспозиции 30 и 60 мкг/мл тетрациклина к *B. subtilis*, растущим как на богатой, так и глюкозо-минеральной среде.

В культурах, растущих на среде М9, увеличение дозы антибиотика вдвое приводило к адекватному увеличению продукции H_2S . На обеих средах максимальная продукция H_2S наблюдалась на 40 минуте после добавления тетрациклина и составляла в среднем 20% по отношению к контролю (рис. 3).

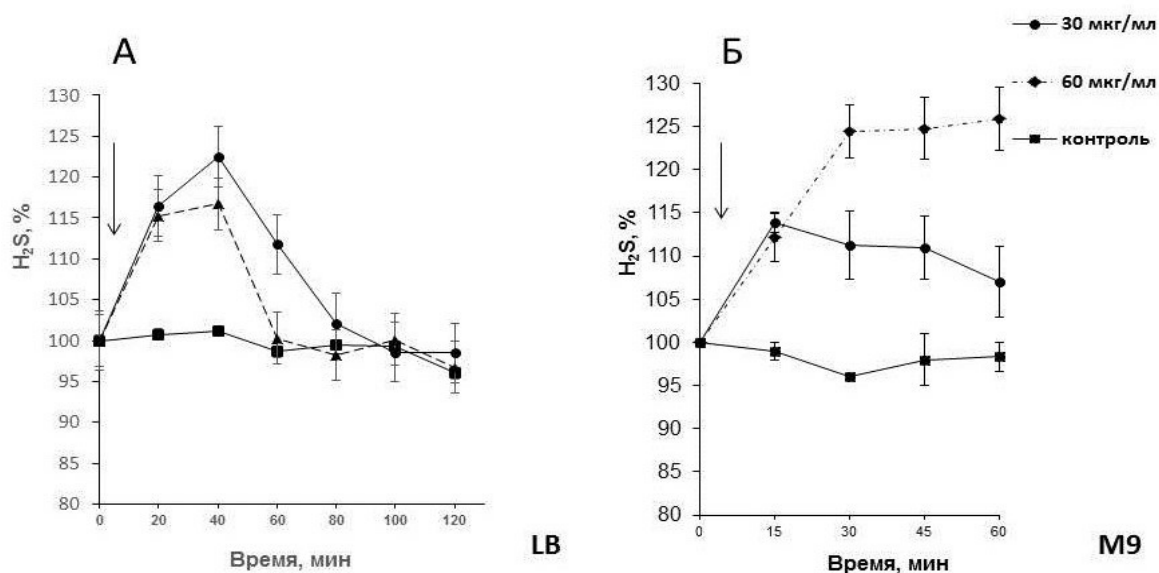


Рис. 3. Продукция H_2S у бактерий *B. subtilis* при действии тетрациклина. А- на богатой среде LB; Б – на глюкозо-минеральной среде М9. Стрелкой указано добавление антибиотика

После добавления эритромицина на среде М9 обнаружена корреляция между концентрацией антибиотика и временем максимальной продукции сульфида водорода. Бактерии *B. subtilis* выделяли максимальное количество H_2S на 30 и 60 минуте эксперимента при добавлении 30 и 60 мкг/мл эритромицина, соответственно (рис. 4 Б). Подобный эффект при росте бактерий на среде LB не обнаружен. За первые 40 минут культивирования продукция H_2S составила 15% по отношению к контролю (рис. 4 А)

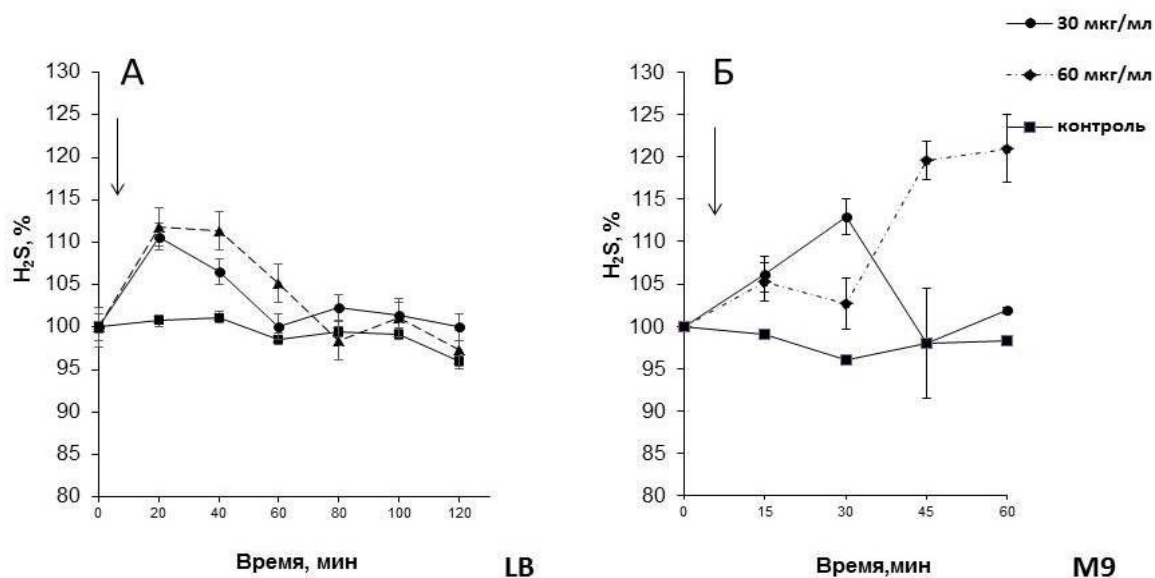


Рис. 4. Продукция H_2S у бактерий *B. subtilis* при действии эритромицина. А- на богатой среде LB; Б – на глюкозо-минеральной среде М9. Стрелкой указано добавление антибиотика

При действии 30 и 60 мкг/мл хлорамфеникола статистически достоверное увеличение продукции H_2S отмечено только в культуре *B. subtilis*, растущей на среде М9 (рис. 5). Возможно, это связано с высокой токсичностью данного антибиотика, приводящей к ингибированию метаболизма.

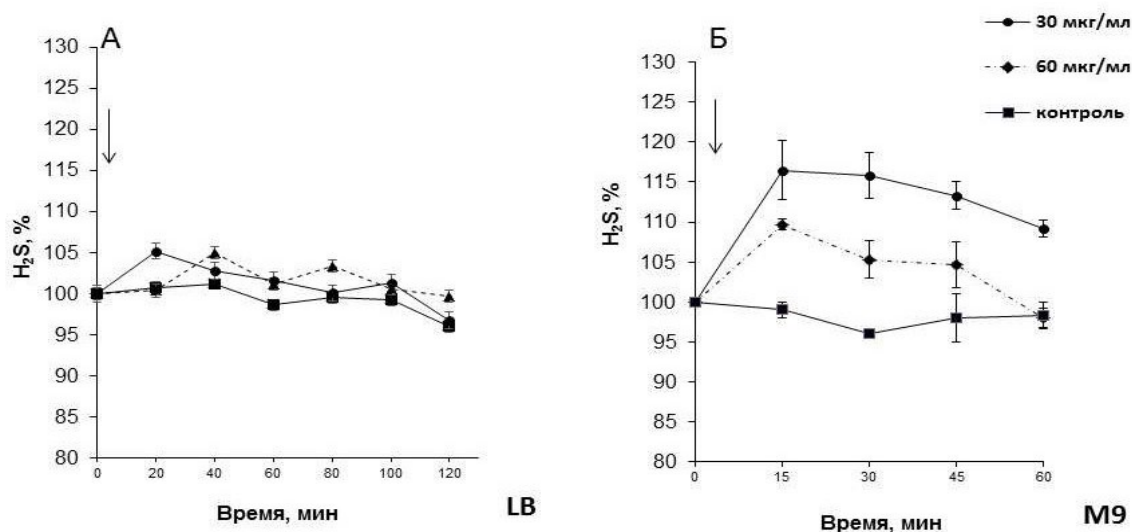


Рис. 5. Продукция H_2S у бактерий *B. subtilis* при действии хлорамфеникола. А- на богатой среде LB; Б – на глюкозо-минеральной среде М9. Стрелкой указано добавление антибиотика

Полученные в этой работе результаты свидетельствуют о том, что индуцируемая антибиотиками продукция H_2S в культурах *B. subtilis* зависит, в значительной мере не только от вида и концентрации антибиотика, но и от состава инкубационной среды, что особенно заметно в случае с тетрациклином.

Работа выполнена в рамках госзадания АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта РНФ № 22-14-00093

Библиографический список

1. 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. H_2S signals through protein S-sulfhydration. // Sci. Signal. – 2009. – V.2 (96) – P. 72.
2. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H_2S : a universal defense against antibiotics in bacteria // Science. – 2011. – V. 334. – P. 986–990.
3. Mironov A., Seregina T., Nagornyykh S. et al. Mechanism of H_2S -mediated protection against oxidative stress in *Escherichia coli* // PNAS – 2017 – V. 114–P.23
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. Smirnova G.V., Tyulenev A.V., Bezmaternyykh 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. Smirnova G., Tyulenev A., Muzyka N., Ushakov V., Samoylova Z., Oktyabrsky O. Influence of Growth Medium Composition on Physiological Responses of *Escherichia coli* to the Action of Chloramphenicol and Ciprofloxacin // BioTech – 2023 – V. 12(43) – P. 43
7. Smirnova G.V.; Oktyabrsky O.N. Relationship between *Escherichia coli* growth rate and bacterial susceptibility to ciprofloxacin // FEMS Microbiol. Lett. – 2018 – V. 365, P. 254.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ ГИДРОГЕЛЕЙ И КЛЕТОК БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PELI* – ПРОДУЦЕНТОВ ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА РОСТ МОДЕЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ КРЕСС-САЛАТА *LEPIDIUM SATIVUM*

Елисеева А.Д.¹, Протасова Е.М.¹, Громова О.А.^{1,2}

¹ Пермский федеральный исследовательский центр УрО РАН, Пермь, Россия

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Исследовано влияние комплексных препаратов, содержащих полимерную основу и клетки бактерий-продуцентов ферментов на рост модельного растения – кресс-салата сорта «Забава». Выявлено, что инокуляция культур бактерий *P. peli* 3ТБЕЖ и *P. peli* 3ТБ2, оказывает умеренное фитостимулирующее действие на рост модельных растений кресс-салата в сочетании с гидрогелем полиакриламида и более выраженное при внесении без полимерного стабилизатора.

Ключевые слова: бактериальные препараты, кресс-салат, гидролитические ферменты

INFLUENCE OF COMPLEX PREPARATIONS BASED ON POLYMER HYDROGELS AND CELLS OF THE BACTERIA *PSEUDOMONAS PELI* – PRODUCERS OF HYDROLYTIC ENZYMES ON THE GROWTH OF MODEL CRESS PLANTS *LEPIDIUM SATIVUM*

Eliseeva A.D.¹, Protasova E.M.¹, Gromova O.A.^{1,2}

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

² Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The influence of complex preparations containing a polymer base and cells of enzyme-producing bacteria on the growth of a model plant – watercress variety "Zabava" – was studied. It was revealed that inoculation of bacterial cultures *P. peli* 3TBEZH, *P. peli* 3TB2, has a moderate phytostimulating effect on the growth of model watercress plants in combination with polyacrylamide hydrogel and is more pronounced when applied without a polymer stabilizer.

Keywords: bacterial preparations, watercress, hydrolytic enzymes

Основным направлением применения микроорганизмов в растениеводстве является повышение урожайности за счет стимуляции роста и реализации биологического потенциала растений [1-2]. Среди разнообразия почвенной микробиоты высоким биотехнологическим потенциалом обладают некоторые бактерии, обладающие высокой активностью ряда гидролитических ферментов, участвующих в процессах гумификации органических веществ, почвообразования, питания растений и нормального функционирования их корневой системы [3,4]. Наиболее перспективными для практического применения представляются продуценты новых гидролитических ферментов, выделенные из защелоченных сред природного или техногенного происхождения [5]. Также представляется перспективным их применение в соста-

ве комплексных препаратов для переработки органических остатков, попадающих в почвенную среду, с получением растворимых соединений, которые могут легко всасываться ризосферой, улучшая питание растений. Полимерной основой для товарной формы таких препаратов могут быть, в частности, гидрогели. Показано, что в состав гидрогелей, при отработке соответствующих технологий, можно включать различные минеральные и органические компоненты, удобрения, микроэлементы, растительные гормоны и средства защиты растений, фунгициды, другие биологически-активные вещества и споры бацилл. Входящие в состав таких композиций компоненты защищены от вымывания из почвы, но остаются доступными для корней растений и ризосферы [6,7].

В исследовании были использованы штаммы бактериальных культур ЗТ БЕЖ и ЗТ Б2 из коллекции Лаборатории молекулярной биотехнологии ИЭГМ УрО РАН, выделенные на территории содового шламохранилища, г. Березники. Штаммы представляют собой алкалофильные бактерии – *Pseudomonas peli* (класс *Gammaproteobacteria*) и являются продуцентами ферментов амилазы и липазы. В эксперименте вносили в грунт суспензию клеток бактерий в количестве 50 мг клеток по сухому весу на 150 г грунта, а также комплексные препараты бактерий с 5 г увлажненного 15%-го гидрогеля полиакриламида. В качестве модельного объекта был посажен кресс-салат сорта «Забава», в количестве 30 семян на каждый вариант. В качестве грунта использован торфогрунт из Краснокамского р-на Пермского края, не обогащенный удобрениями.

Варианты опыта:

К – контроль, без внесения гидрогелей и бактериальной массы

ГГ1 – поперечно-сшитый полимер акриламида (15% АА) в количестве 5 г

ГГ1 ЗТБЕЖ, ГГ1 ЗТБ2 – комплексные препараты на основе ГГ1 и биомассы ЗТБЕЖ и ЗТБ2 в концентрации 10^9 кл/мл в количестве 5 г

ЗТБЕЖ Х, ЗТБ2 Х – инактивированные клетки штаммов бактерий в количестве 5 г

ЗТБЕЖ, ЗТБ2 – клетки штаммов бактерий в количестве 5 г

В инокулированный грунт высаживали по 30 семян кресс-салата на контейнер.

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



Рис. Культивирование растений в фитотроне

Результаты измерения морфометрических параметров после культивирования в течение 20-ти суток представлены в таблице.

Таблица – Средние морфометрические параметры томатов на 20-ые сутки роста

Вариант	Количество ростков	Средняя длина побега, см	Средняя длина корня, см	Средняя масса растения, г
К	21	3,25±1,11	1,64±0,27	0,034±0,009
ГГ1	23	3,64±0,76	1,58±0,29	0,026±0,009
<i>Pseudomonas peli</i> ЗТБЕЖ	25	4,16±1,27	1,88±1,47	0,026±0,006
<i>Pseudomonas peli</i> ЗТБ2	23	4,11±1,21	2,72±1,17	0,024±0,007
Инактивированная прогреванием био- масса штамма ЗТБЕЖ	8	2,71±0,92	0,96±0,54	0,028±0,009
Инактивированная прогреванием био- масса штамма ЗТБ2	17	3,34±0,85	1,4±0,29	0,032±0,005
<i>Pseudomonas peli</i> ЗТБЕЖ с гидроге- лем	20	3,64±0,74	3,46±0,68	0,027±0,004
<i>Pseudomonas peli</i> ЗТБ2 с гидрогелем	25	3,09±1,06	2,08±0,11	0,03±0,007

Показано, что инокуляция культур бактерий *P. peli* ЗТБЕЖ и ЗТБ2, оказывает выраженное фитостимулирующее действие на рост модельных растений кресс-салата. Внесение комплексных препаратов *P. peli* ЗТБЕЖ и ЗТБ2 с гидрогелем оказывало менее выраженное фитостимулирующее действие на рост модельных растений кресс-салата, однако позволило снизить количество вносимой воды для полива на 25%, относительно вариантов без гидрогеля. Некоторое снижение фитостимулирующего действия может быть вызвано диффузионными ограничениями и снижением скорости колонизации корневой системы модельных растений. Однако для достижения более выраженного эффекта необходимы дальнейшие модельные эксперименты с оптимизацией дозировки препарата.

Работа выполнена при поддержке государственного задания, номер государственной регистрации НИОКТР 122031100058-3, в части эксперимента в условиях светокультуры. В части микробиологических исследований и получения активного микробного препарата работа поддержана грантом № С-26/507 Минобрнауки Пермского края, в части получения комплексного препарата на основе гидрогеля – грантом УМНИК № 18124ГУ/2022.

Библиографический список

1. Мотина Т.Ю., Дегтярева И.А., Давлетшина А.Я., Яппаров И.А., Алиев Ш.А., Бабынин Э.В. Биоудобрения комплексного действия на основе консорциума микроорганизмов и наноструктурных агроминералов для получения экологически безопасной продукции растениеводства // Вестник Казанского технологического университета. – 2017. – Т. 20. – №12. – С. 122–126.
2. Самарина Л.С., Маляровская В.И., Рогожина Е.В., Малюкова Л.С. Эндوفитные микроорганизмы как промоутеры роста растений в культуре *in vitro* // Сельскохозяйственная биология. – 2017. – Т. 52. – № 5. – С. 917–927.
3. Хазиев Ф.Х. Функциональная роль ферментов в почвенных процессах // Вестник Академии наук Республики Башкортостан. – 2015. – № 2 (78). – С. 14–23.
4. Круглов Ю.В. Микробное сообщество почвы: физиологическое разнообразие и методы исследования // Сельскохозяйственная биология. – 2016. – Т. 51. – № 1. – С. 46–59.
5. Демаков В.А., Максимов А.Ю., Кузнецова М.В., Овечкина Г.В., Ремезовская Н.Б., Максимова Ю.Г. Биологическое разнообразие нитрилметаболизирующих бактерий антропогенно-измененных почв Пермского края // Экология. – 2007. – № 3. С. 185–190.
6. Максимова Ю.Г., Щетко В.А., Максимов А.Ю. Полимерные гидрогели в сельском хозяйстве (обзор) // Сельскохозяйственная биология. – 2023. – Т. 58. – № 1. – С. 23–42.
7. Максимова Ю.Г., Максимов А.Ю., Демаков В.А., Будников В.И. Влияние гидрогелей полиакриламида на микрофлору почвы // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2010. – № 1. – С. 45–49.

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *PICHLA PASTORIS*, НЕСУЩЕГО ГЕНЕТИЧЕСКУЮ КОНСТРУКЦИЮ, КОДИРУЮЩУЮ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК НОРОВИРУСА И ECHOVIRUS 30.

Ермолаева В.М.¹, Цыганова М.И.², Мелентьев Д.А.^{1,2}, Лапин В.А.^{1,2}, Новиков Д.В.²

¹ Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,
Нижний Новгород, Россия

² Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. И.Н. Блохиной,
Нижний Новгород, Россия

Аннотация. Инфекция Echovirus 30 часто является причиной развития серозного менингита. В связи с этим приобретает актуальность разработка подходов к конструированию вакцин для ее профилактики. Была получена генетическая конструкция, в которой S домен белка VP1 норовируса слит с VP1 белком Echovirus 30 в одну молекулу и находится под контролем АОХ1 промотора и терминатора. Эта конструкция была интегрирована в геном дрожжей *Pichia pastoris* для последующей экспрессии.

Ключевые слова: энтеровирусы, *Pichia pastoris*, штамм, рекомбинантные белки, дрожжи

OBTAINING A *PICHLA PASTORIS* STRAIN CARRYING A GENETIC CONSTRUCT ENCODING THE CHIMERIC PROTEIN OF NOROVIRUS AND ECHOVIRUS 30

Ermolaeva V.M.¹, Tsyganova M.I.², Melentyev D.A.^{1,2}, Lapin V.A.^{1,2}, Novikov D.V.²

¹ Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russia

² Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after
I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. Echovirus 30 infection is often the cause of serous meningitis. In this regard, the development of approaches to the design of vaccines for its prevention becomes relevant. A genetic construct was obtained in which the S domain of the norovirus VP1 protein is fused with the Echovirus 30 VP1 protein into one molecule and is controlled by the АОХ1 promoter and terminator. This construct was integrated into the yeast *Pichia pastoris* genome for subsequent expression.

Keywords: enteroviruses, *Pichia pastoris*, strain, recombinant proteins, yeasts

Энтеровирусы являются одними из широко распространённых возбудителей заболеваний человека. Энтеровирусные заболевания наблюдаются повсеместно в виде sporadических форм, групповых заболеваний и эпидемических вспышек. Некоторые штаммы могут доминировать в циркуляции в течение нескольких лет, затем исчезать, чтобы появиться годы спустя [1]. Энтеровирусы представляют собой безоболочечные вирусы, вирионы которых имеют форму икосаэдра диаметром 28–30 нм. Геном энтеровирусов представлен одноцепочечной (+) РНК размером 7.2–8.5 т.н, которая обладает инфекционностью при ее введении в

клетки [2]. Капсид состоит из четырех структурных белков, VP1–VP4. Внешнюю поверхность формируют VP1, VP2 и VP3, образуя структуры, отвечающие за распознавание рецептора [2,3], а VP4 расположен внутри капсида (рис. 1). Капсидные белки являются основными антигенами вируса.

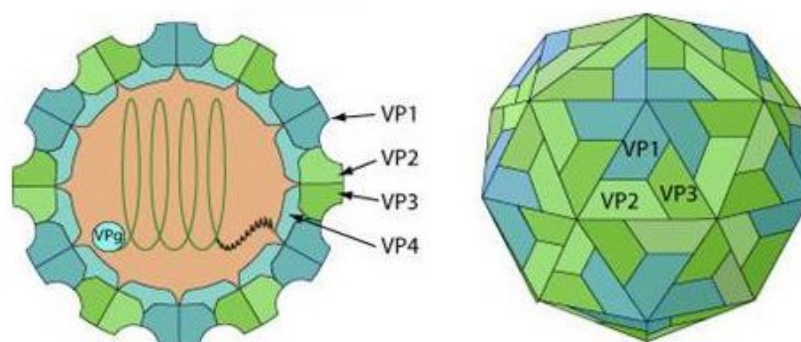


Рис. 1. Схематическое строение вириона энтеровируса

На территории Российской Федерации заболеваемость энтеровирусной инфекцией характеризуется циклическими колебаниями при тенденции к росту [1,2]. Среди них наиболее частой причиной развития серозного менингита является инфекция Echovirus 30 (E30). В связи с отсутствием специфической профилактики энтеровирусных инфекций приобретает актуальность разработка вакцин. Известно, что рекомбинантный белок VP1 норовируса человека способен формировать вирусоподобные частицы (ВпЧ). За самосборку ВпЧ отвечает S-фрагмент белка VP1. Химерные конструкции на базе S-фрагмента белка VP1 норовируса могут экспонировать на поверхности ВпЧ чужеродные антигены. Поскольку метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* обеспечивают высокий уровень экспрессии белка [4], целью исследования явилось получение штаммов *P. pastoris*, в геном которых интегрирован химерный белок, состоящий из S-домена белка VP1 норовируса, слитого с белком VP1 E30.

Материалы и методы

Схема генетической конструкции pPicZA/S-VP1 представлена на рис. 2.

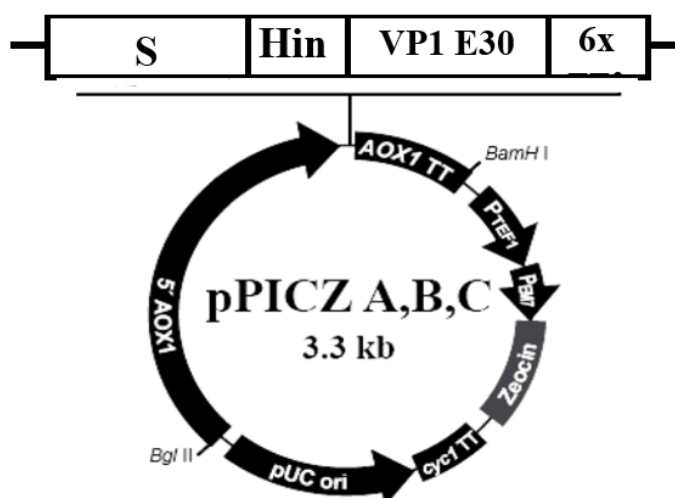


Рис. 2. Строение генетической конструкции pPicZA/S-VP1. Указаны строение и местоположение химерного белка, положение промотора гена метанол-оксидазы (5'-AOX1), терминатора этого гена (3'-AOX1), маркерного гена устойчивости к зеоцину.

Использовали штамм *P. pastoris: Pichia Glycoswitch SuperMan 5-23* (BioGrammatick) согласно рекомендациям производителя [5].

Штамм, несущий генетическую конструкцию, кодирующий химерный белок, получали путём трансформации клеток *P. pastoris* плазмидой pPicZA/S-VP1 методом электропорации с использованием электропоратора Eppendorf Multiporator в соответствии с рекомендациями производителя [5]. Трансформированные клетки высевали на чашки Петри с твердой средой YPD (yeast extract peptone dextrose medium) с зеоцином, инкубировали в термостате до образования колоний, после чего отбирали одиночные колонии и пересевали на свежие чашки с аналогичной средой.

Для проведения полимеразной цепной реакции выделяли нуклеиновые кислоты методом фенол-хлороформной экстракции. Далее проводили преципитацию нуклеиновых кислот с помощью 3М ацетата натрия и 100% изопропанола. Перемешивали и откручивали в центрифуге. К осадку добавляли 70% спирт и центрифугировали. Осадок высушивали и растворяли в деионизированной воде.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с применением праймеров, представленных в табл. Расчетный размер синтезируемого в ПЦР фрагмента ДНК составил 1590 пар оснований (п.о.).

Таблица – Используемые олигонуклеотиды

Праймер	Первичная структура (5'-3')
NorPForward	cccacagaattcatgagaactaaaccattctctgtc
ER Revers VP1	aagttccctacagcnackcccat

В чистых стерильных пробирках приготавливали реакционную смесь для проведения ПЦР: буферный р-р (50 mM Tris-HCl (pH 8,6), 50 mM KCl, 1,0% Tween 20, 2,5 mM Mg²⁺); смесь нуклеотидов dNTPs; праймер R; праймер F; Taq-полимераза Taq MD (Альфа-фермент, Россия); проба (исследуемый образец); деионизированная H₂O. Все компоненты смеси тщательно перемешивали с использованием вортекса. Пробу помещали в ПЦР-амплификатор Rotor-GeneQ (QIAGEN, Германия) и нагревали до 94 °C в течение 1 минуты. Инкубировали пробу в амплификаторе по следующей программе: 45 циклов (94°C – 30сек, 50°C – 10 сек, 72°C -1 мин 30 сек). Результаты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле. Результаты электрофореза визуализировали в ультрафиолетовом свете с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc (Bio-Rad, США).

Результаты и обсуждения

На первом этапе работы была проведена трансформация клеток *P. pastoris* плазмидой pPicZA/S-VP1. После электропорации клетки высевали на селективную среду. В результате было получено 87 колоний, устойчивых к зеоцину, которые пересевали на свежие чашки Петри с аналогичной средой. Клоны, в которых наблюдался устойчивый рост (51 шт, 59% от числа исходно полученных), использовали для дальнейшего исследования.

Детекцию клонов, содержащих целевую генетическую конструкцию, проводили методом ПЦР. Для проведения ПЦР были выделены нуклеиновые кислоты из каждого исследуемого клона дрожжей. В качестве положительного контроля реакции ПЦР использовали водный раствор плазмиды pPicZA/S-VP1. Результаты визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле (рис.3).

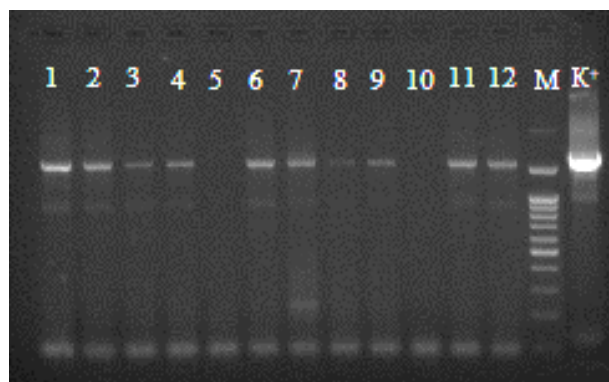


Рис. 3. Электрофореграмма результатов ПЦР (1590 п.о): 1-12 – исследуемые клоны, М – маркер длин М24 («СибЭнзим», Россия), К⁺ – положительный контроль.

Как видно из рис. 3, исследуемые образцы мигрировали чуть выше уровня образца маркера длин ДНК в 1500 п.о., что соответствует расчетной длине исследуемого фрагмента (1590 п.о.). Также показано, что фрагменты ДНК соответствующего размера отчетливо видны на электрофореграмме, отсутствуют неспецифические продукты реакции. Для дальнейшей работы были отобраны клоны, содержащие наиболее интенсивные полосы.

Заключение

В ходе проведенной работы было отобрано 44 клон, в геном которых интегрирована генетическая конструкция, в которой S домен белка VP1 норовируса слит с VP1 белком E30 в одну молекулу и находится под контролем АОХ1 промотора и терминатора. В дальнейшем полученные клоны дрожжей будут использованы для наработки рекомбинантного химерного белка.

Библиографический список

1. Новикова Н.А., Голицына Л.Н., Троценко О.Е., Сапега Е.Ю., и др. Заболеваемость, этиологическая структура и вопросы профилактики энтеровирусной (неполио) инфекции // Информационный бюллетень Референс-центра по мониторингу энтеровирусных инфекций. ФБУН ННИИЭМ им. акад. И.Н. Блохиной Роспотребнадзора. Нижний Новгород. – 2021. 13 с. – [Электронная версия]. URL: <https://www.nniiem.ru/file/razrabotki/2021/inf-byulleten-evi-n8-may-2021.pdf> (дата обращения: 15.04.2022).
2. Новиков Д.В., Мелентьев Д.А. Энтеровирусные (Picornaviridae: Enterovirus) (неполио) вакцины // Вопросы вирусологии. – 2022. – Т. 67. – № 3. – С. 185–192. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-111>
3. Yuan J. et al. Enterovirus A71 proteins: structure and function //Frontiers in microbiology. – 2018. – Т. 9. – С. 286.<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00286>
4. Vittaladevaram V.A. Short communication on Pichia pastoris vs. *E. coli*: Efficient expression system //Annals of Proteomics and Bioinformatics. – 2021. – Т. 5. – № 1. – С. 049–050.
5. Руководство пользователя. EasySelect™*Pichia* Expression Kit. Cat. no. K1740-01, Invitrogen – 2010. 95 с.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНОКУЛЯЦИИ ШТАММОВ ПАУ-ДЕГРАДИРУЮЩИХ И МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БИОСОРБЕНТА НА ОСНОВЕ БИОУГЛЯ

Загайнов Е.А., Горовцов А.В., Козьменко С.В.

*Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии
им. Д.И. Ивановского, Ростов-на-Дону, Россия*

Аннотация. Целью данной работы являлось сравнение способности штаммов ПАУ-деградирующих бактерий *Pseudomonas taiwanensis* A10 и *Rhodococcus opacus* Nah7IF, а также металлоустойчивого штамма *Bacillus atrophaeus* TR-3.3 к колонизации биочара, полученного путем пиролиза и сопиролиза смеси осадков сточных вод и соломы пшеницы.

Ключевые слова: биочар, ремедиация почв, полиароматические углеводороды, тяжелые металлы, пиролиз, инокуляция бактерий

EFFICIENCY OF INOCULATION OF STRAINS OF PAH-DEGRADING AND METAL-RESISTANT BACTERIA IN THE PRODUCTION OF BIOSORBENT BASED ON BIO-COAL

Zagainov E.A., Horovtsov A.V., Kozmenko S.V.

Southern Federal University, Academy of biology and biotechnology, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The aim of this work was to compare the ability of strains of PAH-degrading bacteria *Pseudomonas taiwanensis* A10 and *Rhodococcus opacus* Nah7IF, as well as the metal-resistant strain *Bacillus atrophaeus* TR-3.3 to colonize biochar obtained by pyrolysis and copyrolysis of a mixture of sewage sludge and wheat straw.

Keywords: biochar, soil remediation, polyaromatic hydrocarbons, heavy metals, pyrolysis, bacterial inoculation

Введение. В современном мире с каждым годом увеличивается количество выбросов предприятий в окружающую среду. Вследствие этого в экосистемах накапливаются различные загрязнители, в том числе полиароматические углеводороды (ПАУ) и тяжелые металлы (ТМ), которые негативно влияют на рост и развитие растений, поступают в цепи питания, создают угрозу для животных и человека.

ПАУ являются приоритетными загрязнителями и канцерогенами, а принадлежащий к данной группе веществ бензпирен, относится к I классу опасности, и его содержание в окружающей среде нормируется в РФ. Более того, ПАУ имеют различные источники поступления в окружающую среду, а именно: биогенные (поступление природных органических веществ), петрогенные (поступление с нефтепродуктами, без участия горения), техногенные (выбросы в окружающую среду промышленными предприятиями), пирогенные (лесные по-

жары, ТЭЦ, двигатели внутреннего сгорания автомобильного транспорта), а также космические источники [1]. В связи с этим работа над очисткой почв от данного вида загрязнителей имеет важное значение в обеспечении здоровья всех компонентов экосистем.

Для борьбы с загрязнением применяется широкий спектр препаратов, включающий сорбенты, связывающие загрязнители, и микроорганизмы, способные к биодegradации ПАУ. Так, для избавления от ТМ применяется сорбция глинами, аккумуляция их растениями (фиторемедиация), промывание почв водой, растворами кислот и их солей. Последний метод относится к «жесткой» ремедиации, сопровождающимся потерей или сильным нарушением почвенных функций. Для борьбы с ПАУ активно применяются бактерии рода *Pseudomonas*, которые используются в качестве аэробных нефтеокисляющих микроорганизмов [2], а также рода *Rhodococcus*, способных к деградации фенантрена и антрацена [3].

Среди сорбентов перспективными являются углеродистые сорбенты, например, гранулированный активированный уголь (ГАУ) и биочар, поскольку они обладают высокой удельной площадью поверхности и хорошими сорбционными свойствами, а также высокой стабильностью в почве. Так, полупериод минерализации биочара достигает 100 лет и более, а скорость минерализации ГАУ – еще ниже. Удельная площадь поверхности пор ГАУ велика и варьируется в интервале 400-2000 м²/г в зависимости от марки угля и способа измерения. Несмотря на это, стоит отметить высокую стоимость и сложность производства ГАУ, в то время как биочар может быть получен из сельскохозяйственных отходов, сточных вод и других отходов, поэтому его применение является более коммерчески выгодным. При этом сорбционные свойства биочара не хуже, чем у ГАУ, а его пористость выше, чем у активированного угля [4].

Существуют исследования, нацеленные на совмещение сорбента и необходимых для ремедиации почв штаммов бактерий [5], но на данный момент таких работ достаточно мало.

Следует отметить, что иммобилизованные бактерии выживают лучше, чем планктонные, поскольку в природе бактерии существуют в виде биопленок. Это позволяет повысить выживаемость бактерий, иммобилизованных на биосорбенте по сравнению с жидкими биопрепаратами. Бактерии, будучи интегрированными в биопленку, защищены от повреждающих факторов внешней среды, а также способны к более эффективной колонизации субстрата [6]. Учитывая достаточно суровые условия для существования микроорганизмов в загрязненных почвах, наличие биопленок играет значительную роль в повышении выживаемости бактерий иммобилизованных на биосорбентах.

Таким образом объединение бактерий и высокопористого биосорбента позволит получить эффективное средство для ремедиации почв, и именно на разработку такой технологии нацелено наше исследование

Материалы и методы. Образцы биочара для исследований были любезно предоставлены с.н.с. лаборатории «Агробιοтехнологии для повышения плодородия почв и качества сельскохозяйственной продукции» Т. В. Бауэр.

В качестве исходного сырья для получения биочаров были использованы осадки сточных вод и солома пшеницы, отобранная после уборки урожая с сельскохозяйственных полей. Далее применялись следующие условия пиролиза и сопиролиза: температура 700 °С, время выдержки 60 мин, скорость нагрева 10 °С/мин. Полученный опытный образец биочара был обозначен как SSB-WS (1,0) – с соотношением соломы пшеницы и осадка сточных вод 1:1 – и в дальнейшем использовался в исследовании, поскольку удельная площадь поверхности частиц образца и общий объем пор были наибольшей из всех полученных вариантов – 43,59 м²/г и 0,081 см³/г соответственно. Кроме того, готовый сорбент имел рН на уровне

9,53; содержание углерода, водорода, азота и кислорода (в процентах) составляло 31,03; 1,29; 1,52 и 9,07 соответственно. Общее содержание золы (в процентах) составляло 57,09, а выход продукта (в процентах) – 34,70 [7].

Для инокуляции на биочар использовались следующие штаммы:

Pseudomonas taiwanensis A10 растет в минеральной среде М9 с добавлением нафталина, фенантрена, салицилата, бензоата, фенола как единственных источников углерода и энергии, проявляет антагонизм в отношении бактериальных фитопатогенов (*Pectobacterium carotovorum* VKM B-1247T, *P. wasabiae* B15), продуцирует ИУК, продуцирует биосурфактанты: снижает поверхностное натяжение среды до 40 мН/м, устойчив к низкой концентрации свинца и цинка (1,5 мМ).

Rhodococcus opacus Nah7IF растет в минеральной среде М9 с добавлением нафталина, бензоата, фенола, гексадекана как единственных источников углерода и энергии, не проявляет антагонизм в отношении грибных и бактериальных фитопатогенов, продуцирует ИУК.

Bacillus atrophaeus TR 3.3 – устойчив к цинку (2,8 мМ), не проявляет антагонизм в отношении грибных и бактериальных фитопатогенов, выделен из техноземов шламонакопителья оз. Атаманское.

Все штаммы были идентифицированы до вида с использованием секвенирования гена 16S рРНК и масс-спектрометрии MALDI TOF. Для инокуляции образцов биочара в минеральную среду MSM с 1% бульона LB добавлялись навеска биочара в соотношении 2% от объема среды и 1 мл бактериальной суспензии плотностью 1 МкФ. Инкубация проходила при температуре 30 °С на шейкере при 150 об/мин в течение трех суток. Затем биочар отфильтровывали, промывали от остатков культуральной жидкости 0.05 М раствором фосфатного буфера и сушили в течение суток при комнатной температуре. Численность иммобилизованных бактерий определялась с помощью посева серийных разведений после растирания в ступке навески инокулированных образцов биочара.

Результаты и обсуждение. Результаты микробиологического анализа полученных биосорбентов показали, что численность жизнеспособных клеток бактерий в них варьировала в пределах от 10^7 до 10^9 в зависимости от штамма (рис.).

В ходе анализа наибольший титр показал штамм *Bacillus atrophaeus* TR-3.3, что вполне закономерно для бацилл. Что же касается консорциума двух штаммов ПАУ-деструкторов *Pseudomonas taiwanensis* A10 и *Rhodococcus opacus* Nah7IF, их объединение не привело к критическому падению титра, а наоборот, привело к увеличению количества Псевдомонад на биочаре, в сравнении с вариантом обособленной инокуляции данного микроорганизма. Следовательно, при сосуществовании штаммы *Pseudomonas taiwanensis* A10 и *Rhodococcus opacus* Nah7IF не оказывают губительного воздействия друг на друга и способны к эффективному увеличению собственной численности.

Если изучить данные по инокуляции *Rhodococcus erythropolis* на разных видах биочара из работы под названием «Сравнение эффективности инокуляции *Rhodococcus erythropolis* на углеродистых сорбентах из различного сырья» [8], где количество КОЕ микроорганизмов на 1 грамм биосорбента варьировалось от 10^8 до 10^9 , то можно заметить, что эффективность инокуляции разных штаммов бактерий рода *Rhodococcus* на биочаре примерно одинакова высока.

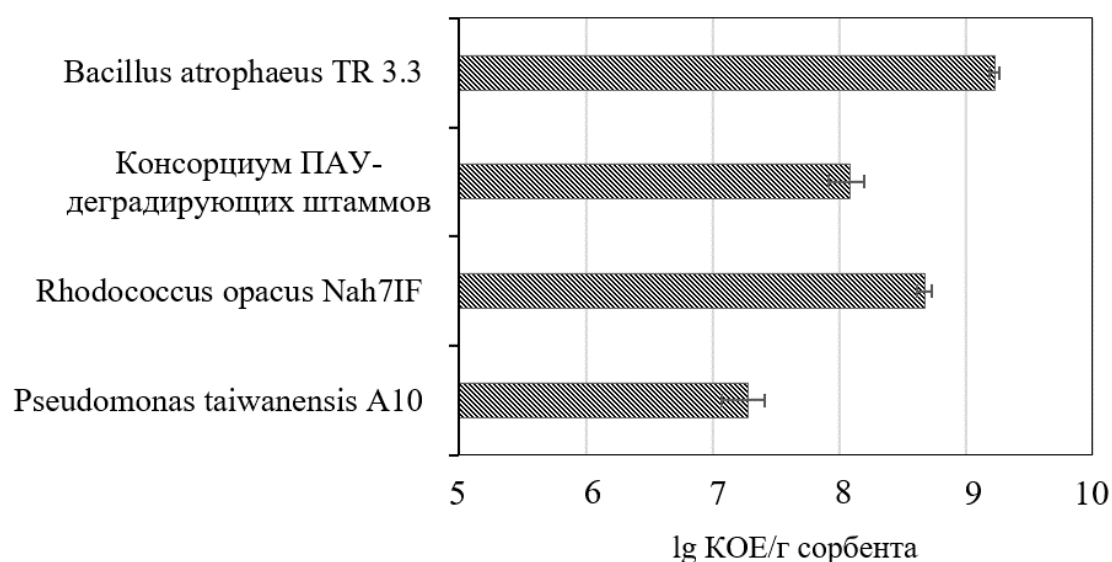


Рис. Количество КОЕ бактерий на 1 г сорбента после инокуляции

Выводы. Исследуемый метод производства биочара с последующей инокуляцией показал себя как качественный, благодаря чему можно основываться на использовании данного типа биосорбента, получаемого из осадка сточных вод и соломы, чтобы минимизировать затраты на производство биопрепарата.

Инокуляция ПАУ-деструкторами и металлоустойчивыми микроорганизмами на данный вид биочара оказалась эффективной, что также указывает на целесообразность его использования в качестве биосорбента и субстрата для бактерий.

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2023-587.

Библиографический список

1. Накопление полициклических ароматических углеводородов в снежном покрове вблизи предприятий топливно-энергетического комплекса г. Воркуты / Д.Н. Габов, Е.В. Яковлева, М.И. Василевич, Р. С. Васильевич // Геоэкология. Инженерная геология, гидрогеология, геокриология. – 2019. – № 2. – С. 24–37.
2. Филонов А.Е., Кошелева И.А., Пунтус И.Ф., Ахметов Л.И., Боронин А.М. Штамм бактерий *Pseudomonas putida*, продуцирующий поверхностно-активные вещества, для деградации полициклических ароматических углеводородов и углеводородов нефти. – 2009.
3. Деградация фенантрена и антрацена бактериями рода *Rhodococcus* / Н. А. Ленева, М. П. Коломыцева, Б.П. Баскунов, Л.А. Головлева // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – Т. 45, № 2. – С. 188–194.
4. Бурачевская М.В., Бауэр Т.В., Лобзенко И.П., Горовцов А.В., Вечканов Е.М., Плотников А.А., Барахов А.В., Федоренко Е.С., Замулина И.В., Минкина Т.М. Влияние углеродистых сорбентов, полученных из растительного сырья, на подвижность ионов Zn в почве //Химия растительного сырья. – 2023. – № 1. – С. 323–331.
5. Wu C. et al. Immobilization of microbes on biochar for water and soil remediation: A review //Environmental Research. – 2022. – Т. 212. – С. 113226.

6. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбеян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок //Микробиология. – 2010. – Т. 79. – № 4. – С. 435–446.
7. Бауэр Т.В., Минкина Т.М., Лобзенко И.П., Хронюк О.Е., Болдырева В.Э., Федоренко А.Г. Сопиролиз осадков сточных вод и лигнинсодержащей биомассы: синергетический эффект и моделирование влияния параметров карбонизации на результаты оптимизации свойств биочара // Материалы III Международной научной конференции и II Международной научной школы для молодых ученых «Мониторинг, охрана и восстановление почвенных экосистем в условиях антропогенной нагрузки». – 2023. – С. 149–153.
8. Козьменко С.В., Горовцов А.В., Загайнов Е.А., Бояршинов В.А., Грунина С.С. Сравнение эффективности инокуляции *rhodococcus erythropolis* на углеродистых сорбентах из различного сырья //XXVI Докучаевские молодежные чтения. – 2023. – С. 22.

НАНОМАТЕРИАЛЫ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ БИОПЛЕНКАМИ В ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА

Соболева О.М., Калашникова К.В.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Некоторые микроорганизмы в различных условиях способны сменять свободноживущий на прикрепленный образ жизни, используя биопленку как фактор колонизации, патогенности и защиты от условий среды. Борьба с такой формой самоорганизации бактерий представляет определенные трудности. В статье рассмотрена возможность использования наноматериалов для этих целей.

Ключевые слова: биопленки, наноматериалы, инфекция

NANOMATERIALS IN THE FIGHT AGAINST BACTERIAL BIOFILMS IN HUMAN INFECTIOUS PATHOLOGY

Soboleva O.M., Kalashnikova K.V.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. Some microorganisms in various conditions are able to change from a free-living to an attached lifestyle, using biofilm as a factor of colonization, pathogenicity and protection from environmental conditions. The fight against this form of self-organization of bacteria presents certain difficulties. The article considers the possibility of using nanomaterials for these purposes.

Keywords: biofilms, nanomaterials, infection

Цель исследования – анализ современных данных об эффективности использования наноматериалов для борьбы с биопленками патогенных и условно-патогенных видов в организме человека.

Биопленка – это совокупность микроорганизмов, осевших на различных плотных поверхностях, которые связаны друг с другом при помощи внеклеточного полисахаридного матрикса. Микроорганизмы могут адгезироваться на любых поверхностях как живого организма (желудочно-кишечный тракт, мочевыводящие пути, зубы, имплантаты и т.д.), так и неживой природы (камни, трубы). В течение всего цикла образования биопленки клетка способна целенаправленно изменять свое поведение. По современным данным, до 99% бактерий существуют в природе в виде биопленок [1]. Биопленки покрывают как различные природные поверхности, так и органы, ткани живых организмов. В природе бактерии существуют как отдельно, так и в сообществах, состоящих из представителей разных видов. Сообщества микроорганизмов могут нормально существовать в природных условиях.

Например, плотные биопленки способны существовать на стенах пещер или отложениях минералов. Также бактерии образуют биопленки на поверхности корней растений. Вследствие этого стимулируется рост растений, выделяется большое количество различных биологически активных веществ и осуществляется защита растения от патогенной микрофлоры почв. Также биопленки могут образовываться на влажных камнях и объектах под водой.

Нормальная микробиота человека тоже может существовать в виде биопленок – например, микроорганизмы полости рта, кишечника, кожи и слизистых. В гинекологии встречаются бактериальные вагинозы, аэробный вагинит, кандидозный вагинит, трихомонадный вагинит, являющиеся результатом формирования биопленок [2]. Биопленка может образовываться на поверхностях различных инородных тел в организме, таких как эндоматочные устройства, контрацептивные имплантаты, пессарии.

В урологии биопленка в мочевом пузыре способна вызывать хронический цистит с острыми эпизодами каждый раз, когда происходит дисперсия биопленки [3]. При такой этиологии заболевания антибиотикотерапия оказывается малоэффективной. Биопленки, патогенные для мочевого пузыря, содержат уropатогенные штаммы *Escherichia coli*.

В стоматологии разновидностью биопленок является зубной налет, который образован в большей степени актиномицетами и спирохетами. Из-за этого часто развивается кариес, гингивит, пародонтоз.

Образование биопленок на хирургических имплантатах и оборудовании в большинстве случаев приводит к обсеменению нежелательной микрофлорой, низкой эффективности биотехнологических систем, коррозии и порче оборудования. Они часто образуются на искусственном бедренном протезе, искусственном голосовом протезе, центральном венозном катетере, внутримочеточниковых устройствах, протезированном клапане сердца, мочевом катетере [4].

Агрессивные биопленки, связанные с имплантатами и медицинскими инструментами, привели к многочисленным исследованиям, направленным на выявление и совершенствование мощных стратегий, – главным образом, для профилактики и эффективной терапии. Растущая резистентность к антибиотическим препаратам среди патогенных для человека штаммов микроорганизмов требует разработки альтернатив. Наночастицы металлов (железа, меди, цинка, серебра, золота и т.д.) возможно применять как отдельно, так и в комплексе с органическими веществами: декстранами и фосфолипидами. Наноматериалы обладают хорошей химической активностью и благодаря этому могут образовывать комплексные связи с органическими и неорганическими веществами и приобретать новые свойства. Так, наночастицы могут связываться с нуклеиновыми кислотами, белками, встраиваться в мембраны, проникать в клеточные органеллы, изменяя функции различных биоструктур [5].

Наночастицы серебра являются претендентами на роль альтернативы современным антибиотикам. Они способны доставлять терапевтические препараты, воздействуют на мембраны микробных клеток, нарушая их жизнедеятельность и приводя к гибели, также они менее токсичны, чем ионы серебра.

Наночастицы являются хорошим средством как в борьбе с образующимися на медицинских принадлежностях биопленками, так и в профилактике их образования. Они положительно зарекомендовали себя в борьбе со многими резистентными к антибиотикам штаммами микроорганизмов, в том числе *P. aereginosa*. Механизм действия серебра на

бактериальную клетку следующий: ионы попадают в клетку и нарушают некоторые ее функции, например, репродуктивную, оставляя микроорганизм живым. Также серебро может ингибировать ферменты, участвующие в дыхательной цепи, что нарушает процессы дыхания и окислительного фосфорилирования, в результате чего наступает гибель бактерии [6, 7].

Наночастицы железа вызывают окислительный стресс бактериальной клетки. Выраженность антибактериального действия прямо пропорциональна размеру частиц. Чем меньше частицы, тем эффективнее их использование [8, 9]. Наночастицы FeO и Fe₂O₃ уничтожают штаммы *E. coli*, нарушая дыхательный цикл повреждающими клеточную мембрану активными формами кислорода.

Наночастицы золота проявляют антимикробный эффект в отношении тест-штаммов *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus*, *V. vulnificus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Flexibacter sp.* и *K. pneumoniae* [9, 10]. Механизм их действия основан на повреждении мембраны и выходе содержимого клетки в окружающую среду. Также они ингибируют транскрипцию путем связывания с ДНК бактерии.

Механизм проникновения наночастиц оксида цинка через мембрану бактерии изучен не до конца, но в ходе многочисленных экспериментов выявлено, что клетки гибнут из-за неспособности регулировать транспорт веществ через плазматическую мембрану, проницаемость которой увеличивают наночастицы. Также не исключено влияние наночастиц оксида цинка на репликацию клеточных белков [10, 11].

В одной из работ было выявлено, что при исследовании взаимодействия магнитных наночастиц ферригидрита с ампициллином лабораторные крысы в два раза быстрее восстанавливались от ран, чем крысы, получавшие только ампициллин [12]. Уменьшение воспаления связано с сохранением антибактериальных и противовоспалительных свойств комплекса наночастица/ампициллин, что влияло на сроки заживления ран.

Выводы

Таким образом, на сегодняшний день формирование биопленок на медицинском инструментарии, имплантатах и других поверхностях, связанных с человеком и его здоровьем, остается очень серьезной проблемой. Вместе с этим растет антибиотикорезистентность микроорганизмов, что значительно осложняет лечение многих инфекционных болезней. Однако новейшие разработки показали, что применение наноматериалов (наночастиц металлов) для профилактики образования биопленок значительно снижает риски их возникновения.

Библиографический список

1. Романова Ю.М. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина / Ю.М. Романова, А.Л. Гинцбург // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2011. № 3. С. 99–109.
2. О.А. Громова, И.Ю. Торшин, Е.А. Гарасько, Молекулярные механизмы разрушения бактериальных пленок при топическом применении аскорбиновой кислоты // Гинекология, 2010. 12(6) С. 12.
3. Биопленки патогенных бактерий и их роль в хронизации инфекционного процесса. Поиск средств борьбы с биопленками / Ю.М. Романова, Л.В. Диденко, Э.Р. Толордава и др. // Вестник РАМН. 2011. № 10. С. 31–39.

4. Способность к формированию биопленок у клинических штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* – ведущих возбудителей ортопедической имплант-ассоциированной инфекции / С.А. Божкова, М.В. Краснова, Е.М. Полякова и др. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 2. С. 149–156.
5. Терещенко В.П. Медико-биологические эффекты наночастиц: реалии и прогнозы / В.П. Терещенко, Т.Н. Картель. Монография. Киев: Наукова думка. 2010. 240 с.
6. Хмель И.А. Антибактериальные эффекты ионов серебра: влияние на рост грамотрицательных бактерий и образование биопленок / И.А. Хмель, 107 О.А. Кокшарова, М.А. Радциг // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. № 4. С. 27–31.
7. Soni, I. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study of *E. coli* as a model for gram-negative bacteria / I. Soni, B. Salopek-Sondi // J. Colloid Interface Sci. 2004. № 275. P. 177–182.
8. Behera S.S. Characterization and Evaluation of Antibacterial Activities of Chemically Synthesized Iron Oxide Nanoparticles / S. Behera, J. Patra, K. Pramanik, N. Panda, H. Thatoi // World Journal of Nano Science and Engineering. 2012. Vol. 2. № 4. P. 196–200.
9. Tran N. Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus* / N. Tran, A. Mir, D. Mallik, A. Sinha, S. Nayar, T. J. Webster // International Journal of Nanomedicine. 2010. № 5. P. 277–283.
10. Prema P. In-vitro antibacterial activity of gold nanoparticles capped with polysaccharide stabilizing agents / P. Prema, S. Thangapandian // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013. Vol. 5. Issue 1. P. 310–314.
11. Xie Y. Antibacterial Activity and Mechanism of Action of Zinc Oxide Nanoparticles against *Campylobacter jejuni* / Y. Xie, Y. He, P.L. Irwin, T. Jin, X. Shi // Applied and Environmental Microbiology. 2011. Vol. 77. № 7. P. 2325–2331.
12. Сипкин А.В. Использование магнитных наночастиц в лечении раневых процессов на лабораторных животных / А.В. Сипкин, В.Ю. Афонькин, К.Г. Добрецов, С.В. Столяр, О.А. Коленчукова, А. С. Лопатин // Вестник оториноларингологии. 2009. № 5. С. 19–21.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА И ЦИСТИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *ESCHERICHIA COLI* К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ

Калашникова Т.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

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

Аннотация. Показано, что внесение в среду культивирования FeSO_4 усиливало чувствительность бактерий *E. coli* к действию фторхинолона ципрофлоксацина. Эффект FeSO_4 существенно снижался в присутствии цистина, который влиял на скорость роста бактерий и на уровень ионов Fe^{2+} в среде и в клетках. Одним из механизмов снижения бактерицидной активности ципрофлоксацина может быть падение концентрации Fe^{2+} за счет образования нерастворимого FeS в условиях непрерывной продукции H_2S бактериями в присутствии цистина.

Ключевые слова: цистин, ионы железа, скорость роста, ципрофлоксацин, *Escherichia coli*

EFFECT OF FERROUS IONS AND CYSTINE ON *ESCHERICHIA COLI* SUSCEPTIBILITY TO CIPROFLOXACIN

Kalashnikova T.V., Samoilova Z.Y., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

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. In this study we have shown that the addition of FeSO_4 to the cultivation medium increased *E. coli* sensitivity to fluoroquinolone ciprofloxacin. The effect of FeSO_4 was significantly reduced in the presence of cystine, which affected the growth rate of bacteria and the level of Fe^{2+} ions in the medium and in cells. One of the mechanisms for reducing the bactericidal activity of ciprofloxacin may be a decrease in the concentration of Fe^{2+} due to the formation of insoluble FeS under conditions of continuous production of H_2S by bacteria in the presence of cystine.

Keywords: cystine, ferrous ions, growth rate, ciprofloxacin, *Escherichia coli*

Изучение физиологической реакции бактерий на индуцированный антибиотиками стресс и факторов, влияющих на их чувствительность к антимикробным агентам, необходимо для повышения эффективности существующих антибиотиков и разработки новых лекарственных препаратов. Особый интерес к бактерицидным антибиотикам связан с их способностью вызывать гибель бактерий, тем самым предотвращая развитие хронических инфекций. Фторхинолон ципрофлоксацин относится к бактерицидным антибиотикам, он убивает бактерии путем повреждения их ДНК в результате взаимодействия с ДНК-гиразой и топоизомеразой IV [1]. Ранее сообщалось, что механизм бактерицидного действия хинолонов сопряжен с окислительным стрессом [2-4]. В ряде работ группы Коллинза была разработана

концепция, предполагающая, 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 [5,6]. Наиболее токсичным АФК, способным повреждать все биомолекулы, является гидроксильный радикал, образующийся в реакции Фентона между H_2O_2 и Fe^{2+} . АФК-зависимый механизм летальности антибиотиков подвергся активной критике со стороны нескольких исследовательских групп, установивших отсутствие окислительного стресса при действии антибиотиков [7-9]. Тем не менее, было показано, что эндогенный и экзогенный сероводород может защищать бактерии от бактерицидных антибиотиков и окислительного стресса, предположительно за счет H_2S -опосредованной секвестрации свободного железа и предотвращения реакции Фентона [10]. Исследования нашей группы не выявили ускорения дыхания, повышения H_2O_2 и экспрессии антиоксидантных генов при действии ципрофлоксацина [11]. Однако мы показали, что обработка клеток *E. coli* ципрофлоксацином приводит к ускорению синтеза глутатиона и временной продукции H_2S , что является свидетельством повышения уровня внутриклеточного цистеина [11,12], который может потенцировать реакцию Фентона путем восстановления Fe^{3+} до Fe^{2+} [13]. Ранее было показано также, что снабжение бактерий *E. coli*, растущих на минимальной среде, цистином сопровождается повышением уровня цистеина внутри и снаружи клеток и продукцией H_2S [14]. Целью данной работы было выявить влияние повышенного уровня ионов железа в среде на чувствительность *E. coli* к ципрофлоксацину в отсутствие и в присутствии цистина в среде культивирования.

Объектом исследований служил родительский штамм *E. coli* BW25113 из коллекции Keio. Перенос слияния *iucC::lacZ* из штамма BN407 [15] в BW25113 осуществляли методом трансдукции с фагом P1. Бактерии выращивали на минимальной среде 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%). В экспериментах с цистином осуществлялось его дробное добавление по 15 мкМ каждые 45 минут. Ночную культуру разбавляли в 100 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 FeSO_4 (10 и 100 мкМ) и ципрофлоксацин (ЦФ) в концентрации 0.3 мкг/мл и продолжали инкубацию в течение двух часов.

Удельную скорость роста (μ) рассчитывали по уравнению $\mu = \Delta \ln \text{OD}_{600} / \Delta t$, где t – время в часах. Концентрацию Fe^{2+} и Fe^{3+} в среде определяли феррозиновым методом [16]. Изменения уровня внутриклеточного Fe^{2+} оценивали по степени экспрессии Fuc-контролируемого гена *iucC*, определяя активность β -галактозидазы в штамме, несущем слияние *iucC::lacZ*. Способность клеток к образованию колоний определяли путем посева серийных разведений культуры на чашки с агаром LB. Колонии подсчитывали через 24 часа инкубации при 37 °C. 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 $p < 0.05$.

Общая концентрация ионов железа (Fe^{2+} и Fe^{3+}) в среде M9 без добавок составляла 3 ± 0.3 мкМ. Доля Fe^{2+} равнялась 20%. В течение 2 часов роста клетки *E. coli* потребляли около 1 мкМ железа. При добавлении 10 или 100 мкМ FeSO_4 к культуре, растущей в аэробных усло-

виях, большая часть железа быстро окислялась до Fe^{3+} ионов. Однако с ростом плотности культуры концентрация Fe^{2+} в среде начинала повышаться (рис. 1А), что совпадало с падением уровня кислорода и накоплением внеклеточного глутатиона и цистеина, способных восстанавливать Fe^{3+} до Fe^{2+} ионов. Добавление цистина, который, входя в клетки, создавал избыток цистеина, усиливало выход цистеина в среду и вызывало продукцию H_2S [14]. Следствием этого была тенденция к падению уровня ионов железа в среде в результате его связывания с H_2S в нерастворимый FeS , с одной стороны (не показано), и возрастание концентрации Fe^{2+} в результате его восстановления цистеином, с другой стороны (рис. 1А).

Экспрессия гена *iucC*, кодирующего азробактин, контролируется регулятором Fur, который репрессирует свой регулон в комплексе с Fe^{2+} ионами. При недостатке Fe^{2+} в цитоплазме репрессия снимается с целью усиления транспорта железа из среды. Определение экспрессии слияния *iucC::lacZ* показало, что ее уровень возрастает по мере роста *E. coli* в среде без добавок (рис. 1Б). Это может свидетельствовать о дефиците внутриклеточного Fe^{2+} в этих условиях. Присутствие цистина в среде замедляло повышение экспрессии *iucC::lacZ*, по-видимому, в результате повышения доли Fe^{2+} при восстановлении железа цистеином. Добавление 100 мкМ FeSO_4 предотвращало возрастание экспрессии *iucC::lacZ* независимо от присутствия цистина в среде (рис. 1Б).

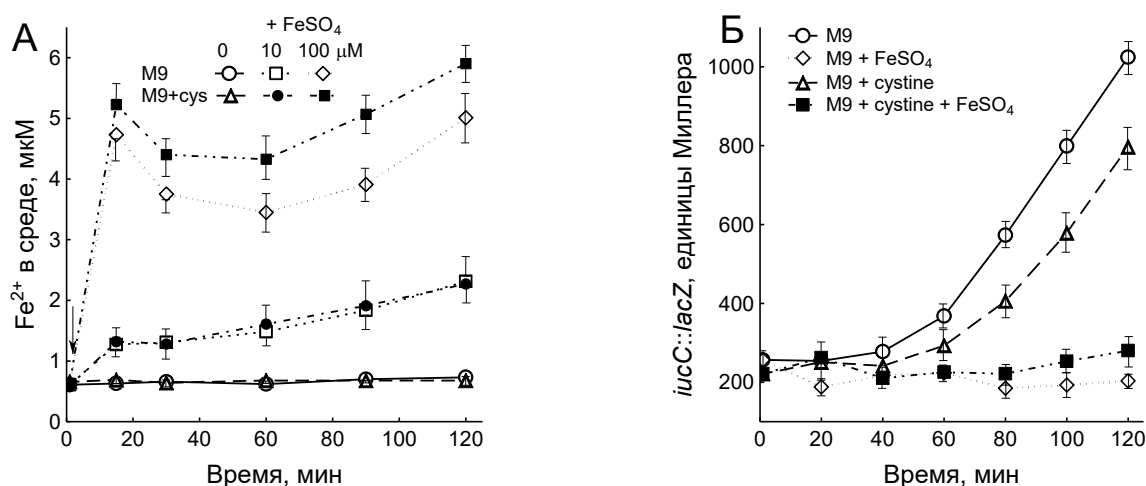


Рис. 1. Изменение уровня Fe^{2+} в среде (А) и в клетках (Б) в отсутствие и в присутствии цистина. А – Fe^{2+} определяли феррозиновым методом. Б – изменение Fe^{2+} оценивали по активности β -галактозидазы в штамме, несущем слияние *iucC::lacZ*

Внесение цистина и FeSO_4 в среду по отдельности или совместно вызывало снижение удельной скорости роста бактерий (рис. 2А). Причиной могло быть усиление окислительных процессов в клетках и возрастание энергетических затрат на поддержание внутриклеточного гомеостаза цистеина в присутствии цистина.

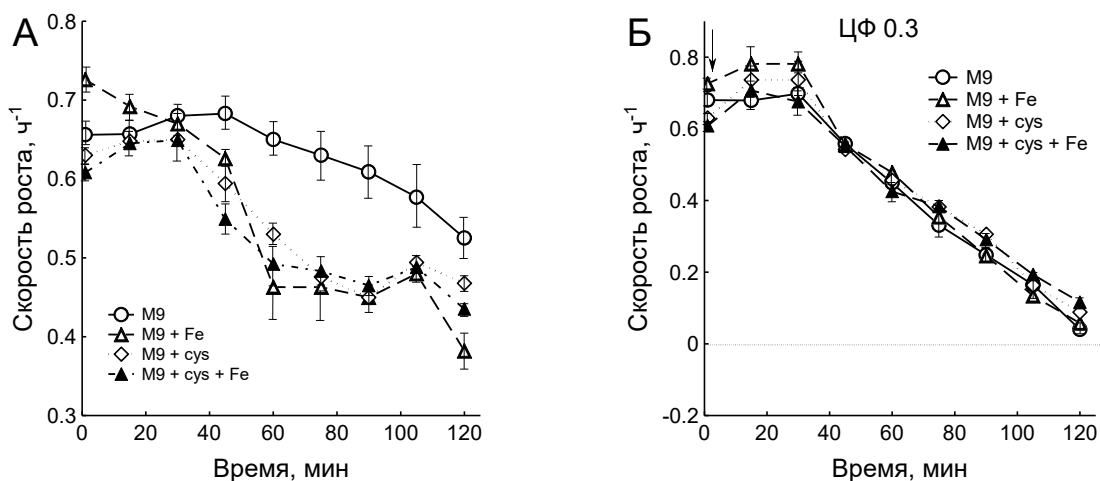


Рис. 2. Удельная скорость роста *E. coli* в контроле (А) и при действии 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина на фоне изменения содержания железа и цистина в среде

Обработка ципрофлоксацином (0.3 мкг/мл) приводила к ингибированию роста во всех рассматриваемых вариантах среды примерно в одинаковой степени (рис. 2Б). В этих условиях предотвращалось повышение экспрессии *iucC::lacZ* в вариантах без добавления FeSO_4 , что свидетельствует об отсутствии дефицита Fe^{2+} в цитоплазме, по-видимому, вследствие снижения потребления железа при замедлении роста бактерий.

Добавление 0.3 мкг/мл ципрофлоксацина, дозы, которая является оптимальной бактерицидной концентрацией в данных условиях, приводило к снижению количества колоний на чашках (КОЕ) на 3 порядка, когда культура росла в среде М9 без добавок (рис. 3). Внесение 100 мкМ FeSO_4 непосредственно перед ципрофлоксацином повышало бактерицидную активность на порядок по сравнению со средой без добавок. Добавление цистина также повышало чувствительность бактерий к ципрофлоксацину. Однако совместное присутствие цистина и железа в течение первого часа экспозиции к ципрофлоксацину снижало эффект антибиотика на выживаемость по сравнению с одним железом (рис. 3).

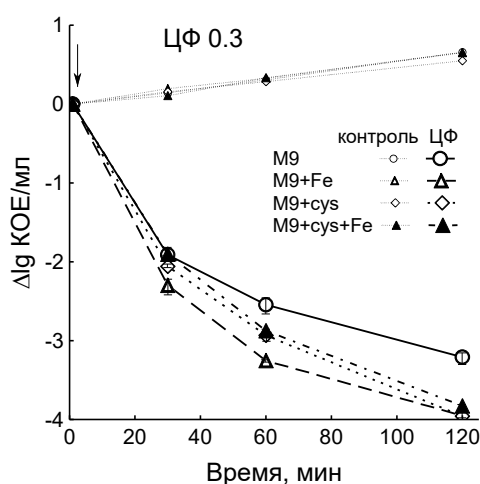


Рис. 3. Влияние цистина и FeSO_4 в среде на число КОЕ при действии ципрофлоксацина на бактерии *E. coli*

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что повышение концентрации ионов Fe^{2+} в среде и в клетках усиливает бактерицидную активность ципрофлоксацина. Это указывает на возможность дополнительного вклада окислительных процессов, связанных с Fe^{2+} , в повреждающее действие этого антибиотика. Присутствие цистина, повышающего долю Fe^{2+} в пуле внутриклеточного железа, также усиливало бактерицидную активность ципрофлоксацина. Однако, когда в среде содержался избыток железа, цистин вызывал противоположный эффект, по-видимому, за счет уменьшения концентрации железа в среде и в клетках при его взаимодействии с H_2S и вследствие снижения скорости роста бактерий и соответственно количества мишеней для антибиотика.

Исследование выполнено в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Библиографический список

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Imlay J.A. Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think // *Curr. Opin. Microbiol.* – 2015. – V. 24. – P. 124–131.
8. Keren I., Wu Y., Inocencio J., Mulcahy L.R., Lewis K. Killing by bactericidal antibiotics does not depend on reactive oxygen species // *Science*. – 2013. – V. 339. – P. 1213–1216.
9. Liu Y., Imlay J.A. Cell death from antibiotics without the involvement of reactive oxygen species // *Science*. – 2013. – V. 339. – P. 1210–1213.
10. Shatalin K., Shatalina E., Mironov A., Nudler E. H_2S : A universal defense against antibiotics in bacteria // *Science*. – 2011. – V. 334. – P. 986–990.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. Imlay K.R.C., Korshunov S., Imlay J.A. The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 2015. – V. 197. – P. 3629–3644.
15. Maringanti S., Imlay J.A. An intracellular iron chelator pleiotropically suppresses enzymatic and growth defects of superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* // J. Bacteriol. – 1999. – V. 181. – P. 3792–3802.
16. Spuhler D., Rengifo-Herrera J.A., Pulgarin C. The effect of Fe^{2+} , Fe^{3+} , H_2O_2 and the photo-Fenton reagent at near neutral pH on the solar disinfection (SODIS) at the low temperatures of water containing *Escherichia coli* K12 // Applied Catalysis B: Environmental. 2010. – V. 96. – P. 126–141.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ БЕСКИЛЬНИЦЫ РАССТАВЛЕННОЙ (*PUCCINELLIA DISTANS* (JACQ.) PARL.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ЗАСОЛЕННОЙ ПОЧВЕ

Краева А.В.¹, Корсакова Е.С.^{1,2}, 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. Проведена оценка разнообразия бактерий, выделенных из ризосферы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), произрастающих на техногенно засоленных почвах в окрестностях г. Соликамска (Пермский край). Общее количество бактерий в исследуемых образцах ризосферы, выявленное на богатой среде Раймонда с 30 г/л NaCl, составило от $4,7 \times 10^7$ до $7,9 \times 10^7$ КОЕ/г ризосферной почвы. Выделенные в чистую культуру 5 штаммов бактерий были идентифицированы на основе анализа гена 16S рРНК. Доминирующими в ризосфере растений, произрастающих на засоленной почве (минерализация более 1,3%), являлись представители грамположительных бактерий родов *Salinibacterium*, *Microbacterium* (класс *Actinomycetes*, филум *Actinomycetota*) и рода *Bacillus* (класс *Bacilli*, филум *Bacillota*). Бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*, филум *Pseudomonadota*) выявлены в ризосфере растений, произрастающих на участках без засоления.

Ключевые слова: засоленная почва, ризосфера, бескильница расставленная, бактерии, ген 16S рРНК

CULTURED BACTERIA FROM THE RHIZOSPHERE OF *PUCCINELLIA DISTANS* (JACQ.) PARL. GROWING ON SALINE SOIL

Kraeva A.V.¹, Korsakova E.S.^{1,2}, Plotnikova E.G.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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 diversity of bacteria isolated from the rhizosphere of *Puccinellia distans* (Jacq.) Parl. plants growing on technogenically saline soils in the vicinity of Solikamsk (Perm region) was evaluated. The total number of bacteria in the studied rhizosphere samples (detected on rich Raymond's medium with 30 g/l NaCl) ranged from 4.7×10^7 to 7.9×10^7 CFU/g soil. The 5 bacterial strains isolated in pure culture were identified based on 16S rRNA gene analysis. The dominant species in the rhizosphere of plants growing on saline soil (mineralization more than 1.3%) were representatives of gram-positive bacteria of the genera *Salinibacterium*, *Microbacterium* (class *Actinomycetes*, phylum *Actinomycetota*), and the genus *Bacillus* (class *Bacilli*, phylum *Bacillota*). Bacteria of the genus *Pseudomonas* (class *Gammaproteobacteria*, phylum *Pseudomonadota*) were identified in the rhizosphere of plants growing in areas without salinity.

Keywords: saline soils, rhizosphere, *Puccinellia distans*, bacteria, 16S rRNA gene

Введение

Ризосферные бактерии играют жизненно важную роль в питании растений, стимулировании роста и борьбе с болезнями. Изучение бактериального биоразнообразия ризосферы растений засоленных местообитаний, а именно микробно-растительных взаимодействий в засоленной среде, механизмов адаптации этих сообществ к условиям засоления, а также идентификация бактерий могут помочь в разработке новых методов повышения урожайности сельскохозяйственных культур на засоленных почвах, что может иметь важное экономическое значение. На территории Пермского края техногенное засоление почв обусловлено, в первую очередь, добычей солей и отходами от их переработки. Применяемые технологии приводят к образованию глинисто-солевых шламов, а также формированию шламохранилищ и солеотвалов, где происходят фильтрационные утечки рассолов [1]. В последние десятилетия вследствие возросшей антропогенной деятельности человека наблюдается увеличение техногенных территорий с засоленными почвами и, как следствие, измененными условиями обитаниями ризосферной микрофлоры. Влияние засоления оказывает избирательную роль на всю совокупность бактерий ризосферы. Микробные сообщества техногенно засоленных почв исследовано недостаточно, еще меньше данных о видовом составе бактерий, живущих в ассоциации с растениями.

Цель настоящей работы – количественная и таксономическая оценка бактерий ризосферы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), широко представленных в травяном покрове на участках с высокой степенью техногенного засоления (г. Соликамск, Пермский край).

Материал и методы исследования

В качестве материала для исследования были отобраны образцы почвы и ризосферы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), доминирующих в травяном покрове на исследуемых участках, расположенных в районе разработок Верхнекамского месторождения калийно-магниевых солей (Пермский край, г. Соликамск) (табл. 1). Образцы почвы без растений и ризосферной почвы взяты: 1) с участков, расположенных в 1.0-1,5 м от солеотвала (образцы № 1, № 2, № 3); 2) с участков, расположенных на расстоянии 8 и 730 м от солеотвала (образцы № 5, № 6).

Определение содержания катионов Na^+ осуществляли из водной вытяжки образцов почвы, приготовленной согласно ГОСТу 26423-85, с последующей их детекцией на атомно-абсорбционном спектрофотометре АА-6300 («Shimadzu», Япония). Общую минерализацию определяли согласно методике [2].

Микробиологический анализ ризосферы растений проводили общепринятыми методами посева почвенной суспензии на агаризованную богатую среду Раймонда [3] с 30 и 70 г/л NaCl с последующим подсчетом колоний микроорганизмов (колонии образующих единиц, КОЕ) и выделением бактерий из единичных колоний для идентификации [4].

Амплификацию фрагмента гена 16S рРНК изолятов проводили с использованием бактериальных праймеров 27F и 1492R согласно методике [5]. Филогенетический анализ полученных изолятов был основан на определении нуклеотидных последовательностей гена 16S рРНК с применением набора реактивов «GenSeq-100» («Синтол», Россия) на автоматическом секвенаторе Нанофор 05 («Синтол», Россия) согласно рекомендациям производителя. Полученные нуклеотидные последовательности длиной около 800 пн были проанализированы с использованием программы MEGA v.11 (<http://www.megasoftware.net>).

Поиск гомологов генов 16S рРНК осуществляли с использованием базы данных EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>).

Результаты и обсуждение

Анализ почвенных образцов показал, что минерализация почвы, отобранной около солеотвала, составляла 1,33-1,38%, а почвы на расстоянии 730 м от солеотвала – 0,05-0,06%. Содержание ионов Na^+ в почве с засолением достигало 165 мг/кг (участок №3), на участках без засоления – 10-17 мг/кг (табл. 1). pH почвы (водная вытяжка) 6,0-6,3.

Таблица 1 – Характеристика образцов почв, отобранных в районе солеразработок

Показатели	Номер участка				
	1	2	3	5	6
Географические координаты	59.633676, 56.758410	59.633647, 56.759587	59.633555, 56.760037	59.633686, 56.760206	59.632342, 56.736762
Минерализация, %	1,38	1,36	1,33	0,06	0,05
Na^+ , мг/кг	36	165	57	17	10
K^+ , мг/кг	46	67	80	26	21
pH	6,2	6,3	6,0	6,0	6,0

Количество микроорганизмов, выросших на агаризованной богатой среде Раймонда с содержанием 30 г/л NaCl, составляло от $4,7 \times 10^7$ до $7,9 \times 10^7$ КОЕ/г ризосферной почвы (рис.). Количество КОЕ в почве без растений – от $4,9 \times 10^6$ до $2,0 \times 10^7$ КОЕ/г почвы.

В чистую культуру из образцов ризосферы бескильницы расставленной выделено 3 штамма бактерий, доминировавших при росте на агаризованной богатой среде Раймонда без хлорида натрия (штаммы 3А-9, 3А-11 и 6А-15), и 2 штамма бактерий, выросших на агаризованной богатой среде Раймонда с содержанием 30 г/л NaCl (штаммы 1А-8 и 6А-25). Штаммы отличались морфологией колоний (табл. 2).

У изолированных штаммов были определены нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК (табл. 3). Установлено, что доминирующие в ризосфере растений бескильницы расставленной, произрастающих на засоленной почве с уровнем минерализации более 1,3%, культивируемые бактерии принадлежат классу *Actinomycetes* филума *Actinomyces* (рода *Salinibacterium*, *Microbacterium*) и классу *Bacilli* филума *Bacillota* (роду *Bacillus*) (табл. 3). Типовые штаммы видов *Salinibacterium amurskyense* и *Microbacterium profundum* являются галотолерантными бактериями, они были выделены из морских экосистем [6,7].

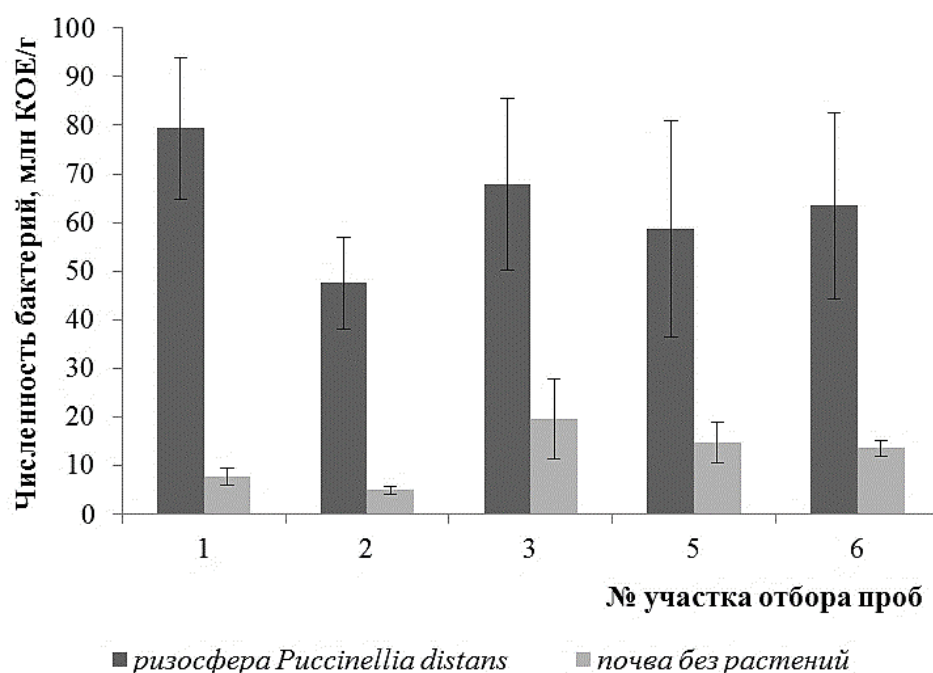


Рис. Численность бактерий в ризосфере растений бескильницы расставленной, произрастающих на территории солеразработок (г. Соликамск)

Таблица 2 – Штаммы бактерий, выделенные из ризосферы бескильницы расставленной, произрастающей на территории солеразработок (г. Соликамск)

Место отбора растений, № образца	Штамм	Морфология колоний
1,0-1,5 м от солеотвала, образец № 1	1А-8	Ярко-желтая, круглая, гладкая, блестящая, профиль плоский, край ровный, структура однородная
1,0-1,5 м от солеотвала, образец № 3	3А-9	Желтая, круглая, гладкая, глянцевая, профиль плоский, край ровный, структура однородная
	3А-11	Бледно-желтая, круглая, гладкая, блестящая, профиль выпуклый, край ровный, структура однородная
730 м от солеотвала, образец № 6	6А-15	Светло-коричневая, круглая, гладкая, глянцевая, профиль выпуклый, край ровный, структура однородная
	6А-25	Бежевая, круглая, гладкая, блестящая, профиль выпуклый, край ровный, структура однородная

Представители класса *Gammaproteobacteria* филума *Pseudomonadota* (род *Pseudomonas*) выявлены в ризосфере растений, произрастающих на участках №5 и №6 без засоления (табл. 1, 3). Бактерии, близкородственные типовым штаммам вида *Pseudomonas alvandrae* и подвида *Pseudomonas brassicacearum subsp. neoaurantiaca subsp. nov.*, обитают в почвах и ризосфере растений [9,10]. Следует отметить, что штамм *Pseudomonas brassicacearum subsp. neoaurantiaca subsp. nov.* ATCC 49054^T выделяет красно-оранжевый пигмент и смесь производных флороглюцинола, обладающей антимикробной активностью [9]. Штаммы вида *Bacillus licheniformis* часто встречаются в почвах и ризосфере растений [8].

Таблица 3 – Анализ нуклеотидных последовательностей генов 16S рРНК бактерий, выделенных из ризосферы растений бескильницы расставленной

Штамм	Типовой штамм	№ GenBank	Сходство, %
1А-8	<i>Salinibacterium amurskyense</i> KMM 3673 ^T	AF539697	99.86
3А-9	<i>Microbacterium profundum</i> Shh49 ^T	EF623999	98.41
3А-11	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580 ^T	AE017333	99.56
6А-15	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>neaurantiaca</i> subsp. nov. ATCC 49054 ^T	EU391388	99.58
6А-25	<i>Pseudomonas alvandae</i> SWRI17 ^T	GCA_0191415 25.1_1	99.93

Заключение

Таким образом, показано, что в исследуемых образцах ризосферы растений бескильницы расставленной (*Puccinellia distans* (Jacq.) Parl.), произрастающих на почвах с разным уровнем засоления (района солеразработок, г. Соликамск), количество культивируемых бактерий составляло $4,7-7,9 \times 10^6$ КОЕ/г почвы ризосферы растений, что на порядок превышало количество бактерий в почве без растений. Доминирующими в ризосфере растений, произрастающих на засоленной почве (минерализация более 1,3%), являлись бактерии родов *Salinibacterium*, *Microbacterium* (класс *Actinomycetes*, филум *Actinomycetota*), и рода *Bacillus* (класс *Bacilli*, филум *Bacillota*), а в ризосфере растений, произрастающих на участках без засоления, – бактерии рода *Pseudomonas* (класс *Gammaproteobacteria*, филум *Pseudomonadota*).

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 23-24-00308).

Библиографический список

1. Бобошко А.Ю., Бачурин Б.А. Экологические проблемы верхнекамского калия [Электронный ресурс] // Горное эхо. <http://ftp.mi-perm.ru/ge4-04/ge4-04-bach.htm> (дата обращения: 18.09.2023).
2. Практикум по агрохимии: учебное пособие / под ред. Минеева В.Г. М.: МГУ, 2001. 689 с.
3. Raymond R.L. Microbial oxidation of *n*-paraffinic hydrocarbons // *Developments in Industrial Microbiology*. – 1961. – Vol. 2 (1). – P. 23–32.
4. Методы почвенной микробиологии и биохимии: учеб. пособие / под ред. Д.Г. Звягинцева. М.: МГУ, 1991. 304 С.
5. Молекулярная генетика: учеб.-метод. пособие / под ред. С.В. Боронниковой. Пермь: Перм. ун-т., 2007. 150 С.
6. Han S.K., Nedashkovskaya O.I., Mikhailov V.V., Kim S.B., Bae K.S. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family *Microbacteriaceae* from the marine environment // *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. – 2003. – Vol. 53 (6). – P. 2061-2066.
7. Wu Y-H., Wu M., Wang C-S., Wang X-G., Yang J-Y., Oren A., Xu X-W. *Microbacterium profundum* sp. nov., isolated from deep-sea sediment of polymetallic nodule environments // In-

- ternational Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2008. – Vol. 58 (12). – P. 2930–2934.
8. Haavik H.I. Bacitracin production by the neotype *Bacillus licheniformis* ATCC 14580^t // Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology. – 1975. – Vol. 83B (6). – P. 534–540.
 9. Ivanova E.P., Christen R., Bizet C., Clermont D., Motreff L., Bouchier C., Zhukova N.V., Crawford R.J., Kiprianova E.A. *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *neaurantiaca* subsp. nov., orange-pigmented bacteria isolated from soil and the rhizosphere of agricultural plants // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2009. – Vol. 59 (10). – P. 2476–2481.
 10. Girard L., Lood C., Höfte M., Vandamme P., Rokni-Zadeh H., Noort V., Lavigne R., Mot R.D. The Ever-Expanding *Pseudomonas* Genus: Description of 43 New Species and Partition of the *Pseudomonas putida* Group // Microorganisms. – 2021. – Vol. 9 (8).

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИОНОВ НИКЕЛЯ И ВАНАДИЯ АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Макарова М.В.¹, Куюкина М.С.^{1,2}, Криворучко А.В.^{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. Изучена способность коллекционных штаммов родококков к восстановлению нанометаллов при воздействии различных концентраций солей никеля и ванадия. Отобран штамм *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 62^T, устойчивый к действию VOSO₄ и способный к восстановлению ванадия, перспективный для извлечения данного металла из бедных руд и загрязненных субстратов. В геноме данного штамма обнаружен ген *qcrC* редуктазы, участвующей во внутриклеточном восстановлении металлов.

Ключевые слова: актинобактерии, родококки, наночастицы металлов, биосинтез

INTRACELLULAR RESTORATION OF NICKEL AND VANADIUM IONS ACTINOBACTERIA OF THE GENUS *RHODOCOCCLUS*

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

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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 ability of collection strains of rhodococci to produce nanometals at various concentrations of nickel and vanadium salts has been studied. The *Rhodococcus rhodochrous* IEGM 62^T strain resistant to VOSO₄ and capable of vanadium reduction, promising for the extraction of this metal from poor ores and contaminated substrates, was selected. In the genome of this strain, the reductase gene *qcrC* involved in intracellular reduction of metals was found.

Keywords: actinobacteria, *Rhodococcus*, metal nanoparticles, biosynthesis

В последние годы благодаря своим физико-химическим свойствам, а именно большой удельной поверхности, адсорбционной активности, склонности к агрегации и накоплению, высокой реакционной способности и каталитической способности, растет применение наночастиц (НЧ) металлов. НЧ оксида ванадия используются в качестве катализаторов и сенсоров, а также находят применение в медицине и биотехнологии [1, 2]. Наночастицы никеля имеют широкое применение в области постоянных магнитов, магнитных жидкостей, носителей магнитной записи, электродов топливных элементов и катализаторов [3].

Биосинтез позволяет получать наночастицы металлов экологически чистым нетоксичным способом без использования высоких температур и давления. Применение микроорга-

низмов в биосинтезе нанометаллов характеризуется высокой производительностью, что снижает затраты энергии по сравнению с традиционными физико-химическими методами синтеза НЧ. Многие бактерии способны восстанавливать ионы металлов до менее токсичных наноразмерных частиц с нулевой валентностью [4, 5].

Актинобактерии рода *Rhodococcus* устойчивы к высоким (≥ 100 –250 мМ) концентрациям тяжелых металлов, способны к аккумуляции ионов металлов, обладают выраженной эмульгирующей способностью и биодеструктивной активностью в отношении трудноразлагаемых токсичных поллютантов [6]. Так ранее было показано, что родококки устойчивы к воздействию солей ванадия (минимальная ингибирующая концентрация выше 250 мМ) [7] и способны извлекать из среды культивирования от 60 до 95% ионов никеля [8].

В данной работе исследована способность коллекционных штаммов *Rhodococcus rhodochrous* ИЭГМ 62^Т, *R. ruber* ИЭГМ 93, ИЭГМ 172, ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WDCM #768; <http://iegmcol.ru/>) к восстановлению нанометаллов при воздействии различных концентраций солей никеля и ванадия.

Бактериальные культуры выращивали в МПБ при 28°C в течение 3 сут, клетки отмывали дистиллированной водой и ресуспендировали в воде до значения оптической плотности (ОП₆₀₀), равной 1,0. Использовали соли металлов: VOSO_4 и $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, которые добавляли к бактериальным суспензиям в концентрациях 0,25 и 0,5 г/л, реакцию восстановления проводили при комнатной температуре в течение 14 сут. Формирование и стабильность восстановленных соединений ванадия анализировали по спектру в УФ-видимой области, ожидаемый пик при 555 нм [1]. Восстановление ионов никеля оценивали при двух длинах волн – 560 и 370 нм, согласно литературным данным [3,4].

По нашим данным, при добавлении сульфата никеля оптическая плотность клеток *R. ruber* ИЭГМ 172 и ИЭГМ 231 снижалась на 40%, указывая на токсичность ионов Ni, тогда как значения ОП суспензии *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^Т были сопоставимы с данными биотического контроля. При этом внесение $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в различных концентрациях (0,25 и 0,5 г/л) не вызывало ожидаемого повышения значений ОП при измерении на разных длинах волн (рис. 1). Таким образом, полученные результаты не подтвердили предположения о внутриклеточном восстановлении ионов Ni родококками.

Внесение сульфата ванадила вызывало ингибирование клеток *R. ruber* ИЭГМ 93, ИЭГМ 172, ИЭГМ 231 (понижение ОП₆₀₀ суспензий до 35%), что свидетельствует о большей токсичности ионов ванадия по сравнению с никелем. При этом для клеток *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^Т было характерно повышение показателя ОП₅₅₅ (рис. 2) при обеих используемых концентрациях VOSO_4 , указывая на процесс восстановления ванадил-иона (VO^{2+}). Таким образом, отобран штамм *R. rhodochrous* ИЭГМ 62^Т, устойчивый к действию VOSO_4 и способный к биовосстановлению ванадия, перспективный для извлечения данного металла из бедных руд и загрязненных субстратов.

На основе секвенированных геномов родококков проведен биоинформационный поиск генов редуктаз, которые могут осуществлять внутриклеточное восстановление металлов. По нашим данным, ген *qcrC*, кодирующий С субъединицу убихинол-цитохром С редуктазы обнаружен в геноме исследуемого штамма, а также представителей *R. cerastii*, *R. erythropolis*, *R. pyridinivorans*, *R. rhodochrous*, *R. ruber*. Этот ген имеет в геноме родококков одну копию и, по-видимому, входит в состав оперона вместе с генами, кодирующими В субъединицу и же-

лезосерный белок. Гены *qcrC* у исследованных видов *R. cerastii*, *R. pyridinivorans* и *R. rhodochrous* характеризуются высокой степенью гомологии (80–86%), тогда как относительно низкая гомология (менее 80%) выявлена между видами *R. erythropolis* и *R. ruber* (табл.).

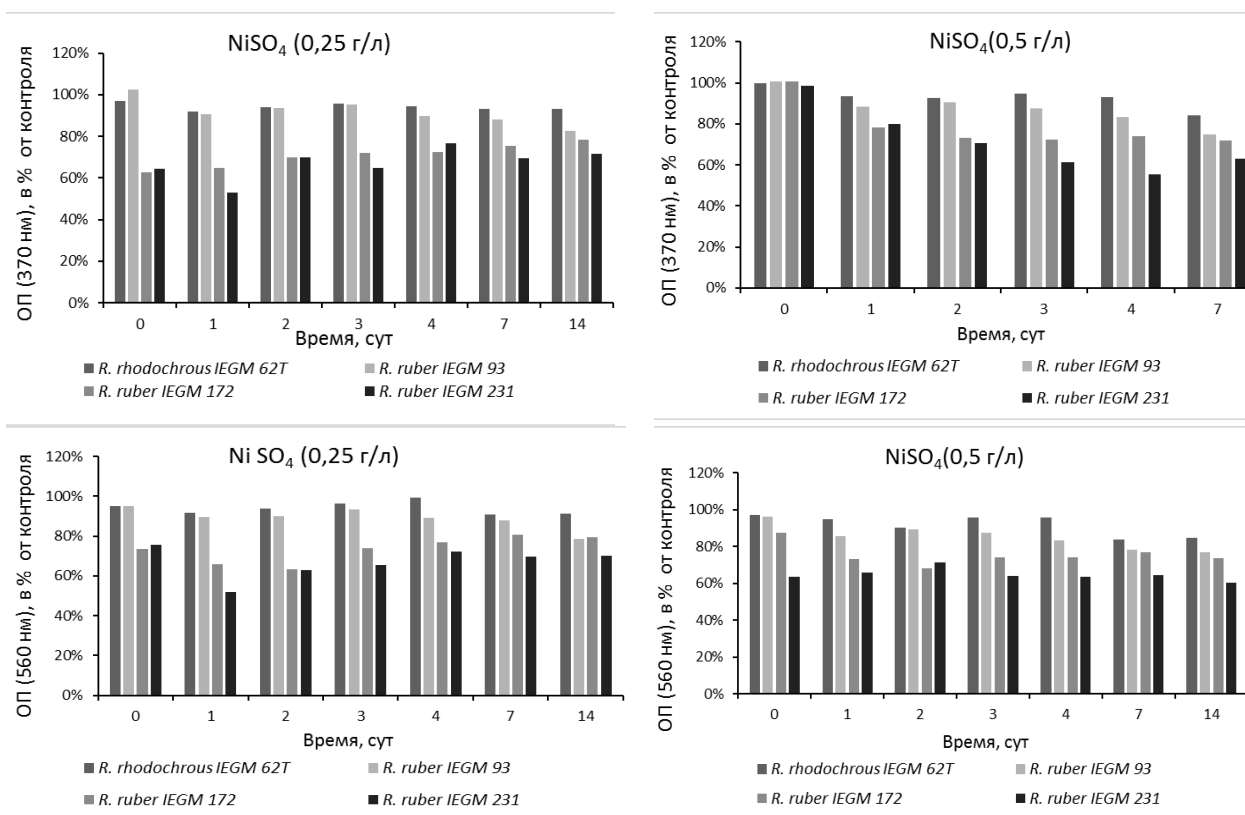


Рис. 1. Изменение ОП суспензий родококков при инкубировании с сульфатом никеля

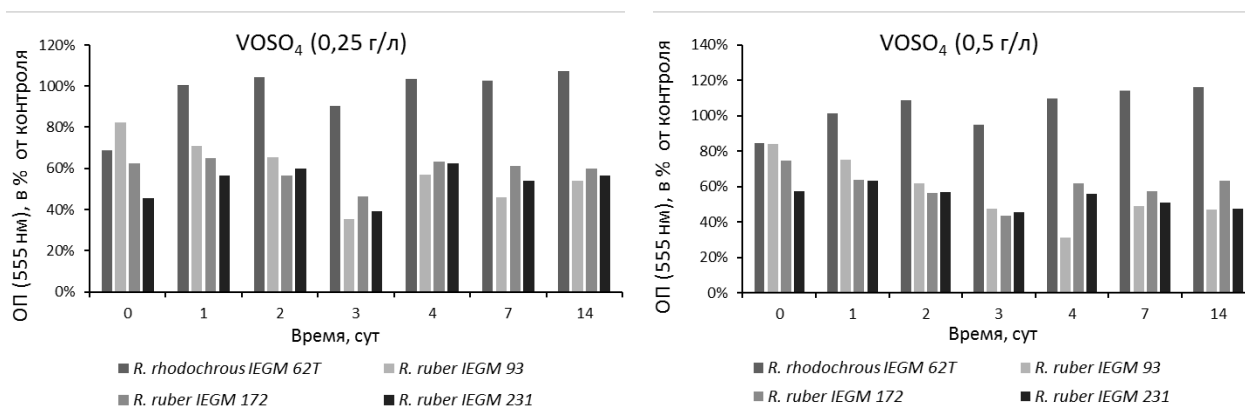


Рис. 2. Изменение ОП суспензий родококков при инкубировании с сульфатом ванадила

Кодируемый *qcrC* белок участвует в передаче электронов в дыхательной цепи (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/Q8NNK5/entry>) и кодирует следующую реакцию: $\text{quinol} + 2 \text{Fe(III)-[cytochrome c](out)} = \text{a quinone} + 2 \text{Fe(II)-[cytochrome c](out)} + 2 \text{H}^+(\text{out})$. Во всех случаях рядом с генами, кодирующими убихинол-цитохром С редуктазу, дигемовую субъединицу цитохрома сс, всегда располагаются гены, кодирующие убихинол-цитохром С редуктазу, субъединицу цитохрома В (ЕС 1.10.2.2) и железосернистую субъединицу убихинол-цитохром С редуктазы (ЕС 1.10.2.2).

Таблица – Степень гомологии генов *qcrC* в исследованных геномах родококков

Вид, штамм	Генетическая последовательность	Степень гомологии, %
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 267	<i>qcrC</i> (Menaquinol-cytochrome c reductase cytochrome c subunit) (Идентификатор: PROKKA_01169, контиг 3, 252240–253091 п.н.)	
<i>R. cerastii</i> ИЭГМ 1243	JAJNDD010000005.1_198852_199598	99
<i>R. cerastii</i> ИЭГМ 1278	NODE_6_length_291266_cov_10.194265_100951_100103	80
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 746	JAJNDF010000002.1_331876_332622	99
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 1270	NODE_6_length_321551_cov_6.872296_130510_131256	100
<i>R. erythropolis</i> ИЭГМ 1359	NZ_JAJNCL010000002.1_469895_470641	98
<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 66	JAJNDE010000005.1_113196_112360	82
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 62	JAJNCP010000002.1_250836_251672	82
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757	JAJNCO010000008.1_80548_79712	82
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360	JAJNCN010000003.1_250834_251670	82
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1362	NODE_6_length_220726_cov_9.298619_3271_4107	82
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 231	<i>qcrC</i> (Cytochrome bc1 complex cytochrome c subunit) (RHRU231v1_920040, 5409227–5410060 п.н., вплотную к этому гену находятся гены <i>qcrB</i> = RHRU231v1_920038 Cytochrome bc1 complex cytochrome b subunit с 5406457 по 5408106 п.н. и <i>qcrA</i> = RHRU231v1_920039 Cytochrome bc1 complex Rieske iron-sulfur subunit с 5408103 по 5409230 п.н.)	
<i>R. cerastii</i> ИЭГМ 1278	NODE_6_length_291266_cov_10.194265_100951_100103	81
<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 66	JAJNDE010000005.1_113196_112360	85
<i>R. pyridinivorans</i> ИЭГМ 1142	JAJNCQ010000001.1_239643_240479	85
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 107	JAJNCP010000002.1_250836_251672	86
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 757	JAJNCO010000008.1_80548_79712	85
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1360	JAJNCN010000003.1_250834_251670	86
<i>R. rhodochrous</i> ИЭГМ 1362	NODE_6_length_220726_cov_9.298619_3271_4107	86
<i>R. ruber</i> ИЭГМ 346	JAJNCM010000019.1_56264_57097	100

Работа выполнена в рамках госзаданий 123041400034-2, АААА-А20-120081990069-3 и поддержана грантом РФФИ 20-44-596001р_НОЦ_Пермский край.

Библиографический список

1. Subashini N., Jeyaruby S., Tamilselvi M.A. New Approach on Biosynthesis of Vanadium Nanoparticles Using *Azotobacter* and Its Activity Against Phytopathogenic Fungi // JETIR. – 2020. – V. 7. – № 7. – P. 257–261.
2. Zhang Y., Zhang X., Zhang L., Alarfaj A.A., Hirad A.H., Alsabri A.E. Green formulation, chemical characterization, and antioxidant, cytotoxicity, and anti-human cervical cancer effects of vanadium nanoparticles: A pre-clinical study // Arabian Journal of Chemistry. – 2021. – V. 4. – № 6. – P. 103147.
3. Vasudeo K., Pramod K. Biosynthesis of Nickel Nanoparticles Using Leaf Extract of Coriander // Biotechnol Ind J. – 2016. – V. 12. – № 11. – P. 1–6.
4. Spoorthy H.P., Rekha N.D., Satish S. Biosynthesis Nickel Nanoparticle by Microorganism and Their Biological Activity // Der Pharma Chemica. – 2017. – V. 9. – № 13. – P. 80–84.
5. Barbasz A., Oćwieja M., Walas S. Toxicological effects of three types of silver nanoparticles and their salt precursors acting on human U-937 and HL-60 cells // Toxicology Mechanisms and Methods. – 2017. – V. 27. – № 1. – P. 58–71.
6. Ившина И.Б., Куюкина М.С., Каменских Т.Н., Криворучко А.В., Тюмина Е.А., Елькин А.А. Углевородоксиляющие родококки: особенности биологической организации под воздействием экополлютантов. Атлас-монография / Под ред. И.Б. Ившиной. УрО РАН, 2021. С. 140
7. Костина Л.В., Куюкина М.С., Ившина И.Б. Изучение устойчивости актинобактерий к солям ванадия // Вестник ПГУ. Биология. – 2004. – № 2. – С. 114–117.
8. Литвиненко Л.В. Способность актинобактерий родов *Dietzia*, *Gordonia* и *Rhodococcus* аккумулировать ионы никеля // Микробиология. – 2019. – Т. 88. – № 2. – P. 207–126.

СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ

Минаева А.В.¹, Вальцифер В.А.², Нестерова Л.Ю.^{1,3}, Кузнецова М.В.³

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Институт технической химии УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН, Пермь, Россия

³ Институт экологии и генетики микроорганизмов УрО РАН – филиал ПФИЦ УрО РАН,
Пермь, Россия

Аннотация. К современным дезинфектантам предъявляется требование увеличения продолжительности действия, однако стандартные методики не позволяют оценивать данный параметр. Разработан новый способ оценки пролонгированного действия биоцидов, которые способны обеспечить профилактику повторной контаминации поверхности. В данной работе с помощью предлагаемой методики произведена оценка эффективности дезинфектанта на полимерной основе с использованием *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* с имитацией белкового загрязнения и без него.

Ключевые слова: эффективность дезинфектанта, микробная контаминация, пролонгированное действие

A METHOD TO EVALUATE THE PROLONGED ANTIMICROBIAL ACTION OF DISINFECTANTS

Minaeva A.V.¹, Valtsifer V.A.², Nesterova L.Y.^{1,3}, Kuznetsova M.V.³

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Institute of Technical Chemistry, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences – branch of the PFRC, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia

³ 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 new disinfectants are subject to the requirements of prolonged action, which determines the prevention of repeated contamination of surfaces. However, standard methods do not allow to evaluate it, and therefore a new method for evaluating prolonged action has been developed. In this work, using the proposed methodology, the effectiveness of a polymer-based disinfectant was evaluated using *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* with and without imitation of protein contamination.

Keywords: the effectiveness of the disinfectant, microbial contamination, prolonged action

Введение. Одной из наиболее важных проблем в местах массового скопления людей, является загрязнение абиотических поверхностей патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В большей степени проблема контаминации поверхностей возникает в ме-

дицинских учреждениях вследствие случайного попадания возбудителей инфекций непосредственно на объекты, с которыми контактируют пациенты и медицинский персонал [1, 2].

Дезинфекция не всегда позволяет успешно устранить микроорганизмы с различных поверхностей. В частности, такое происходит из-за приобретения устойчивости штаммов к регулярно используемым дезинфектантам: [3]. Кроме того, большинство существующих дезинфектантов и биоцидных композиций оказывают действие непосредственно в момент нанесения их на загрязненную микроорганизмами поверхность, либо действуют весьма непродолжительное время. В связи с этим, в последние годы активно идет разработка новых или модификация уже существующих средств для повышения их активности и/или увеличения продолжительности бактерицидного действия. Последнее – важный критерий при выборе дезинфицирующего агента с профилактическим действием в отношении контаминации поверхностей бактериями, в том числе, образующими биопленки [4, 5, 6].

Одной из наиболее перспективных стратегий для борьбы с прикреплением микроорганизмов на объектах (в неровностях и микротрещинах) и формированием биопленок является нанесение на поверхность тонкой полимерной пленки, содержащей бактерицидные вещества. Таким образом, эффективность таких дезинфектантов возрастает за счет увеличения сроков их действия: полимерная матрица выступает в качестве депо антимикробного компонента и обеспечивает его длительную сохранность на поверхности. Однако, на данный момент не существует стандартных методик для оценки пролонгированного действия таких биоцидов.

Цель: разработать способ оценки эффективности дезинфицирующих средств с пролонгированным действием.

Материалы и методы. Для оценки эффективности пленочных дезинфектантов была выбрана композиция, в составе которой присутствуют 5% раствор $ZnSO_4$ и 0,75% полиакриламид (ПАА) Праестол 2530 (получен из Института технической химии УрО РАН, г. Пермь). В качестве тест-объектов были выбраны культуры штаммов: *Escherichia coli* ATCC®25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC®25923 (получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ГИСК им. Л.А. Тарасевича (сейчас ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, г. Москва). Непосредственно перед экспериментом культуры микроорганизмов выращивали в жидкой питательной среде в течение 18-24 часов при 37 °C, затем разводили получившуюся суспензию в 100 раз в 0,9% растворе NaCl. Оценка эффективности бактерицидной композиции проводилась на двух тест-поверхностях: «кафельная плитка» и «пластик», размерами 10x10 см². Поверхности предварительно очищали от загрязнений с помощью мыльного раствора, непосредственно перед экспериментом обрабатывали 70% этанолом для предотвращения случайной контаминации. Далее на поверхность (10x10 см²) наносили 0,9 мл раствора дезинфицирующего средства и равномерно распределяли стерильным шпателем, оставляли на 1,5 часа до полного высыхания дезинфицирующего средства. Затем добавляли 0,1 мл бактериальной суспензии и равномерно распределяли стерильным шпателем, высушивали в течение 1 мин. Выдерживали необходимую экспозицию (10/30 минут), после чего приливали 0,5 мл нейтрализатора и немедленно делали высев смеси стерильным ватным тампоном на плотную питательную среду. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 18-24 часов. Для оценки пролонгированного действия дезинфектанта поверхности с нанесенной на них полимерной пленкой закладывали в стерильных условиях на 2 недели, по истечении которых добавляли 0,1 мл бактериальной суспензии и равномерно распределяли стерильным шпателем,

высушивали в течение 1 мин. Также выдерживали необходимую экспозицию (10/30 минут), после чего приливали 0,5 мл нейтрализатора и немедленно делали высев смеси стерильным ватным тампоном на плотную питательную среду.

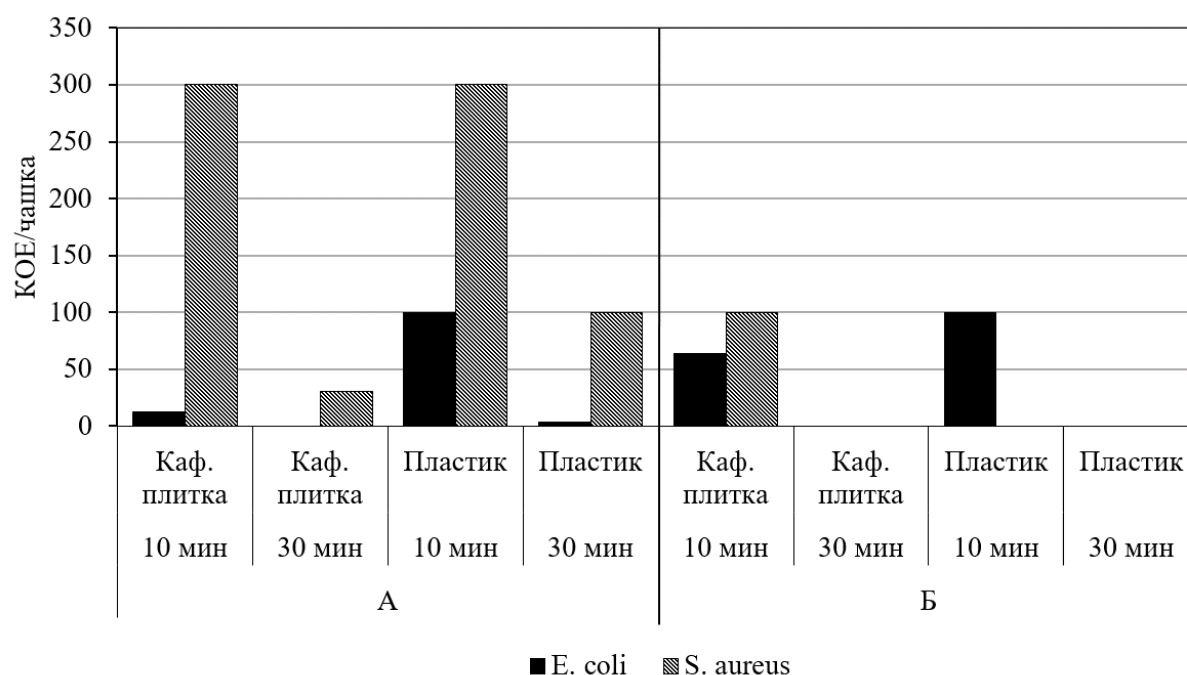
Параллельно проводилась постановка эксперимента с имитацией белкового загрязнения. Имитацию белкового загрязнения выполняли в двух вариантах: без формирования пленки – «белковое загрязнение» и с формированием пленки – «белковая пленка». В первом варианте на этапе добавления бактериальной суспензии одновременно наносили 0,1 мл культуры и 0,1 мл 0,3%-го раствора бычьего альбумина. Во втором – 0,1 мл 0,3%-го раствора бычьего альбумина наносили на поверхность непосредственно перед внесением бактериальной суспензии, распределяли по площади поверхности стерильным шпателем и оставляли на 3-5 минут до полного высыхания, после чего приливали 0,1 мл культуры.

Чувствительность штамма оценивали по числу колониеобразующих единиц (КОЕ): более 300 КОЕ – штамм устойчивый, 99-299 – раствор оказывает суббактерицидное действие, 1-99 – раствор оказывает неполное бактерицидное действие, нет роста – штамм чувствительный, раствор оказывает бактерицидное действие. Помимо этого, контролировали полноту действия нейтрализатора, чистоту растворов дезинфицирующего средства и нейтрализаторов.

Результаты и выводы. При оценке немедленного действия дезинфицирующей композиции на поверхности «кафельная плитка» дезинфектант оказывал неполное и полное бактерицидное действие на клетки *E. coli* через 10 и 30 минут соответственно. В отношении *S. aureus* раствор дезинфектанта проявлял себя как неэффективный через 10 минут и оказывал неполное бактерицидное действие через 30 минут. На поверхности «пластик» в отношении *E. coli* через 10 минут раствор дезинфектанта оказывал суббактерицидное действие, через 30 минут – полное бактерицидное действие. В отношении *S. aureus* дезинфектант оказывал суббактерицидное действие как через 10, так и через 30 минут.

При оценке действия дезинфектанта после 2-недельной экспозиции на поверхности «кафельная плитка» выявлено полное бактерицидное действие раствора на клетки *E. coli* и *S. aureus* через 30 минут. На поверхности «пластик» дезинфектант полностью уничтожал клетки *E. coli* через 30 минут, в то время как подобный эффект в отношении стафилококка фиксировали же через 10 минут контакта (рис. 1).

Разработанной методикой также была определена эффективность дезинфектанта в отношении тест-культур в условиях белкового загрязнения. В данном случае ПАА-биоцид оказывал суббактерицидное действие на клетки *E. coli* через 10 минут и неполное бактерицидное – через 30 минут соответственно. В отношении *S. aureus* дезинфектант проявлял себя как неэффективный через 10 минут воздействия, однако через 30 минут фиксировалось суббактерицидное действие. В варианте «белковая пленка» уже через 10 минут дезинфектант оказывал неполное бактерицидное действие на клетки *E. coli*, и суббактерицидное действие на *S. aureus*. Через 30 минут биоцид оказывал полное бактерицидное действие на оба микроорганизма.



А – Немедленное действие

Б – Пролонгированное действие (2 недели)

Рис. 1. Эффективность действия ПАА-биоцида, нанесенного предложенной техникой, в отношении тест-культур в вариантах немедленного и пролонгированного действия разной экспозицией (10 и 30 минут)

Таким образом, с помощью представленной методики выявлено, что эффективность ПАА-биоцида в отношении тест-культур не снижается в течение 2-х недель. Это, по-видимому, обусловлено способностью полимерной матрицы выступать в качестве депо антибактериального агента. Предложенная методика позволяет оценить, как немедленное, так и пролонгированное действие дезинфектанта, то есть определить эффективность его применения для дезинфекции и профилактики контаминации поверхности в течение длительного времени.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/542 от 18.03.2021 г.

Библиографический список

1. Khan H.A., Baig F.K., Mehboob R. Nosocomial infections. Epidemiology, prevention, control and surveillance // Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2017. – V. 7(5). – P. 478–482.
2. Robakowska M., Bronk M., Tyrańska-Fobke A., Ślęzak D., Kraszewski J., Balwicki Ł. Patient Safety Related to Microbiological Contamination of the Environment of a Multi-Profile Clinical Hospital // Int. J. Environ Res Public Health. – 2021. – V. 18(7). – №3844.
3. Otter J.A., Yezli S., Salkeld J.A., French G.L. Evidence that contaminated surfaces contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings // Am. J. Infect. Control. – 2013. – V. 41(5). – P. 6–11.

4. Donland R.M., Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2002. – V. 15(2). – P. 167–193.
5. Kadam S., Shai S., Shahane A., Kaushik S K. Recent advances in non-conventional antimicrobial approaches for chronic wound biofilms: Have we found the ‘chink in the armor’? // *Bio-medicine*. – 2019. – № 7(2). – P. 35.
6. Malone M., Goeres M.D., Gosbell I., Vickery K., Jensen S., Stoodley P. Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications // *Expert review of anti-infective therapy*. – 2017. – V. 15(2). – P. 147–156.
7. Kim L. Persister Cells // *Annu. Rev. Microbiol.* – 2010. – V. 64. – P. 357–372.
8. Nguyen D., Joshi-Datar A., Lepine F., Bauerle E., Olakanmi O., Beer K., McKay G., Siehnel R., Schafhauser J., Wang Y., Britigan E B., Singh K P. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria // *Science*. – 2011. – V. 334(6058) – P. 982–986.

ВЛИЯНИЕ СМЕШАННЫХ СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР ДРОЖЖЕЙ НА СОДЕРЖАНИЕ ВИННОЙ КИСЛОТЫ В БЕЛЫХ ВИНАХ ДОЛИНЫ ДОНА

Михайленко Д.О., Горовцов А.В.

Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского, ЮФУ, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. Целью данной работы являлось создание смешанных стартовых культур дрожжей с non-*Saccharomyces* видом *Kloeckera apiculata* и производственным видом *Saccharomyces cerevisiae* и изучение их влияния на содержание винной кислоты. Было установлено, что данный штамм *Kloeckera apiculata* оказывает протекторное действие по отношению к винной кислоте. Содержание винной кислоты минимально снижается по сравнению с исходным при использовании смешанных стартовых культур.

Ключевые слова: non-*Saccharomyces*, Долина Дона, стартовые культуры

INFLUENCE OF MULTI-SPECIES YEAST STARTER CULTURE ON THE CONTENT OF TARTARIC ACID IN WHITE WINES OF THE DON VALLEY

Mikhailenko D.O., Gorovtsov A.V.

Academy of biology and biotechnology, SFU, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. The aim of this work was to make different multi-species starter cultures with non-*Saccharomyces* species *Kloeckera apiculata* and commercial species *Saccharomyces cerevisiae* and to study their influence on the content of tartaric acid in wine. *Kloeckera apiculata* was found to have a protective effect on the level of tartaric acid. Minimum degradation of the content of tartaric acid from the initial one was when multi-starter cultures were used.

Keywords: non-*Saccharomyces*, Don Valley, starter cultures

Введение. Последние годы виноградарство и виноделие начинают активно развиваться в нашей стране. Для стимуляции этого процесса правительство принимает различные меры поддержки отечественных виноделен. Особенно важен этот вопрос и в Ростовской области, где располагается винодельческий кластер Долина Дона и выпускаются вина с защищенным географическим указанием «Долина Дона». Всё больше исследований посвящается как автохтонным, так и интродуцированным техническим сортам винограда. Однако лишь небольшая часть этих научных работ посвящена тематике изучения влияния разных видов дрожжей на характеристики вина. Основными компонентами ароматики и букета вина являются различные органические вещества. Дрожжи играют ключевую роль в формировании так называемой вторичной ароматики вина [1,2]. В основном в промышленном виноделии используются лиофилизированные коммерческие культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, созданные специально для получения качественной винной продукции с заранее определенными основными свойствами. Однако последние несколько лет всё больше внима-

ния уделяется различным non-*Saccharomyces* видам дрожжей, как способным придать винам уникальный «ароматический фенотип» в составе смешанных стартовых культур с промышленными штаммами [3]. Non-*Saccharomyces* виды дрожжей могут оказывать значительное влияние на характеристики и ароматику вина. Поэтому целью данной работы являлось изучение влияния смешанных стартовых культур дрожжей с non-*Saccharomyces* видом *Kloeckera apiculata* на содержание винной кислоты в винах Долины Дона.

Материалы и методы. Для дальнейшего исследования были взяты две культуры дрожжей. Первая культура была коммерческой производственной, ИОС В 3000, которая содержала штамм *Saccharomyces cerevisiae*. Вторая культура была представлена non-*Saccharomyces* видом *Kloeckera apiculata*, ранее выделенным с винограда, выращенного в Долине Дона. Было использовано 6 стартовых культур, четыре из которых были смешанного типа. Стартовая культура № 1 содержала в себе только выбранный производственный вид. Стартовая культура № 2 содержала только non-*Saccharomyces* вид *Kloeckera apiculata*. Стартовые культуры № 3, № 4, № 5, № 6 были смешанного типа и содержали в себе оба выбранных штамма, при чем вид *Kloeckera apiculata* был инокулирован раньше, затем через 0 ч., 24 ч., 48 ч., 72 ч. (соответственно стартовые культуры № 3, № 4, № 5, № 6) был инокулирован вид *Saccharomyces cerevisiae*. Также для дальнейшего исследования были взяты два белых технических сорта винограда: Сибирьковский (автохтонный сорт) и Алиготе (интродуцированный сорт). Оба сорта были предоставлены винодельней в Ростовской области, которая имеет право выпускать вина с защищенным географическим указанием «Долина Дона». Из каждого сорта винограда был получен сок, которые в дальнейшем был инокулирован согласно описанной выше схеме. Закладка брожения происходила в двух повторностях. После завершения всех процессов ферментации с полученным вином был проведен анализ содержания винной кислоты с помощью колориметрического метода [4].

Результаты и обсуждение. Винная кислота играет важную роль не только в итоговых органолептических характеристиках вина, но и в кислотности в целом, играющей важную роль в сохранении алкогольной продукции от порчи. При этом винная кислота не синтезируется во время брожения, она переходит в сусло и вино из непосредственно ягод винограда. Однако винная кислота при определенных условиях может деградировать и выпадать в осадок во время процессов ферментации, что негативно сказывается на итоговых свойствах продукта. Степень деградации также зависит и от выбранной стартовой культуры дрожжей, от штамма [5, 6]. При определенных условиях некоторые non-*Saccharomyces* виды могут утилизировать винную кислоту.

Результаты по содержанию винной кислоты представлены ниже в таблице. Так как винная кислота накапливается в ягодах винограда во время созревания и не синтезируется дрожжами, для каждого сорта винограда было определено исходное содержание кислоты в сусле. В сусле из Сибирьковского содержалось 5,91 г/л винной кислоты, в сусле из Алиготе – 5,53 г/л.

Таблица – Содержание винной кислоты в белых винах, г/л

Стартовая культура/ Сорт	№ 1. Прозв.	№ 2. <i>Kl.</i> <i>apiculata</i>	№ 3. <i>Kl.</i> <i>ap.</i> + пр. (0 ч.)	№ 4. <i>Kl.</i> <i>ap.</i> + пр. (24 ч.)	№ 5. <i>Kl.</i> <i>ap.</i> + пр. (48 ч.)	№ 6. <i>Kl.</i> <i>ap.</i> + пр. (72 ч.)
Сибирьковский	2,08	3,18	3,64	4,20	4,04	4,11
Алиготе	1,97	2,67	3,55	4,77	4,50	4,44

Максимальное снижение содержания винной кислоты при брожении на обоих сортах произошло при использовании контрольной стартовой культуры с производственным штаммом *Saccharomyces cerevisiae*. Использование non-*Saccharomyces* вида в стартовых культурах с разными временными промежутками привело к минимальной деградации содержания винной кислоты по сравнению с исходным количеством кислоты в винограде. Минимальное снижение (на 1,71 г/л и на 0,76 г/л при брожении на Сибирьковом и Алиготе соответственно) произошло при использовании стартовой культуры №4, с временным промежутком 24 часа. Возможно, минимальное снижение количества винной кислоты после брожения связано с наличием маннопротеинов в вине. Маннопротеины являются частью клеточной стенки дрожжей. Маннопротеины оказывают определенное протекторное действие по отношению к винной кислоте и не позволяют ей кристаллизоваться и выпадать в осадок. Они могут переходить в вино, как и после завершения процессов брожения в результате аутолиза клеток, так и во время роста и ферментации при естественном гидролизе клеточной стенки материнской клетки в процессе почкования. Считается, что использование в стартовых культурах некоторых non-*Saccharomyces* видов может приводить к увеличению концентрации маннопротеинов в вине ещё во время брожения [7]. То есть, стартовые культуры с такими non-*Saccharomyces* видами могут за счёт маннопротеинов дополнительно уменьшать уровень снижения количества винной кислоты в процессе ферментации.

Выводы. Использование выбранного non-*Saccharomyces* штамма не привело к значительной деградации винной кислоты в готовом продукте. Теоретически, использование смешанной культуры с *Kloeckera apiculata* может быть перспективно при изготовлении вин из сортов винограда с заведомо низким содержанием винной кислоты, с целью не допустить значительной деградации количества винной кислоты при брожении.

Библиографический список

1. Katarina F., Katarina M., Katarina D., Ivan S., Fedor M. Influence of yeast strain on aromatic profile of Gewürztraminer wine // LWT-Food Science and Technology. – 2014. – Vol. 59. – № 1. – P. 256–262.
2. Scott W.T., Smid E.J., Block D.E., Notebaart R.A. Metabolic flux sampling predicts strain-dependent differences related to aroma production among commercial wine yeasts // Microbial cell factories. – 2021. – Vol. 20. – № 1. – P. 1–15.
3. Padilla B., Gil J. V., Manzanares P. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. – 411.
4. Гержикова В.Г., Методы технического контроля в виноделии, 2-е изд. – Симферополь: «Таврида». – 2009. – 304 с.
5. Scutarasu E.C., Teliban I.V., Zamfir C.I., Luchian C.E., Colibaba L.C., Niculaua M., Cotea V.V. Effect of Different Winemaking Conditions on Organic Acids Compounds of White Wines // Foods. – 2021. – Vol. 10. – № 11. – 2569.
6. Mancic S., Stamenkovic Stojanovic S., Danilovic B., Djordjevic N., Malicanin M., Lazic M., Karabegovic I. Oenological characterization of native *Hanseniaspora uvarum* strains // Fermentation. – 2022. – Vol. 8. – № 3.
7. Domizio P., Liu Y., Bisson L.F., Barile D. Use of non-*Saccharomyces* wine yeasts as novel sources of mannoproteins in wine // Food microbiology. – 2014. – Vol. 43. – P. 5–15.

ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В ПОЧВАХ ООПТ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Мотько П.В., Горовцов А.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. В данной работе был проведен учет численности аэробных спорообразующих бактерий, а также оценена доля спор бацилл от общего числа культивируемых гетеротрофов в образцах, отобранных на территориях ООПТ Ростовской области. Было проведено сравнение распространенности бацилл в различных типах почв. Численность аэробных спорообразующих бактерий составила от $6,9 \pm 0,1$ до $0,1 \pm 0,01$ млн. КОЕ/г абсолютно сухой почвы. Доля бацилл от общего числа культивируемых гетеротрофных микроорганизмов составила от 23,03% до 0,04%. Наблюдалось возрастание численности аэробных спорообразующих бактерий с востока на запад Ростовской области от бурых полупустынных почв до чернозёмов текстурно-карбонатных, с незначительным снижением в чернозёмах южных.

Ключевые слова: *Bacillales*, особо охраняемые природные территории, аэробные спорообразующие бактерии, черноземы

ASSESSMENT OF THE NUMBER OF AEROBIC SPORE-FORMING BACTERIA IN SOILS OF SPECIALLY PROTECTED NATURAL AREAS OF THE ROSTOV REGION

Motko P.V., Gorovtsov A.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. In this work, the number of aerobic spore-forming bacteria was determined, and the proportion of bacilli spores from the total number of culturable heterotrophic bacteria in soil samples from the territories of protected areas of the Rostov region was assessed. The abundance of bacilli in different soil types was compared. The number of aerobic spore-forming bacteria ranged from 6.9 ± 0.1 to 0.1 ± 0.01 million CFU/g of absolutely dry soil. The proportion of bacilli from the total number of cultivated heterotrophic microorganisms ranged from 23.03% to 0.04%. An increase in the number of aerobic spore-forming bacteria was observed from east to west of the Rostov region from brown semi-desert soils to textured carbonate chernozems, with a slight decrease in southern chernozems.

Keywords: *Bacillales*, specially protected natural areas, aerobic spore-forming bacteria, chernozems, chestnut soils

Аэробные спорообразующие бактерии, большая часть которых выделена в порядок *Bacillales*, представляют из себя значительную долю микробного комплекса многих типов почв, что обусловлено рядом свойств присущих этой группе бактерий. Представители порядка *Bacillales* обладают способностью к образованию эндоспор – покоящихся форм клеток,

обладающих высокой устойчивостью к неблагоприятным факторам среды. Периоды времени, на протяжении которых споры способны сохранять свою жизнеспособность по разным данным насчитывают от десятков до тысяч лет.

Формирование спор внутри вегетативной клетки может быть обусловлено недостатком питательных веществ, лимитирующих рост и развитие бактерии. Для некоторых штаммов дефицит таких аминокислот как аланин, валин, лейцин, изолейцин и др. может послужить фактором индукции процесса споруляции. Известен и обратный процесс. Так, например, при высоком содержании в питательной среде источников углерода и азота, образование спор может быть подавлено [1].

Благодаря способности аэробных спорообразующих бактерий существовать при условии низкого содержания органических веществ, в почвах они достигли наибольшей распространённости. Бациллы были выделены из мест с экстремальными факторами среды таких как пустыни, термальные источники, вечная мерзлота и др. [2, 3].

Кроме этого, одной из причин широкого распространения аэробных спорообразующих бактерий в различных типах почв является высокое биоразнообразие данной группы микроорганизмов, а также возможность некоторых видов выстраивать биотические связи с многими видами растений, образуя устойчивые микробные сообщества в их ризосфере. Благодаря вышеописанному свойству представители порядка *Bacillales* нередко участвуют в осуществлении биоконтроля патогенов растений за счет образования плотных биоплёнок на корнях сельскохозяйственных культур [4, 5].

Материалами исследования выступили 27 почвенных образцов из 19 ООПТ Ростовской области. Отбор образцов проводился в июне-июле 2022 года с глубины 0–20 см. При отборе почвенных образцов применялся метод конверта.

Исследование почвы по микробиологическим показателям проводили после десорбции клеток микроорганизмов в стерильной воде с применением резинового пестика и взбалтывания на ротационном шейкере в течение 30 мин. Для учета общего числа культивируемых гетеротрофных бактерий производился посев разведения суспензии 10^{-4} на мясопептонный агар. Для учета спор аэробных спорообразующих бактерий суспензию почвы помещали в сухожаровый шкаф, где она подверглась пастеризации с экспозицией в 20 минут при температуре 80°C. Данное действие было произведено для того, чтобы уничтожить все вегетативные клетки почвенных микроорганизмов и получить суспензию, которая содержала бы только термоустойчивые эндоспоры, принадлежащие микроорганизмам изучаемых родов. По завершении пастеризации суспензию остужали при комнатной температуре и встряхивали на шейкере в течение 15 минут. Для посева аэробных спорообразующих бактерий была выбрана среда сусло-МПА, что обусловлено способностью колоний проявлять свои морфологические особенности при наличии полисахаридов, содержащихся в сусле. Состав среды представляет из себя смесь ГРМ-бульона и сусла, взятых в равных пропорциях, с последующим добавлением 3% агар-агара.

В исследуемых образцах была подсчитана численность почвенных бацилл и общее число культивируемых гетеротрофных микроорганизмов на грамм абсолютно сухой почвы. Кроме этого, была найдена доля спор бацилл относительно общего количества микроорганизмов, выделенных из почвенных образцов. Полученные значения приведены в таблице.

Таблица – Численность и процентное содержание бактерий

Номера образцов	Численность бактерий (млн. КОЕ на г. абсолютно сухой почвы)	Общая численность микроорганизмов (млн. КОЕ на г. абсолютно сухой почвы)	Процент бактерий
Чернозем обыкновенный	3,5±0,2	32,9±3,7	10,83%
Чернозем обыкновенный	2,5±0,3	26,7±0,3	9,70%
Чернозем текстурно-карбонатный	4,0±0,3	17,6±2,6	23,03%
Псаммозем серогумусовый глееватый	1,3±0,1	7,7±1,3	17,71%
Чернозем обыкновенный карбонатный	6,9±0,1	50,8±3,2	13,73%
Лугово-каштановая почва	1,9±0,1	39,0±5,7	4,93%
Лугово-каштановая почва	2,2±0,2	26,0±3,0	8,46%
Каштановая солонцеватая почва	2,2±0,1	23,0±2,6	9,65%
Аллювиальная темnogумусовая глеевая почва	3,0±0,08	56,1±2,4	5,48%
Чернозем слабосолонцеватый	1,7±0,3	21,4±3,5	8,35%
Чернозем южный	2,3±0,2	21,1±1,8	11,10%
Темно-каштановая почва	1,4±0,08	26,6±4,5	5,47%
Чернозем южный	4,7±0,7	33,8±12,7	13,91%
Чернозем южный	4,1±0,4	73,9±4,8	5,61%
Солончак	0,1±0,01	26,4±3,6	0,40%
Солончак	1,6±0,09	18,0±3,8	8,95%

Исходя из данных в таблице можно сделать вывод, что наибольшая доля бактерий относительно общей численности почвенных микроорганизмов содержится в образце 1601, который представляет из себя чернозём текстурно-карбонатный среднеспонгиозный на красно-бурых глинах, подстилаемых элювием песчаника. Текстурно-карбонатные чернозёмы характеризуются отчётливой структурой почвенных горизонтов, обладают небольшой мощностью с грубой структурой и нижней границей, имеющей языковатую форму. Наименьшая доля бактерий была обнаружена в солончаке гидроморфном. Особенностью этого типа почв является бли-

зость к сильноминерализованным почвенно-грунтовым водам. Гидроморфные солончаки ассоциированы с периферией болот, высоких пойменных террас и солёных озёр.

На основании вышеописанных данных была построена гистограмма, которая отражает распределение доли бацилл от общего числа микроорганизмов в исследованных почвенных образцах (рис. 1). Имеющиеся образцы были разделены на несколько отдельных групп наиболее схожих типов почв.

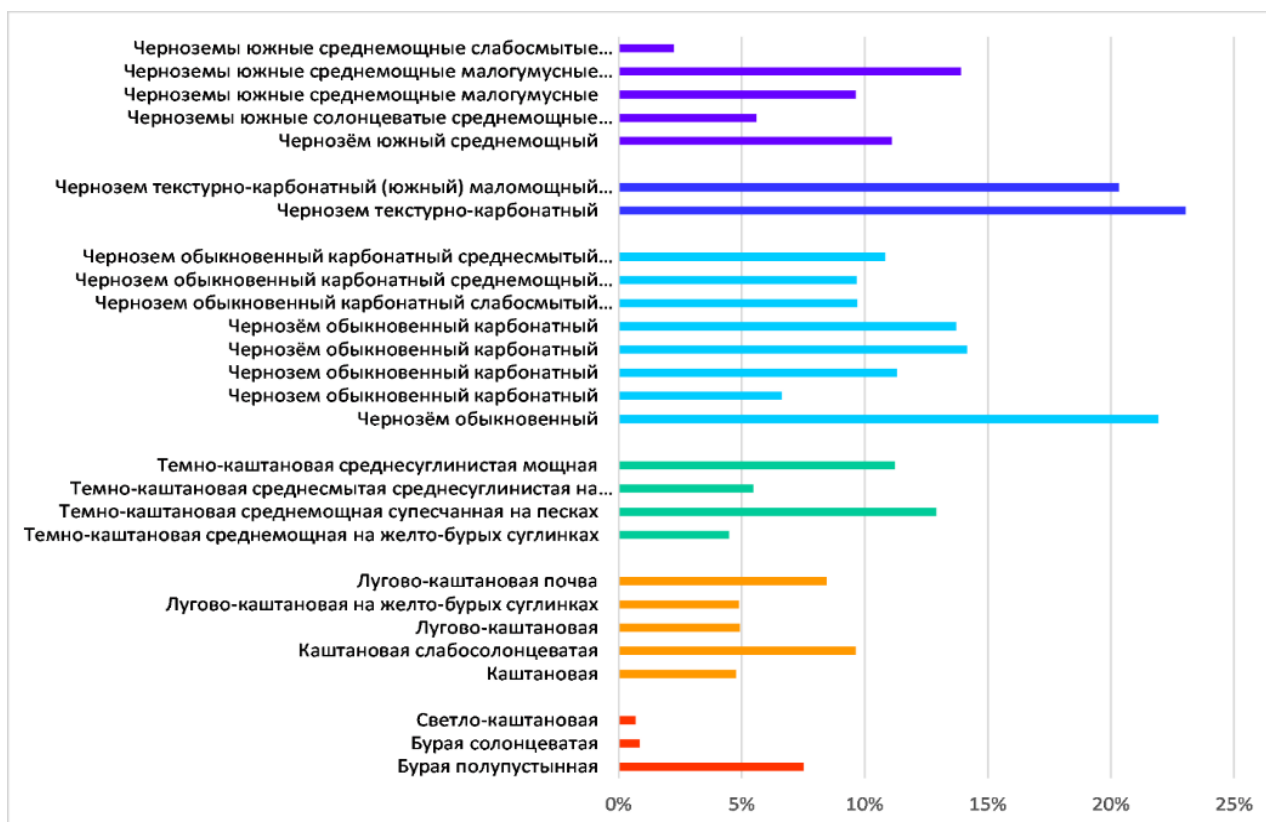


Рис. 1. Распределение доли бацилл от общего числа микроорганизмов в образцах различных почвенных рядов

На рис. 1 представлены различные почвенные ряды, относящиеся к климатическим зонам от северо-западной и юго-западной до юго-восточной части Ростовской области. Основываясь на полученных данных, можно отметить, что наибольшей численности аэробные спорообразующие бактерии достигли в чернозёмах текстурно-карбонатных (23%) и чернозёмах обыкновенных (22%). Данные типы почв распространены в северо-западной и юго-западной частях Ростовской области, которые характеризуются стабильными экосистемами и, как следствие, высоким уровнем развития бациллярных сообществ. Наименьшая численность бацилл наблюдается в светло-каштановой (1%) и бурой солонцеватой почвах (1%), что территориально соответствует юго-восточной части Ростовской области. Однако в образце с бурой солонцеватой почвой, которая входит в ряд солонцевых почв, наблюдается небольшой скачок доли аэробных спорообразующих бактерий (8%).

Далее была построена гистограмма, которая иллюстрирует общую тенденцию увеличения численности КОЕ бацилл в образцах, территориально расположенных от степной зоны обыкновенных и южных чернозёмов до сухостепной зоны темно-каштановых и каштановых почв, а также светло-каштановых и бурых почв полупустыни (рис. 2).

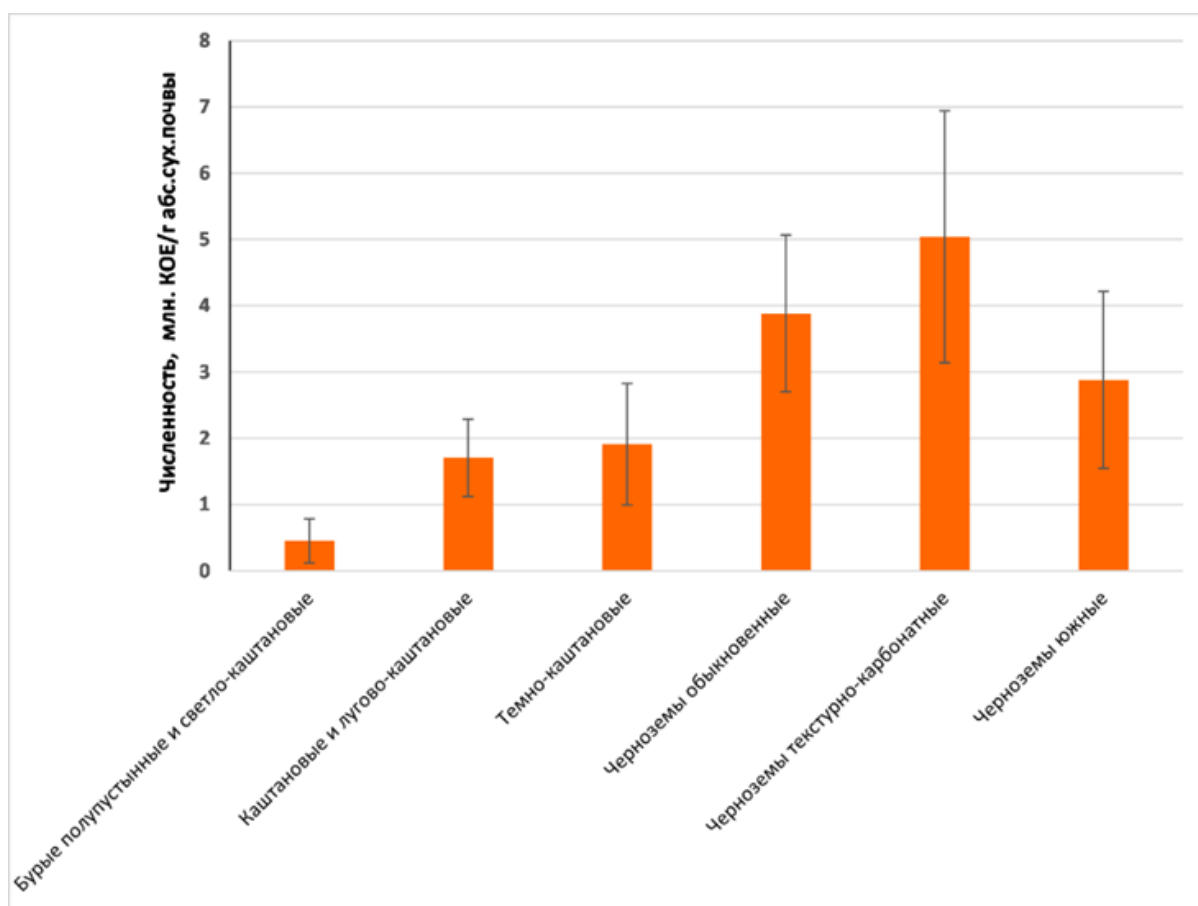


Рис. 2. Распределение численности аэробных спорообразующих бактерий в образцах различных почвенных рядов

При движении с юго-востока на запад региона, численность бацилл равномерно возрастает, начиная от бурых полупустынных и светло-каштановых почв, достигает своего пика в чернозёмах текстурно-карбонатных, а затем снижается в чернозёмах южных.

Исходя из вышеописанных данных были сделаны следующие выводы:

1. Численность КОЕ (млн/г абсолютно сухой почвы) аэробных спорообразующих бактерий в почвах ООПТ Ростовской области составила от $6,9 \pm 0,1$ в чернозёмах обыкновенных карбонатных до $0,1 \pm 0,01$ в солончаках гидроморфных.
2. Доля аэробных спорообразующих бактерий от общего числа почвенных микроорганизмов в почвах ООПТ Ростовской области составила от 23,03% в чернозёмах текстурно-карбонатных среднесиловых на красно-бурых глинах, до 0,04% в солончаках гидроморфных.
3. Наблюдалось возрастание численности КОЕ (млн/г абсолютно сухой почвы) аэробных спорообразующих бактерий от бурых полупустынных почв до чернозёмов текстурно-карбонатных, с последующим снижением в чернозёмах южных. По вышеописанному критерию исследуемые почвы формируют следующий ряд: чернозёмы текстурно-карбонатные > чернозёмы обыкновенные > чернозёмы южные > тёмно-каштановые почвы > каштановые и лугово-каштановые почвы > бурые полупустынные и светло-каштановые почвы. Данная тенденция коррелировала территориальным расположением исследуемых почв от степной зоны до сухостепной зоны и зоны полупустынь.

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. Жизнь растений. под ред. Н.А. Красильникова и. А.А. Уранова в 6 тт. – М.: Просвещение – Т.1.: Введение. Бактерии и актиномицеты, 1974. – 547 с.
2. Прудникова С.В., Афанасова Е.Н., Сарматова Н.И. Микробиология: Учебно-методическое пособие для лабораторного практикума. – Красноярск: СФУ, 2017. – 113 с.
3. Freese E., Klofat W., Galliers E. Commitment to sporulation and induction of glucose-phosphoenolpyruvate-transferase // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1970. – No. 222. – P. 265–289.
4. Leighton T.J., Doi R.H. The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis* // *J. Biol. Chem.* – 1971. – No. 246. – P. 3189–3195.
5. Сидоренко М.Л., Русакова Д.А. Разнообразие психрофильных бактерий и их биотехнологический потенциал (обзор) // *Вестн. Том. гос. ун-та. Биология.* – 2022. – №58 – С. 28–54.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТРАБОТАННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА В КАЧЕСТВЕ АЛЬТЕРНАТИВНОГО УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА ДЛЯ РОСТА АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS*

Мясникова М.А.¹, Куюкина М.С.^{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. С целью увеличения выхода биомассы биотехнологически перспективного штамма *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 изучена возможность оптимизации питательной среды на основе отработанного растительного масла (ОМР). По результатам многофакторного анализа, оптимальным соотношением компонентов среды являются 3,0 об.% ОМР, 0,25 вес.% сахарозы и 0,1 и 0,2 г/л $\text{NH}_4\text{-NO}_3$ -содержащих солей соответственно. Проанализированы морфологические изменения бактериальной культуры в зависимости от состава питательной среды.

Ключевые слова: *Rhodococcus*, отработанное растительное масло, многофакторный анализ, морфологические изменения

USED WASTE COOKING OIL AS AN ALTERNATIVE CARBON SUBSTRATE FOR THE GROWTH OF *RHODOCOCCLUS* ACTINOBACTERIA

Myasnicova M.A.¹, Kuyukina M.S.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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. In order to increase the biomass yield of a promising biotechnological strain *Rhodococcus ruber* IEGM 231, the possibility of optimizing the growth medium based on waste cooking oil was studied. According to the results of multivariate analysis, the optimal ratio of the components of the medium is 3.0 vol.% waste cooking oil, 0.25 wt.% sucrose and 0.1 and 0.2 g/l of NH_4NO_3 -containing salts, respectively. Morphological changes of bacterial culture depending on the composition of the nutrient medium are analyzed.

Keywords: *Rhodococcus*, waste cooking oil, multivariate analysis, morphological changes

В настоящее время в мире идет интенсивный поиск альтернативных возобновляемых и относительно дешевых источников сырья для промышленного культивирования биотехнологически значимых микроорганизмов [1,2]. С этой целью перспективно использовать масло- и жиросодержащие отходы, например, отработанное растительное масло (ОМР), которое относится к 4 классу опасности и подлежит утилизации [3]. ОМР применяется в производстве биодизельного топлива, глицерина, пластификаторов технических смазок и пр. Однако его использование в качестве питательного субстрата для микроорганизмов ограничено из-за присутствия в ОМР токсичных продуктов термического окисления липидов, ингибирующих их рост [4].

Актинобактерии рода *Rhodococcus* являются биотехнологически перспективной группой бактерий, они хорошо растут на гидрофобных субстратах и устойчивы к органическим загрязнителям и токсикантам. Цель работы – исследование возможности оптимизации питательной среды для культивирования родококков на основе ОМР с использованием многофакторного анализа.

В работе использовали штамм *Rhodococcus ruber* ИЭГМ 231 из Региональной профилированной коллекции алканотрофных микроорганизмов (акроним ИЭГМ; WFCC/WDCM #768; www.iegmc.ru). Культивирование бактерий осуществляли в жидкой среде RS [5] при изменении соотношения $\text{NH}_4\text{-NO}_3$ -содержащих солей (KNO_3 / $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), при разной концентрации ОМР 2,0; 3,0 и 5,0 об.% и сахарозы 0,1; 0,25 и 0,5 вес.%, в колбах Эрленмейера объемом 250 мл на орбитальном шейкере при 28°C, в течение 72 ч. Количество продуцируемой биомассы определяли по высоте гидрофобного эмульсионного слоя культуры. Данные анализировали с помощью однофакторного и многофакторного анализа в программе STATISTICA.

В ходе эксперимента были зарегистрированы различия в характере роста родококков при различном соотношении питательных элементов в среде культивирования. При этом четко выделялись три морфологические группы (рис. 1) – аморфная, стандартная хлопьеобразная и глобулярная структуры.

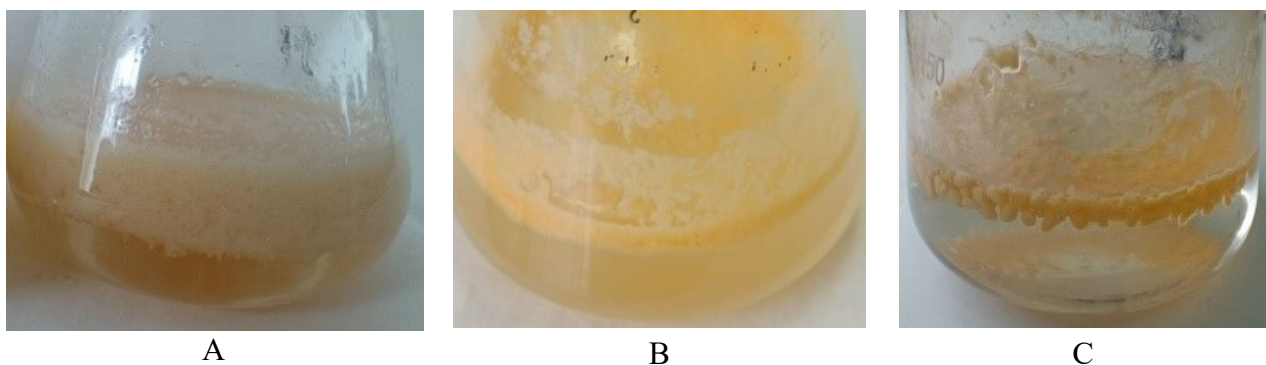


Рис. 1. Морфология культур: А – аморфная слизистая; В – хлопьеобразная; С – глобулярная

При этом основной морфологической формой культуры была хлопьеобразная (рис. 1Б), зарегистрированная в большинстве вариантов опыта (табл. 1). Предположительно, аморфный характер бактериального роста (рис. 1А) был вызван неполной ассимиляцией масла при его высокой (5,0 об.%) концентрации. Глобулы размером 1-3 мм (рис. 1С) встречались в основном при выращивании клеток в присутствии 2,0 об.% масла, но также отмечались при культивировании на 3,0 об.% ОМР в зависимости от соотношения сахара и азотсодержащих солей в питательной среде. Плотные глобулы разного диаметра были ранее описаны для родококков при росте в неблагоприятных условиях [6].

Помимо различных морфологических структур, были выявлены различия в интенсивности окрашивания культуры (см. табл. 1). Стоит отметить, что глобулярная фракция биомассы во всех вариантах опыта была окрашена в ярко-оранжевый цвет, что типично для представителей данного вида родококков, в то время как хлопьеобразная и аморфная фракции биомассы характеризовались как плеснево-телесной, так и ярко-оранжевой окраской.

Таблица 1 – Морфологическое описание культур *R. ruber* ИЭГМ 231
при росте на разных средах

Количество сахара, вес. %/ Концентрация солей азота г/л	Концентрация масла, об. %								
	2,0			3,0			5,0		
0,1 / 0,1 и 0,2	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++
0,1 / 0,5 и 1,0	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+
0,1 / 1,0 и 2,0	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+
0,25 / 0,1 и 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	++
0,25 / 0,5 и 1,0	+++	+++	+++	+	+	+++	+	+	+
0,25 / 1,0 и 2,0	+++	++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++
0,5 / 0,1 и 0,2	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
0,5 / 0,5 и 1,0	+++	+++	+++	+++	+	++	+++	+	+
0,5 / 1,0 и 2,0	+++	++	+++	+++	++	+++	+	+	+

Примечание: «+ / ++ / +++» – интенсивность окрашивания культуры; тёмно-серый цвет – глобулярный характер роста, серый – хлопьеобразный, белый – аморфный.

Анализ интенсивности накопления биомассы, оцениваемой по высоте эмульсионного слоя культуры, показал, что при использовании ОРМ в качестве источника углерода рост культуры превышал таковой при культивировании родококков в присутствии модельного субстрата – *n*-гексадекана (табл. 2). Следует отметить, что при росте родококков в виде аморфной массы высота эмульсионного слоя была в 3-4 раза выше (до 15,5 мм) по сравнению со стандартным хлопьеобразным ростом.

Таблица 2 – Интенсивность роста клеток *R. ruber* ИЭГМ 231 (высота эмульсионного слоя культуры, мм) в зависимости от параметров среды культивирования

Количество сахара, вес. %/ Концентрация солей, г/л	Концентрация масла, об. %		
	2,0	3,0	5,0
0,1 / 0,1 и 0,2	4,50±0,57	6,50±3,44	6,67±5,23
0,1 / 0,5 и 1,0	4,00±1,96	2,67±0,86	6,43±5,86
0,1 / 1,0 и 2,0	2,67±1,18	4,13±0,53	10,90±8,72
0,25 / 0,1 и 0,2	4,43±0,58	7,07±6,38	12,77±0,77
0,25 / 0,5 и 1,0	3,60±1,09	8,77±6,18	13,43±1,59
0,25 / 1,0 и 2,0	2,33±0,40	5,33±5,56	2,77±1,22
0,5 / 0,1 и 0,2	3,73±0,28	5,52±5,08	7,33±3,38
0,5 / 0,5 и 1,0	3,60±1,09	6,28±5,52	6,43±6,07
0,5 / 1,0 и 2,0	2,82±0,81	3,73±0,52	11,43±8,23

По нашим данным (табл. 2 и рис. 2), количество продуцируемой биомассы родококков было прямо-пропорционально концентрации ОРМ (выявлена сильная корреляция, равная 0,94). Другие два фактора – концентрация $\text{NH}_4\text{-NO}_3$ -содержащих солей и сахара также значимо влияли на рост культуры *R. ruber* ИЭГМ 231. Так при изменении концентрации солей KNO_3 и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ в составе минеральной среды отмечалась обратно пропорциональная зави-

симось -0,74. Повышенное (0,5 вес.%) содержание сахарозы в среде ингибировало рост культуры по сравнению с более низкой (0,25 вес.%) концентрацией сахара.

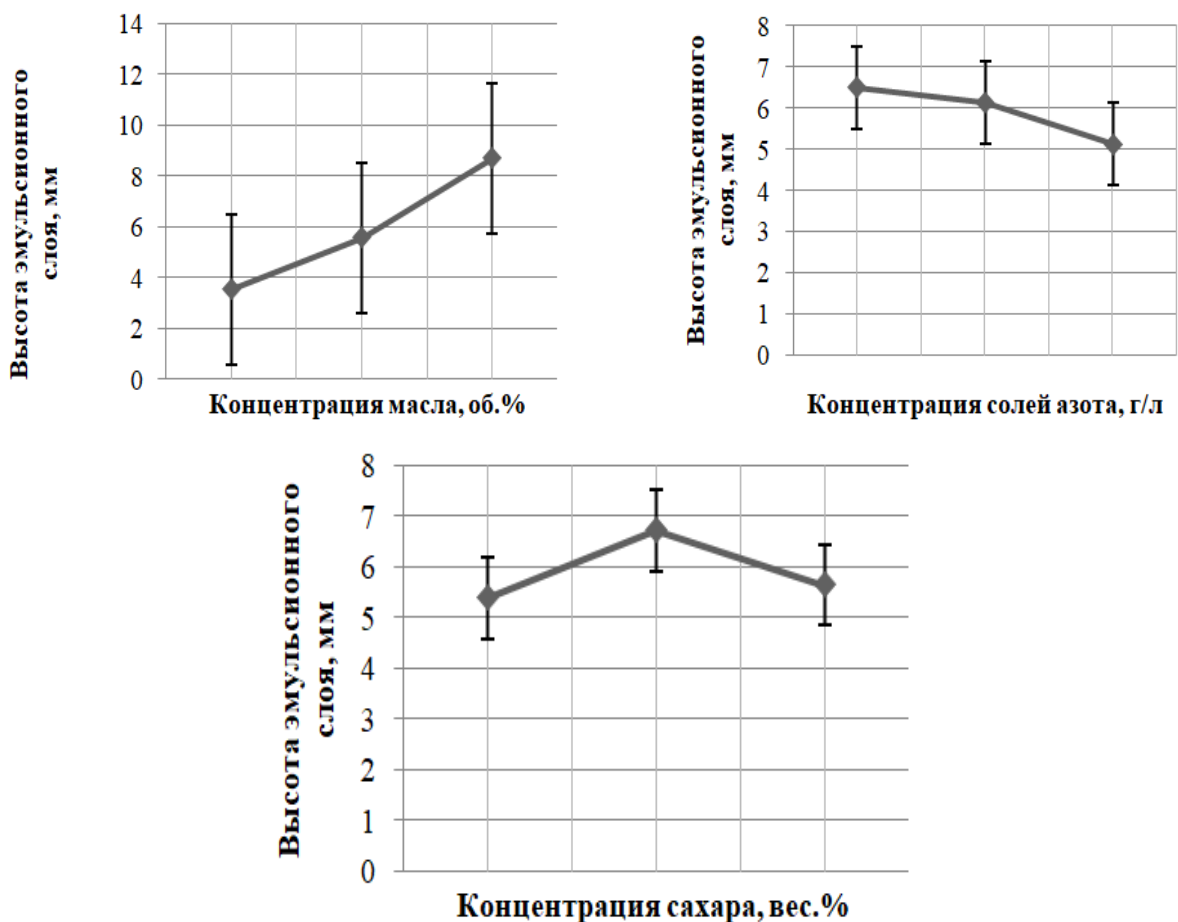


Рис. 2. Графики зависимости высоты эмульсионного слоя культуры *R. ruber* ИЭГМ 231 от варьирующих факторов (концентрации масла, сахарозы и солей азота)

С целью детального изучения корреляционной связи между компонентами среды культивирования и выходом биомассы родококков проведен многофакторный анализ полученных данных. Для этого была произведена стандартизация условий эксперимента по следующему принципу: выделен центральный параметр (обозначен как 0) и два пограничных (+1 и -1), и все условия были проиндексированы. С использованием стандартизованных параметров была построена диаграмма Парето (рис. 3), на которой показаны абсолютные значения стандартизованных эффектов – от наибольшего до наименьшего, нанесена контрольная линия, указывающая, какие эффекты являются статистически значимыми при уровне достоверности $P < 0,05$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее статистически значимым фактором при проведении двухуровневого стандартного многофакторного анализа является концентрация ОРМ, так как при текущих условиях модели значения данного фактора пересекают опорную линию.

По графикам поверхности (подгонка отклика), представленным на рис. 4, были установлены оптимальные значения всех трех факторов, которые определяли по характерным цветовым меткам. Установленные оптимальные значения компонентов питательной среды – это максимальная концентрация масла (5,0 об.%) и минимальная концентрация $\text{NH}_4\text{-NO}_3$ -

содержащих солей (0,1 и 0,2 г/л), при этом количество сахара не имело статистически значимого значения.

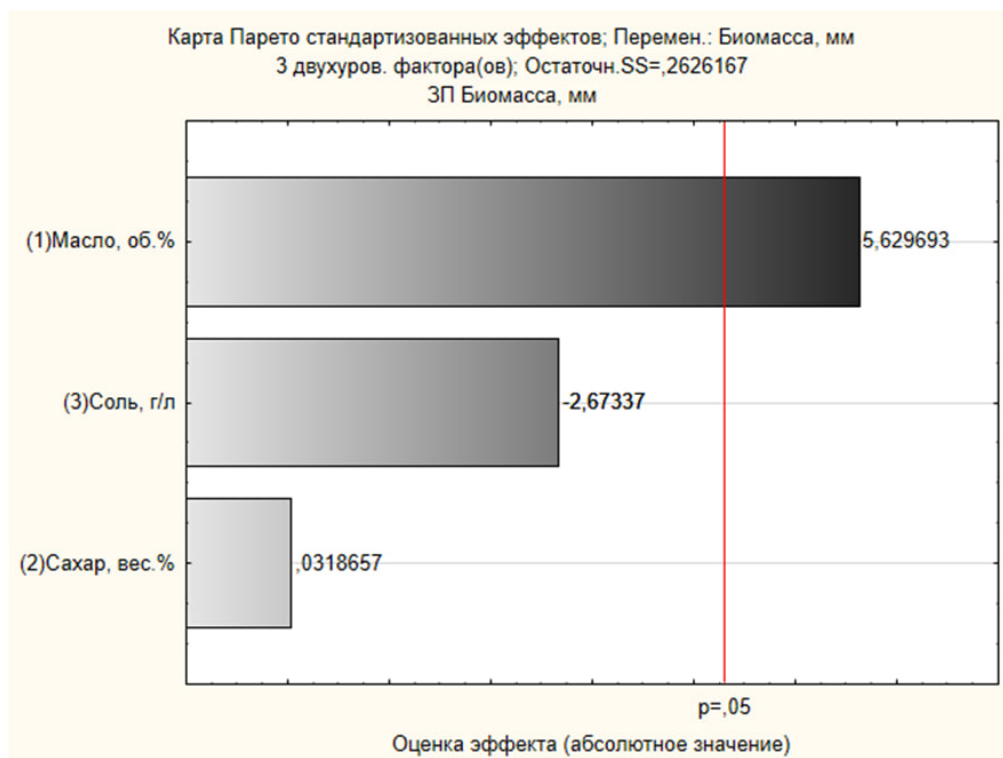


Рис. 3. Диаграмма Парето зависимости роста культуры от соотношения компонентов среды.

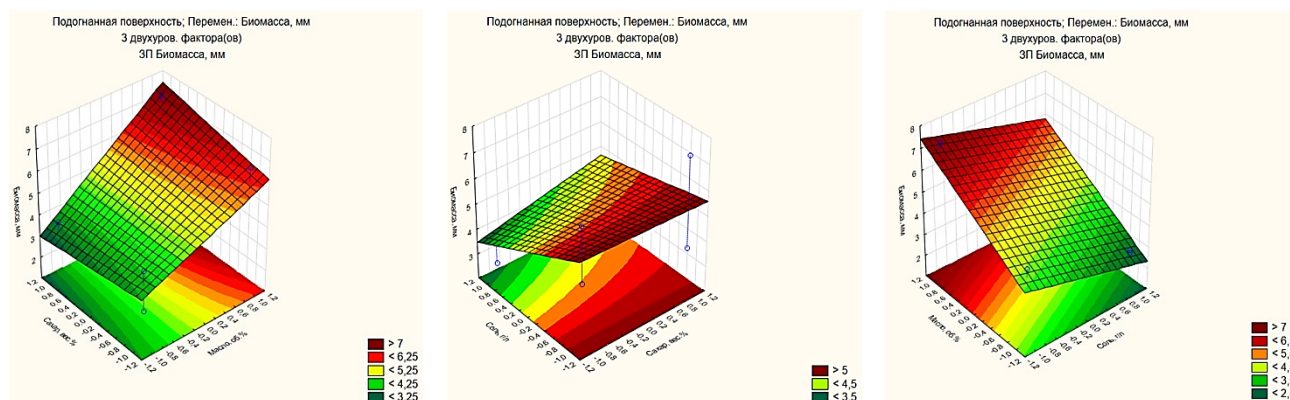


Рис. 4. Графики поверхности (подгонка отклика)

Таким образом, установленное в результате комплексного (однофакторного и многофакторного) статистического анализа оптимальное соотношение параметров среды культивирования для получения максимального прироста биомассы родококков выглядит следующим образом: ОРМ : сахар : соли азота (0 : 0 : -1), что соответствует концентрациям данных компонентов 3,0 об.%, 0,25 вес.%, 0,1 и 0,2 г/л.

Работа выполнена в рамках госзаданий 123041400034-2, AAAA-A20-120081990069-3 и поддержана грантом РФФИ 20-44-596001p_НОЦ_Пермский край.

Библиографический список

1. Yaguchi A., Spagnuolo M., Blenner M. Engineering yeast for utilization of alternative feedstocks // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2018. – V. 53. – P. 122–129.
2. Helmy Q., Kardenia E., Funamizu N., Wisjnuprpto. Strategies toward commercial scale of biosurfactant production as potential substitute for it'schemically counterparts // *International Journal of Biotechnology*. – 2011. – V. 12. – P. 66–86.
3. Sanches M.A., Luzeiro I.G., Cortez A.C.A., de Souza E.S., Albuquerque P.M., Chopra H.K., de Souza J.V.B. Production of biosurfactants by ascomycetes // *International Journal of Microbiology*. – 2021. – V. 2021. Article 6669263.
4. Kim J.H., Oh Y.R., Hwang, J., Kang J., Kim. H., Jang Y.A., Lee S.S., Hwang S.Y., Park J., Eom G.T. Valorization of waste- cooking oil into sophorolipids and application of their methyl hydroxyl branched fatty acid derivatives to produce engineering bioplastics // *Waste Management*. – 2021. – V. 124. – P. 195–202.
5. Catalogue of strains of Regional Specialized Collection of Alkanotrophic Microorganisms [www.iegm.ru/iegmcol]. Доступ: 26.09.2023.
6. 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. Атлас-монография / под ред. И.Б. Ившиной. УрО РАН. – 2021. – 140 с.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛЯЦИИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ КОРО-ДРЕВЕСНЫХ ОТВАЛОВ

Плетнева С.К.¹, Самойлова З.Ю.², Смирнова Г.В.², Октябрьский О.Н.²

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

Аннотация. Приводятся результаты измерения биопленкообразования бактерий *Escherichia coli* в присутствии экстрактов, полученных из коро-древесных отходов ОАО «Сыктывкарский ЛДК».

Ключевые слова: коро-древесные отходы, фенольные соединения, биопленки

THE STUDY OF MODULATING EFFECTS OF THE EXTRACTS FROM INDUSTRIAL CORK WASTES ON BIOFILM FORMATION IN *ESCHERICHIA COLI*

Pletneva S.K.¹, Samoilova Z.Y.², Smirnova G.V.², Oktyabrsky O.N.²

¹ Perm National Research Polytechnical University, Perm, Russia

² 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. Ability of the extracts from cork bump OJSC “Syktyvkarsky sawmill company” to modulate biofilm formation in *Escherichia coli*.

Keywords: plant phenolics, cork by-products, bacterial biofilms

Одной из актуальных экологических проблем в нашей стране является утилизация отходов целлюлозно-бумажной и лесоперерабатывающей промышленности [1,2], перспективным решением которой можно считать развитие различных направлений биорефайнинга – глубокой переработки древесины с превращением ее основных компонентов в товарные продукты с высокой добавленной стоимостью. Следует особо отметить, что отходы целлюлозно-бумажной промышленности содержат не только лигнин, гемицеллюлозу и целлюлозу, но также и низкомолекулярные фенольные соединения кверцетин, танины, галловую кислоту и др., представляющие собой перспективное сырье для пищевой и фармацевтической промышленности благодаря своим антиоксидантным, антимикробным, противовоспалительным и противоопухолевым свойствам [3].

Наш коллектив в течение многих лет использует набор бактериальных штаммов *Escherichia coli* в сочетании с современными физико-химическими методами анализа в качестве удобных и достаточно информативных тест-систем для оценивания влияния субстратов растительного происхождения на живые клетки и выявления механизмов, лежащих в основе

наблюдаемых эффектов. Ранее нами была проведена комплексная оценка биологической активности трех экстрактов коро-древесных отвалов, предоставленных сотрудниками Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Экстракты получали по методике [4] из отвалов коро-древесных остатков, взятых на разной глубине короотвала ОАО «Сыктывкарский ЛДК». У данных экстрактов нами было выявлено относительно высокое содержание фенольных соединений, а также противомикробные свойства, выражавшиеся в подавлении удельной скорости роста жидких бактериальных культур *Escherichia coli*.

Целью данной работы явилось изучение способности указанных экстрактов модулировать биопленкообразование бактерий *E. coli* BW25113. Культивирование проводили в 96-луночных полистироловых планшетах со средой М9 с добавлением 4 г/л глюкозы при температуре 37°C. Действующие дозы составили 0.015 и 0.03 мг/мл экстрактов, 10 и 100 мкг/мл для флавоноида кверцетина и аналога витамина Е, модельного антиоксиданта тролокса, которые использовали в качестве чистых эталонных образцов. Поскольку испытуемые вещества и экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), то дополнительным контролем служили также лунки, обработанные только ДМСО. Изменения оптической плотности оценивали с помощью планшетного спектрофотометра xMark™ (Bio-Rad, США) через 22 часа инкубации. Интенсивность биопленкообразования оценивали с помощью окрашивания генцианвиолетом по методике [5,6]. 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 $p < 0,05$.

На рис. 1 можно видеть, что при культивировании на планшетах добавление экстракта 2 приводило к дозозависимому снижению оптической плотности планктонных культур при 600 нм (OD 600) почти на 20% через 22 ч инкубации.

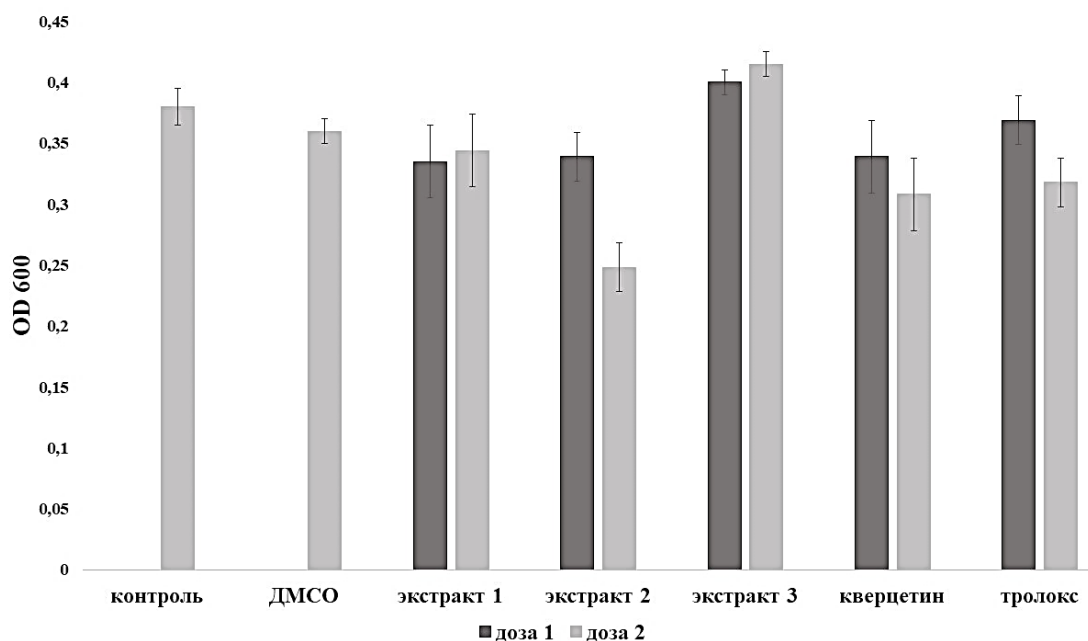


Рис. 1. Влияние испытуемых веществ на оптическую плотность бактериальных культур (показатель OD 600). Для испытуемых веществ доза 1 составила 0.015 мг/мл для экстрактов, 10 мкг/мл – для кверцетина и тролокса; доза 2 – 0.03 мг/мл и 100 мкг/мл, соответственно

Для оценки интенсивности образования биопленок в присутствии испытуемых веществ использовали показатель удельного биопленкообразования, которой представляет собой валовое биопленкообразование, отнесенное к плотности бактериальной культуры через 22 часа инкубации. На рис. 2 показано, что даже малые дозы экстрактов (0.015 мг/мл) стимулировали удельное биопленкообразование в 1.3–2 раза по сравнению с контрольными культурами. А с повышением дозы экстрактов удельное биопленкообразование дополнительно возрастало в 1.3–1.5 раза. Аналогичный характер модуляции биопленкообразования ранее нами был выявлен у галловой кислоты, обладающей прооксидантным действием [7]. В наших условиях кверцетин и тролокс стимулировали удельное биопленкообразование в 1.3–2.0 раза. При этом кверцетин не оказывал влияния на показатель оптической плотности, однако дозозависимо стимулировал валовое биопленкообразование (не показано). Редокс-активный агент тролокс дозозависимо снижал показатель OD 600 (рис. 1), при этом стимулировал также валовое и удельное (рис. 2) биопленкообразование.

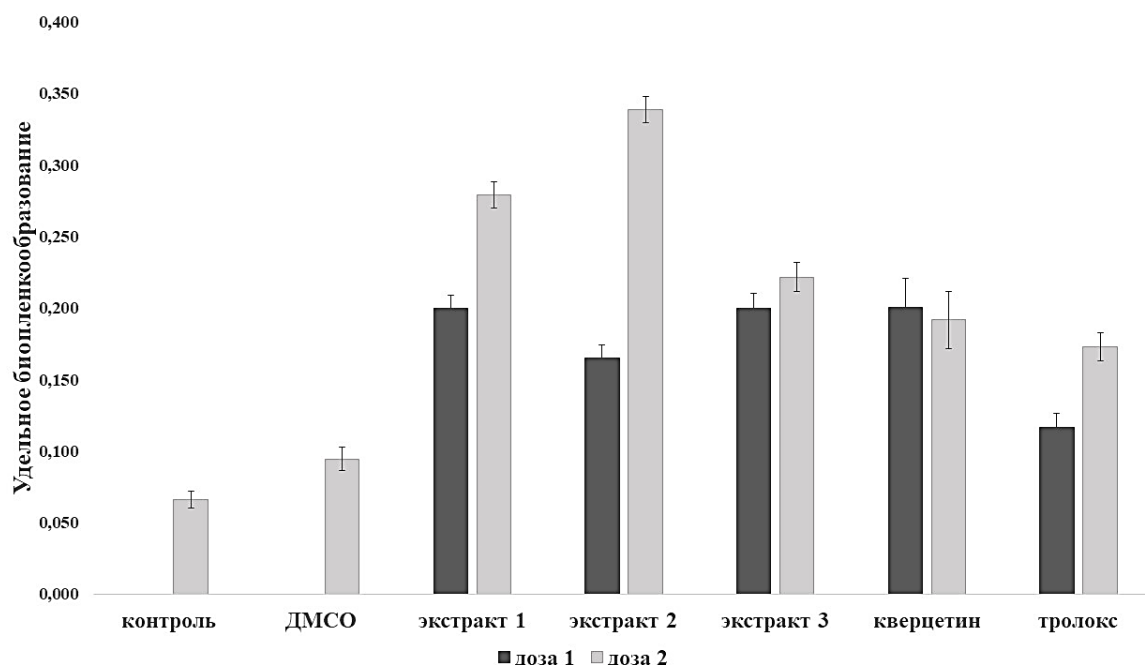


Рис. 2. Влияние испытуемых веществ на удельное биопленкообразование. Для испытуемых веществ доза 1 составила 0.015 мг/мл для экстрактов, 10 μ M – для кверцетина и тролокса; доза 2 – 0.03 мг/мл и 100 μ M, соответственно.

Испытуемые этилацетатные экстракты могут содержать фенольные соединения (протокатеховая, ванилиновая, *цис*- и *транс*-*n*-кумаровые кислоты дигидрокверцетин) в диапазоне 45–64% сухой массы экстрактов [4]. Эти низкомолекулярные фенольные соединения обладают высокой редокс-активностью, способностью снижать скорость роста бактериальных культур, стимулируя биопленкообразование [7]. Общее содержание полифенолов в испытуемых экстрактах проводили согласно спектрофотометрическому методу [8]. На рис. 3 можно видеть, что содержание полифенолов в испытуемых экстрактах варьировало от 46 до 74 мг-экв галловой кислоты/г сухого экстракта.

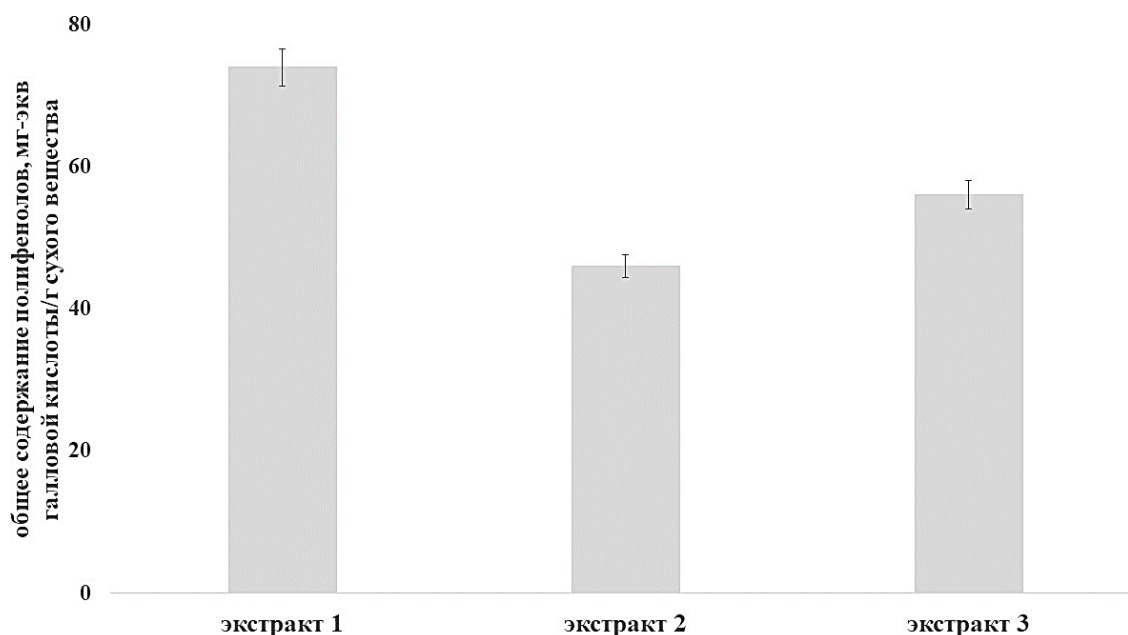


Рис. 3. Общее содержание полифенолов в испытуемых экстрактах

Наблюдаемый характер модуляции показателя OD 600 в присутствии экстракта 2 указывает на его потенциальные противомикробные свойства в отношении планктонных культур. В целом, полученные данные открывают перспективы разработки субстанций для использования их в медицине, животноводстве и других отраслях народного хозяйства. Однако обнаруженные стимулирующие эффекты на удельное биоуплотнение следует рассматривать как адаптивный ответ бактериальных клеток на добавление экстрактов, содержащих фенольные соединения. Поэтому при оценке биологической активности подобных экстрактов следует учитывать их способность «переключать» метаболизм бактериальных клеток от планктонных форм до формирования биопленок как стратегию выживания в неблагоприятных, стрессовых условиях. Особо тщательно в этом случае необходимо оценивать выживаемость бактериальных культур, обработанных экстрактами. Для получения полной картины механизмов влияния экстрактов коры-древесных отходов требуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена в соответствии с госзаданием АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Santos S.A.O., Villaverde J.J., Sousa A.F., Coelho J.F.J., Neto C.P., Silvestre A.J.D. Phenolic composition and antioxidant activity of industrial cork by-products // *Industrial Crops and Products*. – 2013. – V.47 – P. 262–269.
2. Володин В.В., Шубаков А.А., Володина С.О., Шергина Н.Н., Василов Р.Г. Тенденции в развитии методов утилизации коры и кородревесных отходов длительного хранения (обзор) // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. – 2022. – Т. 23. – № 5. – С. 611–632.
3. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships // *J Nutr Biochem*. – 2002. – V. 13. – P. 572–584.

4. Уфимцев К.Г., Бешлей И.В., Ширшова Т.И. Содержание экстрактивных веществ в продуктах деструкции кородревесных отходов, образующихся при длительном хранении, с учетом высотного градиента // Теоретическая и прикладная экология. – 2022. – № 4. – С. 132–138.
5. 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.
6. 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.
7. Samoilova Z., Tyulenev A., Muzyka N., Smirnova G., Oktyabrsky O. Tannic and gallic acids alter redox-parameters of the medium and modulate biofilm formation // AIMS Microbiol. – 2019. – V. 5. – № 4. – P. 379–392.
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.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ТЕРМОРАСШИРЕННОМ ГРАФИТЕ

Протасова Е.М.¹, Максимова Ю.Г.^{1,2}

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

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Клетки бактерий штаммов *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *Alcaligenes faecalis* 2 были иммобилизованы путем адгезии и получением биопленок на поверхности терморасширенного графита. Наибольшее количество акриловой кислоты было получено при многоцикловой трансформации акриламида биокатализатором на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2.

Ключевые слова: иммобилизация, биокатализатор, терморасширенный графит, биосенсор

IMMOBILIZATION OF BACTERIAL CELLS ON THERMALLY EXPANDED GRAPHITE

Protasova E.M.¹, Maksimova Yu.G.^{1,2}

¹ 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

² Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Bacterial cells of the strains *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 and *Alcaligenes faecalis* 2 were immobilized by adhesion and the formation of biofilms on the surface of thermally expanded graphite. The highest amount of acrylic acid was obtained from the multi-cycle transformation of acrylamide with a biocatalyst based on *R. erythropolis* 11-2 biofilms.

Keywords: immobilization, biocatalyst, thermally expanded graphite, biosensor

Иммобилизация – общий термин, описывающий различные способы прикрепления или захвата клеток, ферментов или частиц в пространстве [1]. В настоящее время иммобилизация каталитически активных клеток бактерий находит свое применение в ферментативном синтезе для получения разнообразных соединений, биodeградации, очистке сточных вод, создании биопрепаратов и сенсорных технологиях [1,2,3].

Процесс иммобилизации включает в себя подбор носителя и метода с подходящими биокатализаторами. Материал носителя должен обладать большой удельной поверхностью по отношению к клеткам, высокой механической прочностью и химической стабильностью, а также легко отделяться от реакционной среды, обеспечивать сохранение жизнеспособности клеток, не загрязнять окружающую среду и иметь низкую стоимость [4,5].

Для иммобилизации микроорганизмов используются различные поддерживающие материалы, например, органические (альгинат, агароза, хитозан, каррагинан, полиакриламиды,

полиуретаны и др.) и неорганические (активированный уголь, глина, керамика, макропористое стекло, графит и др.) [2,5].

Микробные клетки могут быть включены внутрь носителя или зафиксированы на его поверхности [6,7]. Это позволяет стабилизировать их ферментативную активность, повысить устойчивость к токсичным субстратам, продлить использование биокатализатора и увеличить выход конечного продукта [4,5].

Использование иммобилизованных клеток в составе такого аналитического устройства, как биосенсор, оказывается ценным методом для качественного и количественного анализа различных соединений в биомедицине, окружающей среде, контроле качества пищевых продуктов, сельском хозяйстве и фармацевтике [8].

Помимо основных способов клеточной иммобилизации, микробные сенсоры могут быть созданы на основе бактериальных биопленок, являющихся самоиммобилизованными сообществами. Как клетки, так и биопленки могут быть использованы в качестве биоселектирующего элемента биосенсора, благодаря селективности, надежности, возможности повторного использования и легкой интеграции в портативные устройства [4,7,9,10]. Одним из материалов, который может использоваться в микробных биосенсорах, является терморасширенный графит (ТРГ), обладающий высокой электропроводностью, большой удельной поверхностью, химической стойкостью и биосовместимостью, способностью принимать различные формы, что важно для конструирования электродов [11,12,13]. Значительный интерес представляет оценка возможности применения терморасширенного графита для иммобилизации микробных клеток и создания биокатализаторов для сенсорных систем, поскольку неорганические материалы являются термостабильными и устойчивыми к микробной деградации.

Цель исследования – изучение влияния иммобилизации клеток бактерий в процессе выращивания на терморасширенном графите на амидазную активность и операционную стабильность иммобилизованного биокатализатора.

Материалы и методы. В работе были использованы амидазосодержащие штаммы бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *Alcaligenes faecalis* 2. Для выращивания бактерий использовали безазотистую минеральную среду следующего состава (г/л): KH_2PO_4 – 1.0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7; NaCl – 0.5; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005; $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01, pH 7.2 ± 0.2 . В качестве источника углерода для родококков использовали глюкозу в концентрации 0.1%, а источником азота служили ацетонитрил в концентрации 0.05%, хлористый аммоний и ацетамид – 10 мМ и 2.5 мМ соответственно. Для алкалигенеса единственным источником углерода и азота был 0.1 М ацетамид. Культивирование проводили в минеральной среде в течение 5-7 дней на шейкере со скоростью вращения 120 об/мин при температуре 30°C. Биомассу концентрировали центрифугированием в течение 15 мин при 5000 g на центрифуге 5804 R («Eppendorf», Германия), отмывали однократно от среды культивирования стерильным хлоридом натрия в концентрации 0.9%, центрифугировали повторно, разводили в стерильном растворе хлорида натрия и использовали для иммобилизации.

Навеску 0.5 г графита автоклавировали в конических колбах объемом 200 мл в 100 мл минеральной среды 1 час при 1 атм. и 121°C. Асептически добавляли 1.5 мл полученной биомассы в среду с графитом и соответствующие источники углерода и азота. Культивировали в течение 7 дней на шейкере со скоростью вращения 120 об/мин при комнатной темпе-

ратуре. Выращенные биопленки отмывали однократно от среды культивирования 0.1 М калий-фосфатным буфером ($\text{pH } 7.2 \pm 0.2$) через бумажный фильтр (марки «белая лента» или «красная лента»).

Операционную стабильность биокатализаторов на основе иммобилизованных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 оценивали по количеству акриловой кислоты при последовательном проведении полной конверсии 100 мМ раствора акриламида, вносимого в каждом цикле в реакционную среду. Время полного цикла составляло 24 ч. Реакцию проводили в 20 мл 0.1 М калий-фосфатного буфера ($\text{pH } 7.2 \pm 0.2$) при комнатной температуре, останавливали, добавляя в 1 мл пробы 50 мкл концентрированной HCl, центрифугировали 10 мин при 13 000 об/мин и определяли концентрацию образовавшейся акриловой кислоты методом ВЭЖХ на хроматографе Infinity II JC 1260 (Agilent, Германия) с колонкой Synergi 4u Hydro-RP 80A (250×4.6 мм).

После проведения реакционного цикла биокатализаторы отфильтровывали через бумажный фильтр (марки «белая лента» или «красная лента»), отмывали 0.1 М калий-фосфатным буфером ($\text{pH } 7.2 \pm 0.2$) и использовали в следующем цикле. Статистическая обработка результатов выполнена с помощью пакета программ Microsoft Excel 2013. Результаты представлены как среднее значение не менее чем трех независимых экспериментов $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$, $n=3$).

Результаты и обсуждение. Нами была проведена иммобилизация клеток бактерий штаммов *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ двумя способами: адгезией из выращенной культуры и выращиванием биопленок на поверхности материала. Биокатализаторы, приготовленные на основе адгезированных клеток *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 оказались менее стабильными по сравнению с биопленками. После проведения 7 циклов трансформации субстрата количество акриловой кислоты значительно снизилось, что может быть связано с десорбцией клеток и их вымыванием из реакционной среды в результате многократного использования.

Определено количество образующейся акриловой кислоты при проведении последовательных циклов трансформации акриламида биокатализаторами на основе биопленок *R. erythropolis* 4-1, *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2. Установлено, что амидазная активность биопленок *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ сохранялась на протяжении 29 проведенных циклов, а *R. erythropolis* 4-1 – 5 циклов. Показано, что наибольшее количество акриловой кислоты наблюдается при трансформации акриламида биокатализатором на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2 на 0.5 г графита и составляет 100-120 мг (рис. 1) в отличие от *A. faecalis* 2 – 80-100 мг (рис. 2). Наименьшее количество кислоты (1–3 мг) продуцировали биопленки *R. erythropolis* 4-1 (рис. 3).

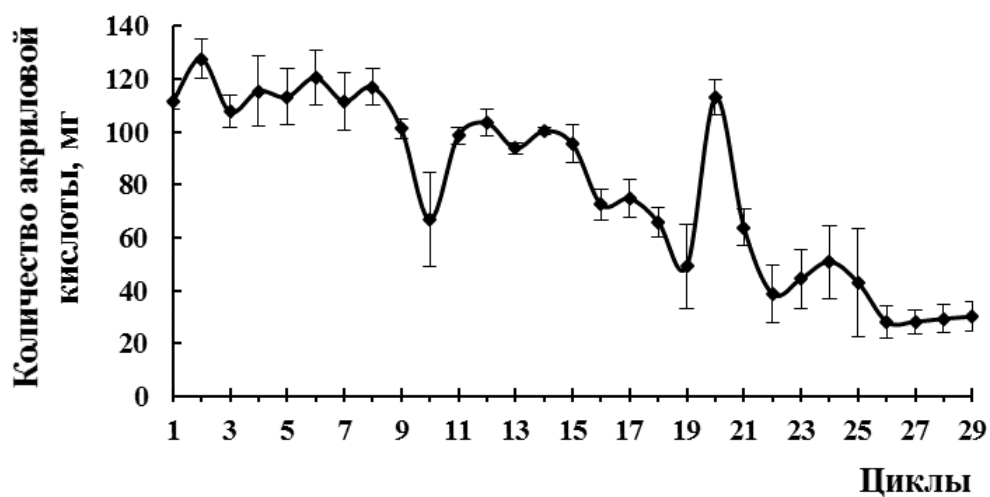


Рис. 1. Операционная стабильность биокатализатора на основе биопленок *R. erythropolis* 11-2, иммобилизованных на терморасширенном графите

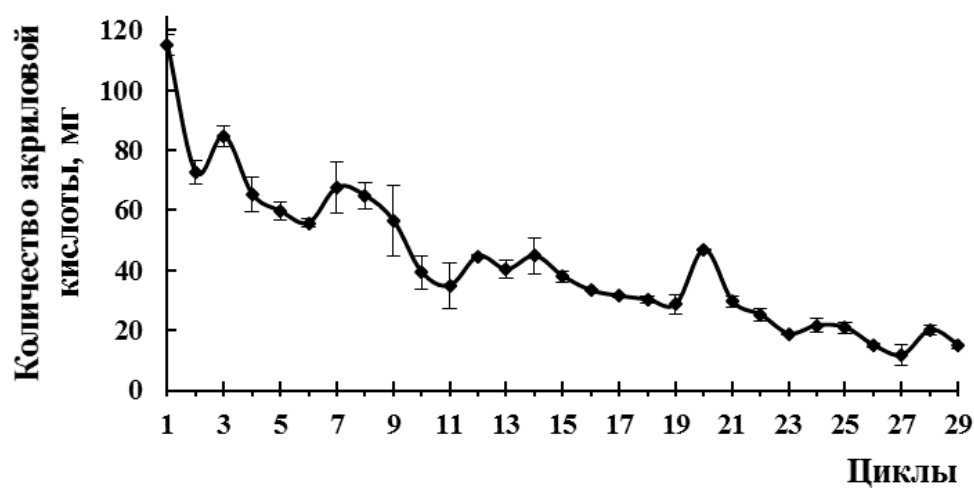


Рис. 2. Операционная стабильность биокатализатора на основе биопленок *A. faecalis* 2, иммобилизованных на терморасширенном графите

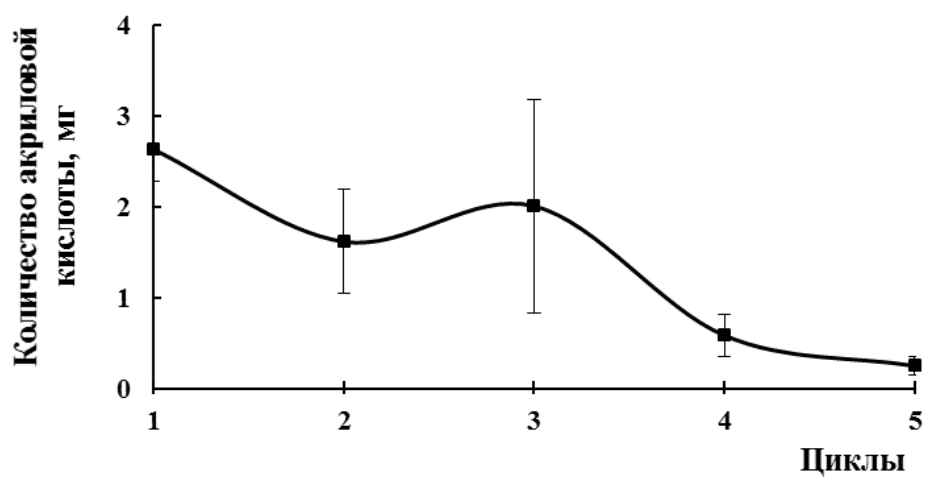


Рис. 3. Операционная стабильность биокатализатора на основе биопленок *R. erythropolis* 4-1, иммобилизованных на терморасширенном графите

Ранее нами была изучена иммобилизация на основе клеток *A. faecalis* 2 и *R. erythropolis* 4-1 с использованием термотропных и ионотропных гелей. Показано, что бактериальные клетки, включенные в структуру гелей агарозы и альгината бария, позволяют получить стабильный биокатализатор, который может быть основой биоселектирующего элемента биосенсора для определения акриламида [14].

Таким образом, полученные биопленки *R. erythropolis* 11-2 и *A. faecalis* 2 на ТРГ могут являться гетерогенными биокатализаторами и использоваться в качестве биологического элемента датчика, а также применяться для других биотехнологических целей. Адгезия относится к простому и дешевому способу клеточной иммобилизации, однако для этого метода характерно постепенное вымывание клеток при многократном использовании. Поэтому адсорбция может быть применима тогда, когда нет необходимости в длительной эксплуатации иммобилизованного биокатализатора и достаточно слабого прикрепления клеток к материалу носителя.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем», регистрационный номер НИОКТР 122010800029-1.

Библиографический список

1. Giese E.C., Silva D.D.V., Costa A.F.M., Almeida S.G.C., Dussán K.J. Immobilized microbial nanoparticles for biosorption // *Critical Reviews in Biotechnology*. – 2020. – V. 40. – № 5. – P. 653–666.
2. Martins S.C.S., Martins C.M., Fiúza L.M.C.G., Santaella S.T. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater // *African Journal of Biotechnology*. – 2013. – V. 12. – № 28. – P. 4412–4418.
3. Sjahrir F., Maniyam M.N., Ibrahim A.L., Cass A.E.G. Biotransformation of acrylonitrile using immobilized cells of *Rhodococcus* UKMP-5M as biocatalyst // *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 58–67.
4. Eş I., Vieira J.D.G., Amaral A.C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2015. – V. 99. – № 5. – P. 2065–2082.
5. Michelini E., Roda A. Staying alive: new perspectives on cell immobilization for biosensing purposes // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – № 5. – P. 1785–1797.
6. Гулий О.И., Симаков В.В., Караваева О.А., Смирнов А.В. Иммобилизация микробных клеток на полимерных матрицах, модифицированных плазменной обработкой // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2020. – Т. 56. – № 2. – С. 198–205.
7. Asal M., Özen Ö., Şahinler M., Baysal H.T., Polatoğlu, İ. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors // *Sensor Review*. – 2019. – V. 39. – № 3. – P. 377–386.
8. Nguyen H.H., Lee S.H., Lee U.J., Fermin C.D., Kim M. Immobilized enzymes in biosensor applications // *Materials*. – 2019. – V. 12. – № 1. – 121 p.

9. Понаморева О.Н., Арляпов В.А., Алфёров В.А., Решетилов А.Н. Микробные биосенсоры для определения биологического потребления кислорода (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – № 1. – С. 5–15.
10. Сазыкина М.А., Мирина Е.А., Сазыкин И.С. Использование биосенсоров для детекции антропогенного загрязнения природных вод // Вода: Химия и Экология. – 2015. – № 10. – С. 64–74.
11. Глебова Н.В., Краснова А.О., Нечитайлов А.А. Терморасширенный графит как функциональный материал в технологии электродного материала со смешанной проводимостью // Журнал прикладной химии. – 2018. – Т. 91. – Вып. 8. – С. 1111–1121.
12. Китова А.Е., Колесов В.В., Решетилов А.Н. Безмедиаторный микробный электрод на основе терморасширенного графита // Известия ТулГУ. Естественные науки. – 2018. – Вып. 1. – С. 9–16.
13. Murugan P., Nagarajan R.D, Shetty B.H., Govindasamy M., Sundramoorthy A.K. Recent trends in the applications of thermally expanded graphite for energy storage and sensors – a review // Nanoscale Adv. – 2021. – V. 3. – № 22. – P. 6294–6309.
14. Мочалова Е.М., Максимова Ю.Г. Иммобилизация клеток нитрилгидролизующих бактерий *Rhodococcus erythropolis* 4-1 и *Alcaligenes faecalis* 2 с использованием термотропных и ионотропных гелей // Вестник Пермского университета. Серия биология. – 2020. – Вып. 1. – С. 26–32.

МИКРОБИОЛОГИЯ КАРИЕСА ЗУБОВ И ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА

Рахмонов М.Х.

*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия*

Аннотация. У живого человека целостность зубов подвергается столь серьезному воздействию микробов, что зубные инфекции считаются самым распространенным заболеванием человечества. Дискомфорт, вызываемый этими инфекциями, придают стоматологическим заболеваниям особое значение, несмотря на их неопасный для жизни характер.

Ключевые слова: стоматология, кариес зубов, пародонт, пародонтит, микробактерия, микробиология

MICROBIOLOGY OF DENTAL CARIES AND PERIODONTAL DISEASES

Rakhmonov M.Kh.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. In a living person, the integrity of the teeth is so seriously affected by microbes that dental infections are considered the most common disease of mankind. The discomfort caused by these infections attach particular importance to dental diseases, despite their non-life-threatening nature.

Keywords: dentistry, dental caries, periodontal disease, periodontitis, microbacteria, microbiology

Кариес зубов. Разрушение зубов происходит из-за растворения зубного минерала (в первую очередь гидроксиапатита, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) кислотами, получаемыми в результате бактериальной ферментации сахарозы и других пищевых углеводов [4]. Эти бактерии живут в зубной налет, который скапливается на поверхности зуба. В течение почти столетия считалось, что любое бактериальное сообщество на поверхности зуба может вызвать кариес, и лечение заключалось почти исключительно в механической очистке этих поверхностей зубной щеткой с использованием какого-либо типа мягкого абразива. Такие методы лечения, основанные на санации и, в крайних случаях, на ограничении углеводов в рационе, были исключительно безуспешными в уменьшении кариеса зубов. На самом деле распространенность кариеса среди молодых мужчин была настолько высока, что это стало основной причиной отказа от военной службы во время Первой, Второй мировых войн и Корейской войны [8].

Этот ошеломляющий уровень стоматологической заболеваемости привел к формированию стоматологии как отдельной медицинской профессии в конце 19 века; к ожиданию, что все люди, если они проживут достаточно долго, будут беззубыми; и к расходам на сто-

матологическое обслуживание населения в размере примерно 34 миллиардов долларов в год в 1990 году [7].

Фторирование воды оказалось наиболее экономичным способом борьбы с кариесом; средства для чистки зубов с фтором оказались даже более эффективными, чем предполагалось изначально; а результаты исследований показывают, что большинство кариозных поражений на самом деле являются результатом сахарозависимой инфекции *Streptococcus mutans* [6]. Лиц, подверженных риску заражения этой инфекцией, можно диагностировать и лечить путем частого механического вмешательства, интенсивного применения предписанных доз фторидов или других противомикробных препаратов (таких как хлоргексидин), ограничения приема сахарозы между приемами пищи или использования продуктов, содержащих заменители сахарозы (таких как ксилит). Конечным результатом является то, что кариес зубов в конце 20-го века является контролируемой инфекцией, и его следует предотвращать у многих людей [1]. Почти у 50% детей младшего возраста нет кариеса, а уровень адентии среди лиц старше 65 лет снизился с 50% примерно до 20% [5].

Заболевание пародонта. Заболевание пародонта – это общее описание воспалительной реакции десен и окружающей соединительной ткани на скопления бактерий или зубного налета на зубах. Эти воспалительные реакции делятся на две основные группы: гингивит или пародонтит. Гингивит чрезвычайно распространен и клинически проявляется кровоточивостью десны или десневых тканей без признаков потери костной массы или глубоких пародонтальных карманов. Образование карманов – это термин, обозначающий патологическую потерю ткани между зубом и десной, в результате чего образуются промежутки, которые заполняются зубным налетом. Пародонтит возникает, когда вызванная зубным налетом воспалительная реакция в тканях приводит к фактической потере коллагенового крепления зуба к кости, к потере костной ткани и к образованию глубоких пародонтальных карманов, которые в некоторых случаях могут распространяться на всю длину корня зуба (от 15 до 20 мм) [2].

Пародонтит обычно классифицируется в зависимости от тяжести потери тканей и количества пораженных зубов. Пародонтит не так распространен, как считалось ранее: недавний опрос взрослых американцев показал, что только у 8% опрошенных был один участок зуба с потерей прикрепления размером 6 мм и более. Этот вывод был неожиданным, учитывая прошлые опросы, которые показали, что почти у каждого с возрастом развиваются запущенные формы заболеваний пародонта, но он согласуется с недавними опросами населения в других странах, которые показывают, что от 5 до 15% населения страдает пародонтитом [3].

Библиографический список

1. Badet C., Thebaud N.B. Ecology of Lactobacillus in the oral cavity: a review of literature. // Open Microbiol J. 2008; 2: pp. 38–48
2. El Sherbiny G.M. Control of growth Streptococcus mutans isolated from saliva and dental caries. // Int. J. Curr. Microbiol App Sci. 2014; 3(10): pp. 1–10.
3. Fakhruddin K.S., Egusa H., Ngo H.C., et al. Clinical efficacy and the antimicrobial potential of silver formulations in arresting dental caries: a systematic review. // BMC Oral Health. 2020; 20: pp. 160
4. Featherstone J.D.B. The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. // J Dent Res. 2004; 83: pp. 39–42.

5. Lamster I. Host mediators in gingival crevicular fluid: Implications for the pathogenesis of periodontal disease. // Crit. Rev. Oral. Biol. Med. 1992; 3: pp. 31–60.
6. Loesche W.J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. // Microbiol Rev. 1986. 50: pp. 353
7. Page R.C. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. // J Periodont Res. 1991. 26: pp. 42–230.
8. Pearce C., Bowden G.H., Evans M., et al. Identification of pioneer viridans *Streptococci* in the oral cavity of human neonates. // J Med Microbiol 1995; 42(1): pp. 67–72.

РАЗВИТИЕ ИММУНОЛОГИИ ПОЛОСТИ РТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ ПОЛОСТИ РТА: НА ПРИМЕРЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА И ЭНДОДОНТИИ

Рахмонов М.Х.

*Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия*

Аннотация. Иммунная система играет центральную роль в организме для поддержания целостности и функциональности тканей. Многие общие механизмы воспаления и иммунитета применимы к полости рта и заболеваниям полости рта. Особенности, которые объясняются, с одной стороны, биологией развития и, с другой стороны, специфической анатомической ситуацией, которая характеризуется тесной пространственной взаимосвязью мягких и твердых тканей, воздействием микробиоты полости рта и быстро меняющейся внешней средой.

Ключевые слова: полости рта, иммунология, пародонт, эндодонт, стоматология, микроорганизм, бактерия

DEVELOPMENT OF ORAL IMMUNOLOGY TO IMPROVE ORAL HEALTH: ON THE EXAMPLE OF PERIODONTAL AND ENDODONTIC DISEASES

Rakhmonov M.Kh.

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

Abstract. The immune system plays a central role in the body to maintain the integrity and functionality of tissues. Many common mechanisms of inflammation and immunity are applicable to the oral cavity and oral diseases. Features that are explained, on the one hand, by developmental biology and, on the other hand, by a specific anatomical situation, which is characterized by a close spatial relationship of soft and hard tissues, exposure to oral microbiota and a rapidly changing external environment.

Keywords: oral cavity, immunology, periodontal, endodontic, dentistry, microorganism, bacterium

Заболевания пародонта. Заболевания пародонта, то есть заболевания тканей, поддерживающих зубы (пародонта), являются одними из наиболее распространенных заболеваний в стоматологии [11]. В частности, пародонтит, который характеризуется необратимой потерей костной ткани и прикрепления к ней, а также потерей зубов, по-прежнему представляет серьезные проблемы для стоматологов. Большинство исследований показало, что пародонтит связан с многочисленными заболеваниями всего организма, такими как сахарный диабет, сердечно-сосудистые заболевания и ревматоидный артрит [2].

Несмотря на то, что в последние десятилетия распространенность кариеса зубов была успешно снижена с помощью профилактических мер, распространенность пародонтита по-прежнему высока, отчасти из-за старения общества [12]. Хотя общепризнано, что взаимодей-

ствие микробиома полости рта и иммунных реакций слизистой оболочки полости рта играет важную роль при пародонтите и последующих системных воспалительных состояниях, всеобъемлющая картина роли иммунной системы в этиопатогенезе и терапии заболеваний полости рта в целом все еще отсутствует. В частности, взаимодействие между микроокружением тканей полости рта и иммунным ответом на молекулярном и клеточном уровнях еще не до конца изучено [1].

При пародонтите и периимплантите иммуновоспалительный ответ организма в значительной степени ответственен за течение и распространенность заболеваний. В области медицины постоянные сообщества полимикробов поддерживают экологический баланс на поверхности слизистых оболочек. При этом они участвуют как в межмикробных взаимодействиях, так и во взаимодействиях между микроорганизмами людей. Однако генетические и приобретенные дестабилизирующие факторы могут нарушить это гомеостатическое равновесие, что приводит к отбору видов, разрушающих пародонт. Этот процесс называется дисбактериозом и характерен для пародонтита [3]. Пародонтит эпидемиологически связан с другими хроническими воспалительными заболеваниями, например, кардиометаболическими, нейродегенеративными и аутоиммунными заболеваниями. О том, что это причинно-следственные связи, свидетельствуют клинические исследования терапевтического вмешательства и исследования на животных [10].

Как упоминалось выше, пародонтит возникает в результате взаимоусиливающих взаимодействий между дисбиотическим микробиомом и нарушением регуляции воспаления. Воспаление является не только следствием дисбактериоза, но и способствует дальнейшему росту селективно дисбиотических бактериальных сообществ (инфламмофильных бактерий), опосредуя дисфункцию и повреждение тканей, тем самым увековечивая заболевание [4]. Это повышает возможность разработки методов модуляции хозяина при лечении пародонтита и последующего их клинического применения. Модуляция хозяина может ингибировать деструктивные воспалительные процессы в тканях и способствовать их разрешению или непосредственно вмешиваться в разрушение соединительной ткани и костей. В соответствии с этим, целенаправленные подходы к модификации иммунных реакций хозяина могли бы стать привлекательными новыми подходами к лечению заболеваний пародонта. Например, как описано в другом месте, было показано, что система комплемента гиперактивирована при пародонтите, и поэтому ее ингибирование является терапевтически перспективным. Таким образом, нарушая каскад комплемента в его центральном компоненте, C3, с помощью местного введения небольшого пептидного соединения (Cp40/AMY-101), нечеловеческие приматы могли бы быть защищены от пародонтита [6].

Следовательно, вмешательство, направленное на C3, может найти применение в будущем в качестве дополнительного метода лечения заболеваний пародонта у людей. Внутримышечная инъекция этого небольшого пептидного соединения людям один раз в неделю в течение 3 недель была безопасной и приводила к значительному снижению активности тканеразрушающих протеаз. Тем не менее, иммуномодулирующая терапия пародонтита и периимплантита не является стандартом лечения. Эти подходы все еще находятся в зачаточном состоянии и требуют всесторонних фундаментальных научных исследований и трансляционных исследований, в идеале, всех клеточных и молекулярных игроков, участвующих в процессах разрушения тканей, вызываемых воспалением. При периимплантите это может в конечном счете привести, например, к созданию биоактивных иммуномодулирующих поверхностей и методов лечения [5].

Заболевания эндодонта. В эндодонтии большинство современных процедур клинически по-прежнему заканчиваются удалением ткани пульпы вместо того, чтобы направлять эндодонтические иммуновоспалительные процессы. Успешная ликвидация микробных инфекций в корневом канале остается серьезной проблемой [8].

В настоящее время в эндодонтической терапии используются противомикробные препараты, некоторые из которых неэффективны из-за устойчивости к противомикробным препаратам. Кроме того, взаимодействие этих агентов с иммунной системой может быть подавляющим или стимулирующим. Нетрадиционные противомикробные препараты, такие как антимикробные пептиды, прополис и наноматериалы, иногда обладают сильным противомикробным действием и в то же время оказывают иммуномодулирующее и/или репаративное действие. Например, антимикробный пептид LL-37 играет важную роль в дифференцировке клеток одонтобластов, в формировании репаративного дентина и обеспечении сигналов для защиты путем активации врожденной иммунной системы [9]. Антимикробные пептиды и их синтетические аналоги, в дополнение к своим антимикробным эффектам, обладают биологически активными функциями, такими как иммуномодуляция и улучшение заживления ран, так что в будущем их можно было бы использовать в качестве адъювантов при лечении кариеса, инфицированной пульпы и корневых каналов [7]. Комплекс дентин–пульпа может распознавать вторгшиеся бактерии во время инфекции. Одонтобласты, фибробласты, стволовые клетки, эндотелиальные клетки и иммунные клетки реагируют на бактерии, их компоненты и продукты. Контроль и устранение инфекции, безусловно, является ключом к восстановлению тканей зуба. Тем не менее, в будущем противовоспалительные и иммуномодулирующие подходы, основанные на молекулярных, эпигенетических и фотобиомодулирующих технологиях, могут революционизировать эндодонтическую терапию [13].

Заключение. Полученные результаты показывают, что внутри зубов, на них и вокруг них происходят сложные взаимодействия между микробиомом полости рта, иммунными клетками и клетками, обитающими в тканях полости рта. Лучшее понимание микробиома полости рта, иммунных реакций полости рта и тканей полости рта, а также взаимодействий между ними поможет разработать новые биомаркеры и новые процедуры, основанные на иммунитете, для лечения пародонтальных, эндодонтических и ортодонтических и челюстно-лицевых заболеваний. Без сомнения, это таит в себе огромный потенциал для коренного преобразования клинической практики в стоматологии в целом.

Библиографический список

1. Brezniak N., Wasserstein A. Orthodontically induced inflammatory root resorption. Part I: The basic science aspects. // *Angle Orthod.* 2002. 72(2): pp. 175–179
2. Hajishengallis G, Chavakis T. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. // *Nat Rev Immunol.* 2021. 21(7): pp. 426–440
3. Hajishengallis G, Lamont R.J. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. // *Periodontol-2000.* 2021. 86(1): pp. 210–230
4. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. // *Mol oral Microbiol.* 2014. 29(6): pp. 248–257
5. Hussein H., Kishen A. Local Immunomodulatory effects of Intracanal medications in apical periodontitis. // *J Endod.* 2002. 48(4): pp. 430–456
6. Kwon T., Lamster I.B., Levin L. Current concepts in the management of periodontitis. // *Int Dent J.* 2021. 71(6): pp. 462–476

7. Mai S., Mauger M.T., Niu L.N. et al. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. // *Acta Biomater.* 2017. 49:16–35
8. Medzhitov R., Schneider D.S., Soares M.P. Disease tolerance as a defense strategy. // *Science.* 2012. 335(6071): pp. 936–941
9. Nireeksha, Varma S.R., Damdoun M. et al. Immunomodulatory expression of cathelicidins peptides in pulp inflammation and regeneration: an update. // *Curr. Issues Mol. Biol.* 2021. 43(1): pp. 116–126
10. Nishioka M., Ioi H., Nakata S., Nakasima A., Counts A. Root resorption and immune system factors in the Japanese. // *Angle Orthod.* 2006. 76(1): pp. 103–108
11. Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. Periodontal diseases. // *Lancet.* 2005. 366(9499): pp. 1809–1820
12. Schubert A., Jager F., Maltha J.C., Bartzela T.N. Age effect on orthodontic tooth movement rate and the composition of gingival crevicular fluid: A literature review. // *J Orofac Orthop.* 2020. 81(2): pp. 113–125
13. Tsai M.S., Chen Y.Y., Chen W.C., Chen M.F. *Streptococcus mutans* promotes tumor progression in oral squamous cell carcinoma. // *J Cancer.* 2022. 13(12): pp. 3358–3367

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ СИДЕРОФОРОВ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ

Селиванова П.А.¹, Михайловская В.С.^{2,3}, Кочергина Д.А.¹, Кузнецова М.В.²

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

³ Научно-технологический университет «Сириус», Краснодарский край, федеральная территория «Сириус», пгт. Сириус, Россия

Аннотация. Бактерии *Escherichia coli* способны продуцировать различные сидерофоры, что обуславливает их экологическую адаптацию. Цель исследования – оценить генетические профили сидерофоров сельскохозяйственных штаммов *E. coli*. Сравнение на субпопуляционном уровне показало, что культуры, выделенные при колибактериозе птиц, продуцируют в большем проценте случаев и более разнообразные комбинации сидерофоров, чем фекальные изоляты от здоровой птицы или штаммы, выделенные из органического удобрения.

Ключевые слова: сидерофоры, *Escherichia coli*, сельскохозяйственная птица, удобрение

GENETIC PROFILES OF SIDEROPHORES OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM POULTRY AND ORGANIC FERTILIZER

Selivanova P.A.¹, Mihailovskaya V.S.^{2,3}, Kochergina D.A.¹, Kuznetsova M.V.²

¹ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

² 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

³ Sirius University of Science and Technology, Krasnodar region, “Sirius” Federal Territory, Russia

Abstract. *Escherichia coli* bacteria are able to produce various siderophores, which causes their ecological adaptation. The aim of the study was to evaluate the genetic profiles of siderophores in agricultural strains of *E. coli*. Comparison at the subpopulation level showed that cultures isolated from colibacteriosis of birds produce in a larger percentage of cases and more diverse combinations of siderophores than fecal isolates from healthy poultry or strains isolated from organic fertilizer.

Keywords: siderophores, *Escherichia coli*, agricultural poultry, fertilizer

Железо является одним из незаменимых элементов для жизнедеятельности микроорганизмов и основным лимитирующим фактором колонизации и персистирования бактерий в биотопах хозяина. Поскольку в природной среде и макроорганизме железо присутствует в малодоступной, часто связанной форме, бактерии для его приобретения синтезируют низкомолекулярные высокоаффинные хелатирующие молекулы, называемые сидерофорами [1].

Извлеченное железо сидерофоры доставляют клеткам с помощью специфичных поверхностных белковых рецепторов, а также различных транспортных систем, входящих в

состав мембран [2]. Известно, что бактерии *Escherichia coli* способны продуцировать четыре типа сидерофоров [3]. Большинство представителей как комменсальных, так и патогенных эшерихий увеличивают доступ к железу за счет выделения энтеробактина, который имеет высокое сродство к Fe^{3+} . Меньшая часть изолятов может синтезировать до трех дополнительных сидерофоров, опосредующих, как предполагают, вирулентность – аэробактин, сальмохелин и иерсинибактин. При этом данные сидерофоры обнаружены и среди непатогенных *E. coli*, что свидетельствует об их роли в экологии *E. coli*, связанной с адаптацией бактерий во внешней среде и симбиотическими взаимодействиями нормофлоры и хозяина.

Цель исследования – оценить генетические профили сидерофоров в субпопуляциях *E. coli*, выделенных от здоровой сельскохозяйственной птицы, птицы с колибактериозом, а также из органического удобрения.

Методы и материалы. Штаммы патогенной для птиц *E. coli* (АРЕС) (n=26) были выделены в 2016–2018 гг. на трех крупных птицефабриках Пермского края из органов цыплят-бройлеров с признаками колибактериоза.

В период 2019–2021 гг. была собрана коллекция штаммов *E. coli* (n=16), полученных из образцов фекалий здоровых птиц (цыплят, перепелов, индеек) на сельскохозяйственных предприятиях и частных хозяйствах Пермского края. Коллекция штаммов *E. coli* (n=22) была выделена из органического удобрения (куриного помета), предоставленного сотрудниками «Пермского НИИСХ»-филиала ПФИЦ УрО РАН осенью 2022 г. Идентификация бактерий проводилась бактериологическим методом и с помощью тест-системы «ENTEROtest 16» (Erba Lachema s.r.o., Czech Republic).

Детекцию генов рецепторов сидерофоров *E. coli* проводили методом ПЦР по конечной точке с использованием праймеров и режимов амплификации, согласно рекомендациям авторов (табл.). Амплификацию ДНК проводили с применением реагентов производства ООО «Синтол» (Россия) на термоциклере DNA Engine Dyad (Bio-Rad, США) в 25 мкл реакционной смеси. Визуализацию полос и документирование данных осуществляли с помощью системы гель-документации Gel-Doc XR (Bio-Rad, США).

Скрининг продуцентов бактериоцинов проводили с помощью техники «двойного слоя» по методу M. Budič et al., 2011 [4]. Чувствительность штаммов *E. coli* к антибиотикам оценивали согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ, Версия-2018-03). Фенотип множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) определяли, как нечувствительность штаммов хотя бы к одному препарату трех и более классов антибиотиков [5].

Статистический анализ проводили с использованием стандартных пакетов компьютерных программ Microsoft Office XP Excel и STATISTICA 10.0. Сравнение качественных признаков выполняли с использованием χ^2 с поправкой Йейтса или точного критерия Фишера.

Таблица – Праймеры для детекции генов рецепторов сидерофоров в штаммах *E. coli*

Ген-мишень	Праймер	Нуклеотидная последовательность	Размер, п.н.	Источник
<i>fepA</i>	fepA-F	TTTGTCGAGGTTGCCATACA	349	[6]
	fepA-R	CACGCTGATTTTGATTGACG		
<i>fyuA</i>	fyuA-F	GGGAATGTGAAACTGCGTCT	791	
	fyuA-R	CGGGTGCCAAGTTCATAGTT		
<i>iroN</i>	iroN-F	AAGTCAAAGCAGGGGTTCGGGC	925	[7]
	iroN-R	GACGCCGACCATTAAGACGCAG		
<i>iutA</i>	iutA-F	GGCTGGACATCATGGGAACTGG	301	[8]
	iutA-R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		

Примечание. *fepA* – ген рецептора энтеробактина; *fyuA* – ген рецептора иерсиниабактина, *iroN* – ген рецептора сальмохелина; *iutA* – ген рецептора аэробактина.

Сравнение распространенности генов сидерофоров в популяциях *E. coli* ассоциированных с больными и здоровыми птицами, а также с органическими удобрениями. Во всех исследуемых группах наиболее часто детектировали ген *fepA*, кодирующий рецептор сидерофора энтеробактина. Распространенность *fepA* в *E. coli*, изолированных от птиц с признаками колибактериоза, здоровых птиц и из органических удобрений составила 88,5%, 100% и 100% соответственно. Вторым по распространенности оказался ген рецептора сальмохелина, *iroN*, который чаще встречался у эшерихий, выделенных из удобрений (81,8%), чем в группе *E. coli* от больных (65,4%) или от здоровых (31,3%) птиц, в последнем случае разница оказалась достоверной ($p=0,01$). Рецептор аэробактина, кодируемый *iutA*, имели 25% эшерихий здоровых птиц, 34,6% АРЕС и 36,4% культур из удобрений. Ген *fyuA*, кодирующий рецептор иерсиниабактина чаще детектировали в группе *E. coli* из удобрений (36,4%), в АРЕС его несли 30,8% штаммов, тогда как в коллекции *E. coli* здоровых птиц он встречался лишь у 12,5% культур. Достоверной разницы между группами по распространенности данного гена не обнаружено.

В целом среди всех исследуемых штаммов *fepA*, *iroN*, *iutA* и *fyuA* детектировали в 95,3%, 62,5%, 37,5% и 28,1% случаев. Большинство штаммов (32,8%) содержали три рецептора из четырех исследуемых, меньшее количество культур имели один (29,7%) и два гена (26,6%), четыре гена выявлено в 9,4% случаев. Только в одном штамме не были обнаружены исследуемые детерминанты сидерофоров.

Следует отметить, что наибольшее разнообразие комбинаций обнаружено в коллекции штаммов АРЕС: выявлено восемь уникальных вариантов комбинаций сидерофоров, при этом четыре штамма содержали гены рецепторов всех четырех сидерофоров (рис.). Интересным результатом оказалось то, что три и более генов имели тринадцать штаммов *E. coli*, выделенных из удобрений.

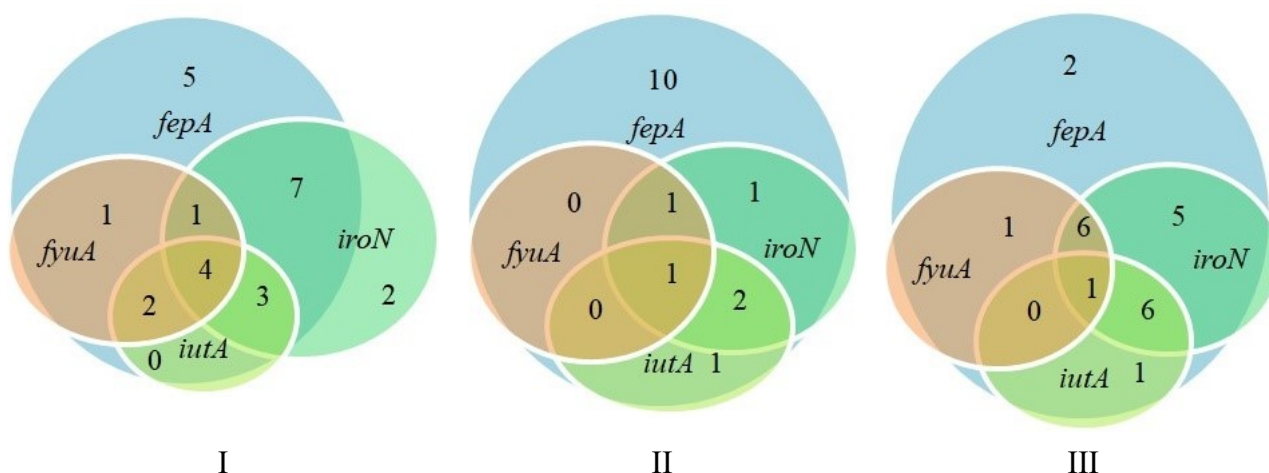


Рис. Распространенность генов рецепторов сидерофоров и их комбинаций в штаммах *E. coli*, выделенных из: I – органов больных птиц, II – фекалий здоровых птиц, III – органического удобрения. Числа в областях диаграммы Венна – количество штаммов, соответствующих данному генотипу.

Связь между распространенностью сидерофоров, устойчивостью к противомикробным препаратам и продукцией бактериоцинов. Штаммы были проверены на чувствительность к антимикробным препаратам. Мультирезистентными оказались 84,6% АРЕС, 27,3% культур, выделенных из органического удобрения, и только 18,8% – от здоровых птиц. Учитывая различия доли мультирезистентных штаммов, выделенных из разных источников, представляло интерес провести корреляцию между устойчивостью к антибиотикам и продукцией сидерофоров. Одновременно фенотип МЛУ и гены, кодирующие рецепторы двух и более сидерофоров, имели 72,7% культур АРЕС и 85,7% культур, выделенных из удобрений, тогда как в группе *E. coli* от здоровых птиц таких культур выявлено не было. Штаммы с фенотипом МЛУ и штаммы без множественной антибиотикорезистентности не отличались по количеству продуцируемых сидерофоров – в обеих группах доля культур, имеющих два и более рецепторов сидерофоров, составила 68,7%. При этом, в группе АРЕС более двух рецепторов сидерофоров чаще имели культуры с МЛУ, тогда как в группе штаммов, выделенных от здоровых птиц, рецепторы сидерофоров, чаще содержали культуры без фенотипа МЛУ.

Отдельно проанализирована связь между бактериоциногенностью и присутствием генов рецепторов разных типов сидерофоров. Продукция бактериоцинов была выявлена у 43,8% штаммов (64,3% – АРЕС; 21,4% – культуры из удобрений; 14,3% – культуры от здоровых птиц). При этом среди АРЕС таковых оказалось 69,2%, из органического удобрения продуцировали бактериоцины 27,3% культур, а из штаммов, выделенных от здоровых птиц – 25%. Сочетание бактериоциногенности и наличия генов, кодирующих рецепторы двух и более сидерофоров, имели 72,2% культур АРЕС и 100% культур, выделенных из удобрений или от здоровых птиц. Следует отметить, что штаммы – продуценты бактериоцинов, чаще имели два и более рецепторов сидерофоров, чем штаммы, не продуцирующие антимикробные вещества в субпопуляции *E. coli*, выделенных от здоровых птиц (100% против 0%) и в целом среди всех культур, выделенных в условиях птицеводческих хозяйств (82,1% против 17,9%). Разница оказалась статистически достоверной ($p=0,008$ и $p=0,04$ соответственно).

Патогенные *E. coli*, в том числе АРЕС, показывают высокую распространенность генов рецепторов и биосинтеза сидерофоров, а также различные их комбинации. Это связано с тем, что в макроорганизме железо находится внутриклеточно или связано с белками, что делает его недоступным для бактерий.

Кроме того, существуют молекулы, например, липокалин-2, которые связывают железосодержащие сидерофоры и препятствуют их транспорту в бактериальную клетку. Разнообразие сидерофоров, активных в разных условиях или в отношении разных источников железа в организме хозяина, уклоняющихся от эффекторов иммунитета (например, сальмохелин), действующих на разных этапах инфекционного процесса, имеет значение для преодоления условий лимитирования железом на всех этапах инфекционного процесса. В нашем исследовании наибольшее разнообразие комбинаций обнаружено в коллекции штаммов АРЕС, хотя встречаемость некоторых рецепторов сидерофоров оказались ниже, чем в ряде других исследований [9,10].

К факторам колонизации и персистенции, наряду с продукцией сидерофоров, можно отнести бактериоциногению и множественную лекарственную устойчивость, так как они обеспечивают антагонистическую активность в отношении микробиоты хозяина и уклонение от антибиотикотерапии. Это также подтверждается нашими исследованиями – среди АРЕС МЛУ оказалось 84,6%, а продуцировали бактериоцины 69,2%. Эти результаты показывают, что штаммы *E. coli*, несущие множественные маркеры сидерофоров в штаммах с МЛУ, также могут представлять серьезную угрозу для общественного здравоохранения. Коллекция *E. coli*, выделенных от здоровых птиц, напротив, не отличилась высоким разнообразием в наличии исследуемых генов и их комбинаций.

Особо следует сказать о штаммах, выделенных из органического удобрения – продукта, получаемого при выращивании птицы. Оказалось, что тринадцать (59,1%) штаммов *E. coli* имели три и более генов различных сидерофоров, в том числе связанных с вирулентностью. Большинство штаммов (81,8%) содержали ген сальмохелина, играющего решающую роль в персистенции в макроорганизме, тогда как в исследованиях Agostinho и соавт. (2020) ген *iroN* выделяли в небольшом проценте штаммов, выделенных из аналогичных источников [11].

Ранее показано, что изоляты из окружающей среды в меньшей степени содержат локусы, связанные с синтезом аэробактина и иерсиниабактина [6]. В нашем исследовании гены рецепторов вышеуказанных сидерофоров детектировали так же часто, как и в изолятах из организма птицы, что требует дальнейшего изучения для понимания роли различных сидерофоров в адаптации бактерий в природной среде.

Таким образом, впервые проведено комплексное исследование распространенности генов рецепторов сидерофоров, МЛУ и бактериоциногении в разных субпопуляциях *E. coli*, циркулирующих в «закрытом контуре» птицеводческого хозяйства.

Полученные данные не только дополняют информацию по биологическому разнообразию эшерихий, но и имеют медицинскую значимость в контексте усовершенствования санитарно-гигиенических мероприятий в агропромышленных комплексах птицеводческого направления.

Работа выполнена в рамках НИОКТР АААА-А19-119112290009-1.

Библиографический список

1. Кузнецова Д.А., Рыкова В.А., Подладчикова О.Н. Сидерофоры бактерий: структура, функции и роль в патогенезе инфекций // Пробл. особо опасных инф. – 2022. – №3. – С. 14–22.
2. Hider R.C., Kong X. Chemistry and biology of siderophores // Nat. Prod. Rep. – 2010. – V. 27, № 5. – P. 637–657.
3. Kathayat D., Lokesh D., Ranjit S., Rajashekara G. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an Overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies. // Pathogens. – 2021. – V. 10. – P. 467.
4. Budič M., Rijavec M., Petkovšek Z., Zgur-Bertok D. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. // PLoS One. – 2011. – V. 6, № 12.
5. Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A., Weber J.T., Monnet D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. // Clin. Microbiol. Infect. – 2012. – V. 18, № 3. – P. 268–281.
6. Searle L.J., Méric G., Porcelli I., Sheppard S.K., Lucchini S. Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. // PLoS One. – 2015. – V. 10. – P. 1–14.
7. Johnson J.R., Stell A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. // J Infect Dis. – 2000. – V. 181, № 1. – P. 261–272.
8. Nowrouzian F., Adlerberth I., Wold A.E. P fimbriae, capsule and aerobactin characterize colonic resident *Escherichia coli*. // Epidemiol. Infect. – 2001. – V. 126, №1.
9. Ons E., Bleyen N., Tuntufye H. N., Vandemaele F., Goddeeris B. M. High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli* // Avian Pathology. – 2007. – V. 36, № 5. – P. 411–414.
10. Fancher C.A., Thames H.T., Colvin M.G., Smith M., Easterling A., Nuthalapati N., Zhang L., Kiess A., Dinh T.T.N., Theradiyil Sukumaran A. Prevalence and molecular characteristics of avian pathogenic *Escherichia coli* in "no antibiotics ever" broiler farms. // Microbiol Spectr. – 2021. – V. 9, № 3.
11. Agostinho J., Vedovelli M., Borzi M., Marin J. Antibiotic resistance and virulence factors among *Escherichia coli* isolates from avian organic fertilizer. // Ciência Rural. – 2020. – V. 50, № 2.

РАЗРАБОТКА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МОБИЛИЗАЦИИ ФОСФОРА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

Семёнова К.Г.¹, Максимова Ю.Г.^{2, 3}

¹ Пермский национальный исследовательский политехнический университет, Пермь, Россия

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

³ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Выделены культуры микроорганизмов, мобилизующие фосфор малорастворимых соединений. Осуществлен отбор изолятов, исходя из показателя активности фитазы. Для выделения фермента выбран один из изолятов фитатгидролизующих бактерий. С применением физических и химических методов иммобилизации получены биокатализаторы, представляющие собой ферментные препараты для мобилизации фосфора из органических соединений.

Ключевые слова: фосфор, фитаза, фитатгидролизующие бактерии, иммобилизация, ферментный препарат

DEVELOPMENT OF IMMOBILIZED ENZYME PREPARATIONS FOR MOBILIZATION OF PHOSPHORUS OF ORGANIC COMPOUNDS

Semenova K.G.¹, Maksimova Y.G.^{2, 3}

¹ Perm National Research Polytechnic University, Perm, Russia

² 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

³ Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Microbial cultures mobilizing phosphorus of poorly soluble compounds were isolated. The isolates were selected on the basis of phytase activity index. One of the isolates of phytate-hydrolyzing bacteria was selected for enzyme isolation. Biocatalysts were obtained using physical and chemical immobilization methods. They are enzyme preparations to mobilize phosphorus from organic compounds.

Keywords: phosphorus, phytase, phytate hydrolyzing bacteria, immobilization, enzyme preparation

Введение. Фосфор – один из важнейших необходимых для питания растений биогенных элементов, который принимает участие в большом количестве биохимических процессов. Данный элемент находится в почвах по большей части в связанном виде, а именно входит в состав солей фосфорной, а также фитиновой кислот. Такие соединения являются малорастворимыми, что затрудняет фосфорное питание растений. Одной из актуальных проблем

сельского хозяйства является поиск путей увеличения подвижности фосфора – его мобилизация из труднодоступных для растений соединений [1].

В настоящее время разрабатываются такие перспективные методы, как предпосевная обработка семян препаратами фосфатмобилизирующих бактерий, комплексными бактериальными препаратами, а также создаются биопрепараты на основе ферментов [2].

Кроме того, фитазы активно применяются в виде кормовых добавок для сельскохозяйственных животных, так как животные получают фосфор с растительными кормами в основном в виде труднорастворимых фитатов. Внесение экзогенной фитазы в корма увеличивает доступность связанного фосфора и других минеральных элементов, исключает необходимость добавления неорганических фосфатов и снижает загрязнение стоков животноводческих предприятий избытками фосфора [3].

Основной проблемой, возникающей во время использования ферментов, является их недостаточная стабильность. Она может выражаться в небольших сроках хранения и узком диапазоне температур работы фермента. Этим трудностям удастся избежать при использовании иммобилизованных ферментов, которые по своей эффективности не уступают нативным формам, но отличаются значительной устойчивостью.

Актуальность исследования обоснована необходимостью разработки эффективных биопрепаратов для мобилизации фосфора из неорганических и органических соединений. Для их создания был проведен скрининг выделенных из щелочного высокоминерализованного биотопа экстремофильных микроорганизмов. Такие прокариоты обладают как специфической (алкало- и галотолерантностью), так и неспецифической устойчивостью к неблагоприятным факторам окружающей среды, в связи с чем являются перспективными объектами биотехнологического значения.

Материалы и методы. Фитатгидролизующие бактерии выделяли из ризосферы растений, произрастающих в грунте содового шламохранилища АО «Березниковский содовый завод», г. Березники, Пермский край (координаты отбора проб 59°25'40,8" с.ш., 56°43'24,6" в.д.). Отобраны три образца: 3.2 – грунт с ризосферой одуванчика *Taraxacum officinale* F.H.Wigg.; 3.4 – грунт с ризосферой черёмухи *Prunus padus* L.; 3.9 – поверхность грунта, не глубже 1 см.

Накопительную культуру фитазопродуцирующих бактерий получали на питательной среде Phytase Screening Medium (PSM) следующего состава (г/л): CaCl_2 – 2; NH_4NO_3 – 5; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01; глюкоза – 20; фитат натрия – 4. Для выделения колоний микроорганизмов, способных гидролизовать нерастворимый фитат натрия, проводили высев десятикратных разведений накопительной культуры на агаризованную среду PSM следующего состава (г/л): CaCl_2 – 2; NH_4NO_3 – 5; KCl – 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – 0,01; глюкоза – 20; агар – 20; фитат натрия – 4 [4].

Активность фермента фитазы оценивали количественно по методу Грайнера. Количество фосфора, выделившегося в среду при гидролизе фитата натрия, пропорционально изменению оптической плотности. Данный показатель, как для контрольной, так и для реакционной смесей измеряли на спектрофотометре Ultraspec 3000 («GE Healthcare», США), длина волны излучения $\lambda=355$ нм. За единицу активности принимали количество фермента, расщепляющего фитат натрия с образованием 1 мкмоль фосфата за одну минуту [5].

С целью получения биомассы продуцента фитазы применяли глубинный метод культивирования на жидкой питательной среде LB. Ферментацию осуществляли в колбах объемом 2 л на качалке в течение 7 суток при температуре 25 °С. Биомассу микроорганизмов отделяли от культуральной жидкости с помощью центрифугирования. В пробирки типа Эппендорф объемом 50 мл разливали культуральную жидкость и затем центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 минут. Дезинтеграцию клеток для разрушения клеточной стенки и выделения внутриклеточной фитазы осуществляли физическим методом – воздействием ультразвука. Озвучивание клеток проводили на ультразвуковом дезинтеграторе (УЗГ8 0.4/22, «ВНИИ ТВЧ», Россия) при частоте 22 кГц 7 раз по 20 секунд с охлаждением осадка на ледяной бане.

С целью осаждения молекул фермента проводили высаливание белка с помощью сульфата аммония. Последовательно увеличивая концентрацию соли в растворе, получали ряд фракций [6]. Количество белка для каждой фракции определяли согласно методу Брэдфорда, фитазную активность – по методике определения активности фитазы [5,7].

Иммобилизацию фитазы осуществляли с использованием физических и химических методов. В качестве носителей для адсорбционной иммобилизации были использованы углеродные сорбенты: многослойные углеродные нанотрубки, функционализированные группами COOH (МУНТ-COOH); березовый активный уголь (БАУ); Карбактин. К навеске адсорбента добавляли 5 мл раствора белка. Иммобилизацию проводили динамическим методом на качалке в течение 30 мин [8].

Для метода иммобилизации путем включения фитазы в структуру геля раствор фермента смешивали с раствором 4% альгината натрия в соотношении 1:2. Полученную смесь раскапывали с помощью шприца для подкожных инъекций в холодный раствор 0,1М BaCl₂. Полученные гранулы диаметром 2 мм ресуспендировали в свежем BaCl₂ в течение 24 ч при температуре 4-6 °С. Отмывали гранулы дистиллированной водой, и далее хранили в холодильнике [9].

Для метода химической иммобилизации получали хитозановые микросферы. Раствор хитозана в уксусной кислоте раскапывали через шприц в раствор 1М КОН. К отмывым гранулам добавляли раствор 0,1% глутарового альдегида для активации. Далее фосфатным буфером проводили отмывку микросфер от несвязанного сшивающего агента. К готовым хитозановым гранулам добавляли раствор фермента и оставляли на 24 ч в статических условиях в холодильнике. Гранулы отмывали от несвязанного белка фосфатным буфером [9].

Результаты и их обсуждение. В результате выделения фитатгидролизующих микроорганизмов были отобраны 3 изолята бактерий, которые за время культивирования растворили фитат натрия. Все изоляты формируют зону просветления агаризованной среды. Для отбора наиболее активного изолята через 7 суток культивирования бактерий на жидкой среде PSM количественно определяли активность фитазы.

Изолят 3.9.1 отличался наибольшей фитазной активностью среди фитатгидролизующих бактерий ($E = (69,34 \pm 0,96)$ мкмоль/(мин·л)). Данный изолят можно использовать в качестве продуцента фермента фитазы.

В результате высаливания сульфатом аммония наибольшее количество белка (5,52 мг/мл) и высокое значение активности фермента (71,3 мкмоль/(мин·мг)) среди выделенных фракций наблюдали при 70%-м насыщении солью. Фракция, полученная при 70%-ом насыщении раствора белка сульфатом аммония, далее использовалась для получения иммобили-

зованного фермента. Активность фермента фитазы до иммобилизации составила $(71,1 \pm 2,4)$ мкмоль/(мин·мг).

Для сравнения адсорбционной способности углеродных носителей по отношению к белку измеряли количество белка в растворе до и после адсорбции. Рассчитывали массу адсорбированного белка и величину его адсорбции на носителе. Величина адсорбции фитазы на углеродных сорбентах составила $(13,12 \pm 0,16)$ мг/г активного угля, $(10,29 \pm 0,13)$ мг/г Карбактина, $(34,18 \pm 0,32)$ мг/г МУНТ-СООН. Таким образом, наибольшая величина адсорбции фитазы, превышающая в 3 раза таковую на других носителях, была отмечена на МУНТ-СООН.

Определение активности иммобилизованной фитазы проводили также по методу Грайнера с учетом массы адсорбированного белка. Значения активности иммобилизованного фермента в сравнении с активностью в исходном растворе представлены на рис. 1.

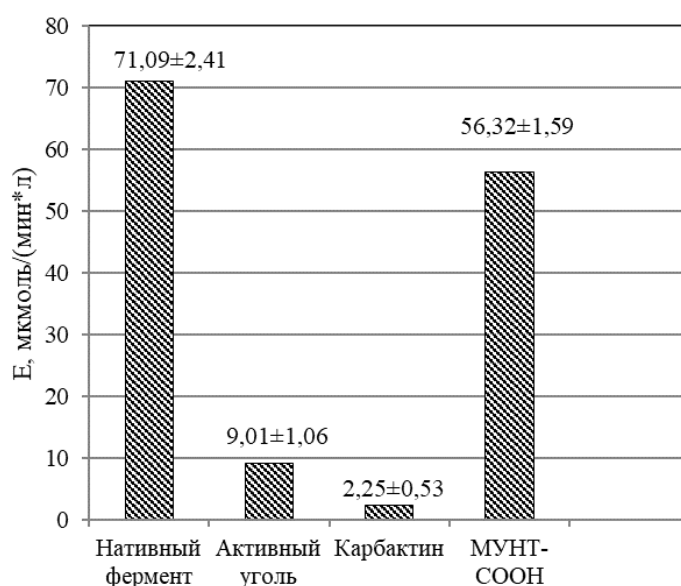
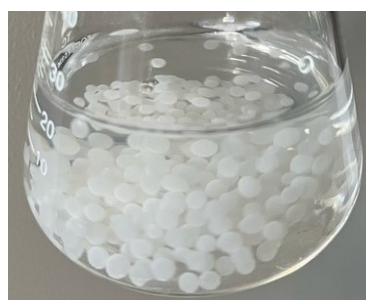


Рис. 1. Активность фермента в исходном растворе и после иммобилизации на углеродных сорбентах

При адсорбции фермента на МУНТ-СООН сохранялось 79% первоначальной активности, тогда как на активированном угле – 13%, а на карбактине – всего 3% фитазной активности. В результате химической иммобилизации фитазы получили хитозановые гранулы желтого цвета (рис. 2а), в ходе иммобилизации фитазы с включением фермента в структуру альгинатного геля – гранулы белого цвета (рис. 2б).



а



б

Рис. 2. Биокатализатор на основе гранул хитозана (а) и альгинатного геля (б)

После инкубации раствора фермента, содержащего хитозановые гранулы, определили остаточную концентрацию белка в растворе (несвязанный белок) по методу Брэдфорда. Масса иммобилизованного белка составила $(2,219 \pm 0,035)$ мг.

С целью определения операционной стабильности активности полученных биокатализаторов определяли фитазную активность по методу Грайнера. Для этого проводили последовательные циклы реакций иммобилизованного фермента с субстратом (фитатом натрия), после каждой реакции иммобилизованный фермент отмывали от реакционной среды и использовали в последующем цикле. На рис. 3 приведена операционная стабильность активности иммобилизованной фитазы при многоцикловом проведении ферментативной реакции.

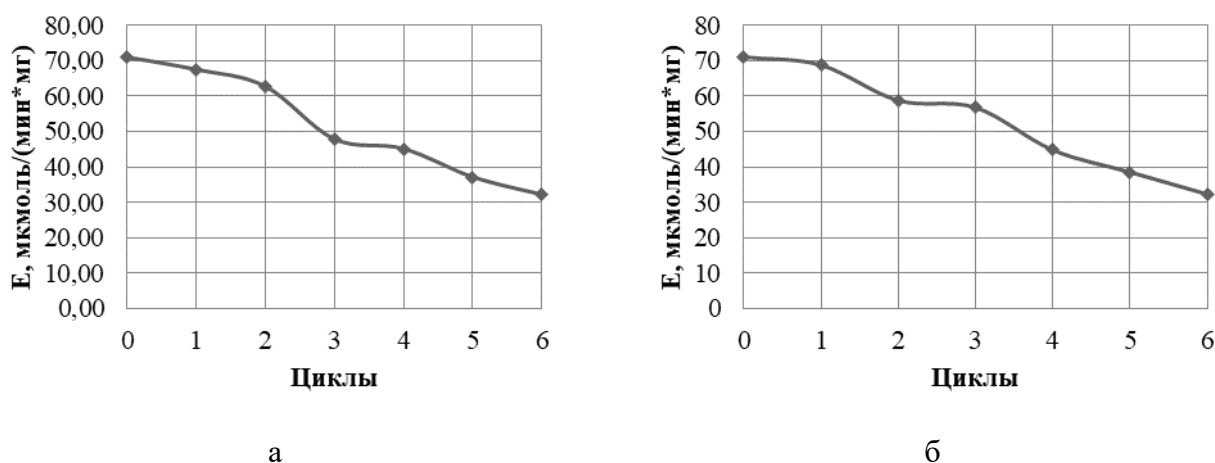


Рис. 3. Операционная стабильность активности фитазы, иммобилизованной на хитозане (а) и включением фермента в альгинатный гель (б).

Активность биокатализатора на основе хитозановых гранул постепенно снижается в последующих циклах реакции по сравнению с исходным раствором, но при этом отличается высокими значениями (сохраняется 95% первоначальной активности). Только после 6-го цикла активность биокатализатора составляла не более 50% от активности нативной формы фермента.

Фитазная активность биокатализатора, полученного путем включения фермента в структуру альгинатного геля, незначительно ниже, чем активность нативной формы фермента (сохраняется 97% первоначальной активности). При многоцикловом проведении реакции активность иммобилизованного фермента постепенно снижается, однако на протяжении 5 циклов сохраняется не менее 50% активности, зафиксированной в 1-м цикле.

Заключение. Из ризосферы растений, произрастающих на высокоминерализованных щелочных средах содового шламохранилища, выделено три изолята фитатгидролизующих бактерий. По результатам скрининга изолят 3.9.1 был выбран в качестве перспективного продуцента фермента фитазы.

Фермент иммобилизован с применением физических и химических методов (адсорбции на углеродных материалах, включением в гель альгината и ковалентной сшивкой с активированным хитозаном). Активность нативного фермента в наибольшей степени сохранялась при адсорбции на МУНТ-СООН (79%), включении в гель альгината (97%) и при сшивке с

активированным хитозаном (95%). Определено, что при многоцикловом использовании иммобилизованного в альгинате и хитозане фермента сохраняется не менее 50% фитазной активности на протяжении 5–6 циклов.

Таким образом, показана возможность получения биокатализаторов в удобной для применения форме, позволяющей хранить и использовать фермент многократно. Данные биокатализаторы представляют собой иммобилизованные ферментные препараты для мобилизации фосфора из органических соединений.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507.

Библиографический список

1. Беясова Н.А. Выделение и характеристика почвенных фосфатмобилизующих микроорганизмов / Н.А. Беясова, О.С. Игнатовец, Д.С. Сергиевич [и др.] // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 2. – С. 93–97.
2. Nargul M. Musta Ogly Phytate hydrolysing activity of the *Aspergillus niger* L-4 micromycete strain / M. Musta Ogly Nargul, Natalya Yu. Sharova // PROCEEDINGS OF UNIVERSITIES. APPLIED CHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY. – 2020. – Vol.10, № 2. – P. 232-239.
3. Гесслер Н.Н. Фитазы и перспективы их применения (обзор) / Н.Н. Гесслер, Е.Г. Сердюк, Ю.И. Дерябина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 347–356.
4. Патент № 2654595 С1 Российская Федерация, МПК А01N 63/02, С12N 1/20. Штамм бактерий *Pantoea brenneri*, обладающий фосфатмобилизующей и фунгицидной активностью: № 2017130448: заявл. 28.08.2017: опубл. 21.05.2018 / А. Д. Сулейманова, Д. Л. Иткина, М. Р. Шарипова; заявитель федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет» (ФГАОУ ВО КФУ).
5. Greiner R. Purification and characterization of three phytases from germinated lupine seeds (*Lupinus albus* Var. Amiga). *J Agric Food Chem*, 2002, 50:6858–6864
6. Кочетов Г.А. Практическое руководство по энзимологии: учебное пособие / Г.А. Кочетов. – Переработанное и дополненное. – Москва: Высшая школа, 1980. – 272 с.
7. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72, № 1-2 – P. 248–254.
8. Генералова К.Н. Адсорбция клеток бактерий на углеродных сорбентах / К.Н. Генералова, А.А. Минькова, В.Ф. Олонцев. – Пермь: 2014. – С. 53–62.
9. Максимова Ю.Г. Иммобилизованные клетки и ферменты в биотехнологии: учебное пособие / Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов. – Пермь: ПГНИУ, 2018. – 88 с.

НАРУШЕНИЕ ГОМЕОСТАЗА ЦИСТЕИНА И ИНДУКЦИЯ SOS-ОТВЕТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА НА *ESCHERICHIA COLI*

Сутормина Л.В., Музыка Н.Г., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

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

Аннотация. Изучалось влияние бактерицидного антибиотика ципрофлоксацина на изменение содержания внутриклеточного цистеина в клетках *Escherichia coli* и экспрессию гена *sulA*, входящего в состав SOS-регулона бактерий. Показано, что добавление 0,3 мкг/мл ципрофлоксацина повышало уровень внутриклеточного цистеина у штамма, дефицитного по синтезу глутатиона, растущего на разных средах. Обработка клеток ципрофлоксацином стимулировала экспрессию гена *sulA* у обоих штаммов. В большей степени этот эффект был выражен у мутантного штамма.

Ключевые слова: ципрофлоксацин, цистеин, окислительный стресс, SOS-ответ

DISRUPTION OF CYSTEINE HOMEOSTASIS AND INDUCTION OF SOS-RESPONSE UNDER THE EFFECT OF CIPROFLOXACIN ON *ESCHERICHIA COLI*

Sutormina L.V., Muzyka N.G., Smirnova G.V., Oktyabrsky O.N.

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 effect of the bactericidal antibiotic ciprofloxacin on changes in the concentration of intracellular cysteine in *Escherichia coli* cells and the expression of the *sulA* gene, which is part of the SOS regulon, was studied. It was shown that the addition of 0.3 µg/ml ciprofloxacin increases the level of intracellular cysteine in a strain deficient in glutathione synthesis when grown in various media. Treatment of cells with ciprofloxacin stimulated the expression of the *sulA* gene in the both strains. This effect was more pronounced in the mutant strain.

Keywords: ciprofloxacin, cysteine, oxidative stress, SOS-response

Возникновение и распространение антибиотико-резистентных форм бактерий является глобальной проблемой современного здравоохранения. В связи с этим детальное изучение механизмов действия уже существующих антибиотиков важно для дальнейшего применения и разработки новых лекарственных средств. Была предложена гипотеза, что бактерицидные антибиотики с различными внутриклеточными мишенями действуют по единому механизму, который связан с индукцией окислительного стресса [1]. Предполагается, что, воздействуя на пути образования свободных радикалов и на активность антиоксидантных систем, можно повысить восприимчивость бактерий к антибиотикам.

В живых клетках L-цистеин является компонентом многих белков и природного антиоксиданта глутатиона. В обычном состоянии клетки поддерживают низкий уровень цистеина [2], однако, в условиях стресса его гомеостаз способен нарушаться [3]. Повышение концентрации цистеина внутри клеток потенциально опасно, так как цистеин за счет высокой редокс-активности SH-группы восстанавливает внутриклеточные ионы железа, способствуя образованию гидроксильных радикалов в реакции Фентона [2]. Также цистеин может выступать в качестве источника активных форм кислорода (АФК) в реакциях аутоокисления [2, 4]. Таким образом, если индуцированный антибиотиками стресс сопровождается нарушением гомеостаза цистеина, это может влиять на восприимчивость бактерий к антибиотикам.

Фторхинолон ципрофлоксацин является важным и широко используемым антибиотиком. Действие ципрофлоксацина связано с подавлением активности топоизомераз II и IV, что приводит к нарушению репликации ДНК, возникновению двухнитевых разрывов и гибели бактериальных клеток [5]. Повреждение ДНК фторхинолонами также вызывает индукцию SOS-ответа у *Escherichia coli* [6].

Поэтому целью данного исследования было изучение изменения уровня внутриклеточного (Cys_{in}) цистеина и экспрессии гена *sulA*, входящего в состав SOS-системы, при действии ципрофлоксацина (ЦФ) на *E. coli*, растущую на богатой и минимальной средах.

Культуру *E. coli* BW25113 (родитель, дикий тип) и мутантный штамм JW2663 ($\Delta gshA$), лишенный глутатиона, выращивали на минимальной среде M9 с 0.2% глюкозой и на богатой среде LB-Miller в колбах 250-мл на шейкере (37 °C, 150 об/мин) до OD₆₀₀ 0.4, затем вносили антибиотик – ЦФ 0,3 мкг/мл, и инкубировали в течение 2 часов. Цистеин определяли по методу Gaitonde [7]. Индукцию SOS-ответа оценивали по методу Миллера [8], используя слияние гена *sulA* с репортерным геном *lacZ*, кодирующим фермент β -галактозидазу.

Были определены базовые уровни внутриклеточного цистеина у исследуемых штаммов *E. coli*, растущих на минимальной и богатой средах. Результаты приведены в таблице:

Таблица – Базовый уровень внутриклеточного цистеина у *E. coli*, растущей на разных средах

Штамм <i>E. coli</i>	Количество цистеина (μМ цистеина / OD ₆₀₀)	
	среда M9	среда LB-Miller
BW25113 (родитель, дикий тип)	0,057±0,002	0,237±0,006
JW2663 ($\Delta gshA$)	0,026±0,001	0,177±0,003

Исходные значения Cys_{in} у родительского штамма были в 2,2 и 1,3 раза выше на среде M9 и LB соответственно, по сравнению с *gshA*-мутантом.

На среде M9 обработка ЦФ *gshA*-мутанта уже через 15 минут приводила к увеличению концентрации внутриклеточного цистеина, и через 2 часа инкубации значения Cys_{in} были в 1,9 раз выше, чем у родителя (рис. 1А). Добавление антибиотика незначительно влияло на уровень цистеина у родительского штамма.

На среде LB через 30 минут обработки антибиотиком наблюдалось повышение концентрации цистеина в клетках дикого типа в 1,3 раза, и через 90 минут в 1,4 раза у мутанта, по сравнению с начальным уровнем (рис. 1Б).

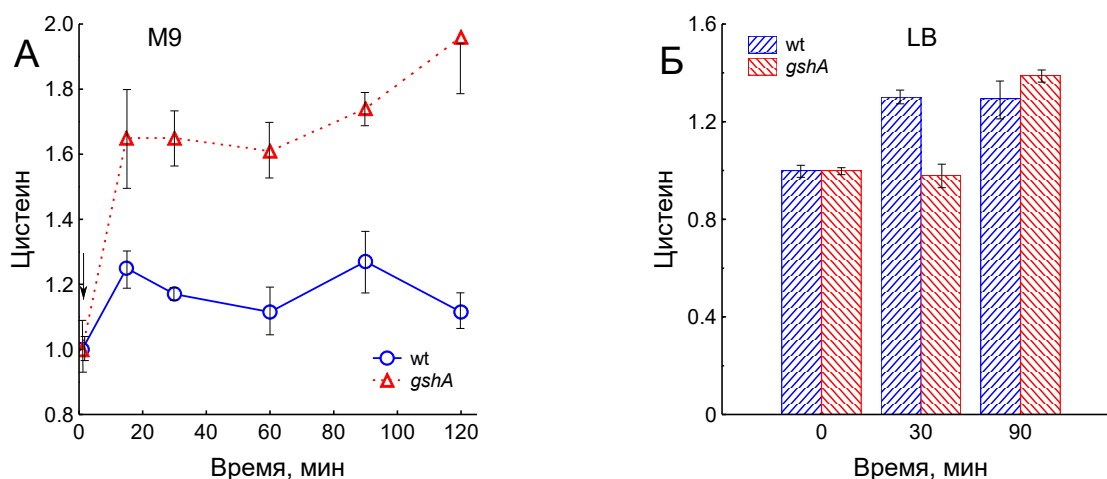


Рис. 1. Влияние обработки ЦФ на изменение уровня цистеина у *E. coli*, растущей на разных средах: А – на среде М9; Б – на среде LB (результаты представлены в долях от начального уровня)

Обработка клеток *E. coli* фторхинолонами вызывает индукцию SOS-ответа. Ген *sulA*, являясь частью SOS-системы, кодирует ингибитор клеточных делений [9]. Показано, что на среде М9 добавление 0,3 мкг/мл ЦФ индуцирует экспрессию гена *sulA* как у родителя, так и у мутанта по сравнению с необработанными клетками (рис. 2А), что соответствует результатам, полученным ранее [5]. Максимум активности β-галактозидазы у мутанта наблюдался через 60 минут воздействия антибиотика и был в 1,58 раза выше, чем у дикого типа.

На среде LB добавление 0,3 мкг/мл ЦФ также повышало активность β-галактозидазы у обоих штаммов, по сравнению с контролем. У мутанта экспрессия гена *sulA* была наиболее интенсивной спустя 80 минут экспозиции к антибиотику, и в 1,26 раз выше, чем на среде М9 (рис. 2Б), что может быть связано с высоким содержанием цистеина в составе среды LB.

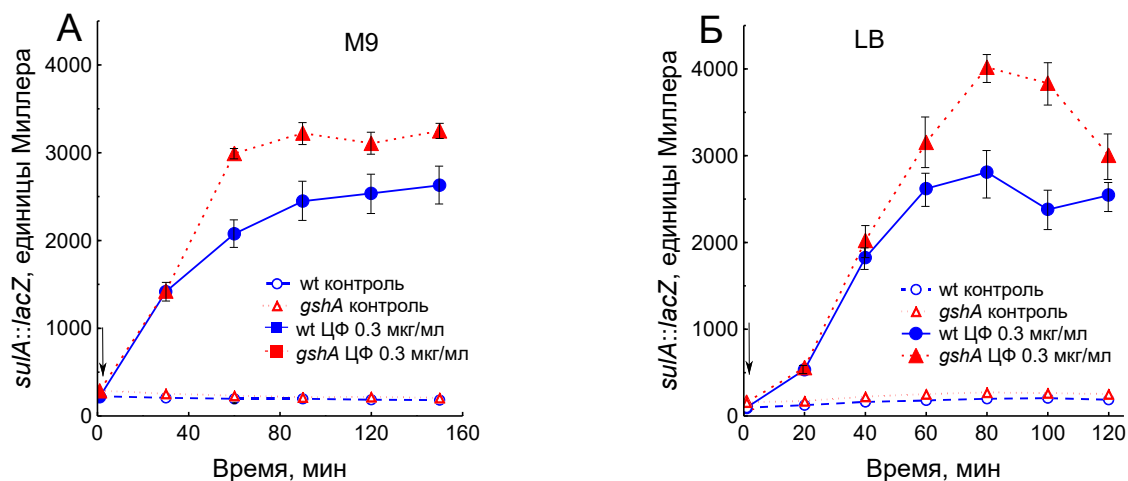


Рис. 2. Влияние обработки ЦФ на изменение экспрессии гена *sulA* у *E. coli*, растущей на разных средах: А – на среде М9; Б – на среде LB

Таким образом, изменение концентрации цистеина в клетках при нарушении его гомеостаза, вероятно вносит свой вклад в механизмы летальности ципрофлоксацина у *gshA*-мутанта, за счет дополнительных повреждений ДНК. На основании этого следует, что, воздействуя на механизмы гомеостаза цистеина, возможно влиять на эффективность антибиотиков.

Исследование выполнено в соответствии с государственным заданием АААА-А19-119112290009-1 и при поддержке гранта Российского научного фонда № 22-14-00093.

Библиографический список

1. Kohanski M.A. [et al.] A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics // *Cell*. – 2007. – V. 130(5). – P. 797–810.
2. Imlay J.A., Park S. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the Fenton reaction // *J. Bacteriol.* – 2003. V. 185. P. 1942–1950.
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. Imlay KRC. [et al.] The physiological roles and adverse effects of the two cystine importers of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 2015. – V. 197. – P. 3629–3644.
5. 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.
6. 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.
7. Gaitonde M.K. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids // *Biochem.* – 1967. – V. 104. – P. 627–633.
8. Miller J.H. Experiments in Molecular Genetics // Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. – 1972.
9. Cole ST. Characterisation of the promoter for the LexA regulated *sulA* gene of *Escherichia coli* // *Mol. Gen. Genet.* – 1983. – V. 189(3). – P. 400–404.

ОПТИМИЗАЦИЯ МИНЕРАЛЬНОЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ РОДОКОККОВ И ИХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Сыровацкая Г.А.¹, Максимова Ю.Г.^{1,2}

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

² Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Впервые из щелочной, высокоминерализованной, экстремальной среды антропогенного происхождения выделены нитрилгидролизующие алкалотолерантные штаммы *Rhodococcus qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э. Исследованы бактерицидная/бактериостатическая концентрации алифатических нитрилов и влияние ростовых факторов на амидазную активность бактерий. Активность амидазы *R. erythropolis* 6Э достигала 10 ммоль/г/ч при концентрации ацетонитрила в среде 9,12 мМ, тогда как активность *R. qingshengii* 5Э не превышала 4 ммоль/г/ч. Нитрилы не ингибировали рост изученных штаммов в концентрации, находящейся на пределе их растворимости.

Ключевые слова: культивирование, алифатические нитрилы, амидаза, родококки

OPTIMIZATION OF THE MINERAL MEDIUM FOR CULTIVATION OF NITRILE HYDROLYZING ALKALOTOLERANT RHODOCOCCLUS AND THEIR PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PROPERTIES

Syrovatskaya G.A.¹, Maksimova Yu.G.^{1,2}

¹ 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

² Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. For the first time, nitrile-hydrolyzing alkali-tolerant *Rhodococcus qingshengii* 5Э and *R. erythropolis* 6Э were isolated from an alkaline, highly mineralized, extreme environment of anthropogenic origin. Bactericidal/bacteriostatic residues of aliphatic nitriles and the influence of growth factors on amidase activity were studied. The amidase activity of *R. erythropolis* 6Э reached 10 mmol/g/h at an acetonitrile content in the medium of 9.12 mM, while the activity of *R. qingshengii* 5Э did not exceed 4 mmol/g/h. Nitriles do not inhibit the growth of the studied strains in healthcare, reaching their solubility limit.

Keywords: cultivation, aliphatic nitriles, amidase, rhodococci

Введение

Нитрилы – это группа органических соединений с циано-группой $C\equiv N$ в составе. Существуют алифатические предельные, непредельные и ароматические нитрилы [1]. В большинстве они гидрофобны и имеют природное происхождение. Кроме того, они попадают в окружающую среду с отходами химической промышленности [2]. Благодаря функциональной группе с тройной ненасыщенной связью нитрилы применяют в качестве мономеров радикально-цепной полимеризации. Они задействованы при производстве таких полимеров как акрилонитрил, адипонитрил, полиакрилонитрил и нейлон-66, относятся к интермедиатам лекарственных препаратов (хиральны синтоны) и самостоятельным препаратам. Среди нитрилов встречаются гербициды, промежуточные продукты синтеза аминов, амидов, амидинов, карбоновых кислот, сложных эфиров, альдегидов, кетонов и гетероциклических соединений. Нитрилы широко применяют как растворители (ацетонитрил) и экстрагенты [3,4].

Большинство нитрилов высоко токсичны, обладают мутагенными и канцерогенными свойствами [2]. Токсичность органических соединений можно разделить на две категории: обратимая неспецифическая токсичность (около 70% всех промышленных органических химикатов) и необратимая специфическая токсичность. Неспецифическое воздействие приводит к нековалентным взаимодействиям, включая нарушение ван-дер-ваальсовых взаимодействий между липидными и/или белковыми компонентами внутри мембраны. В случае специфической токсичности токсикант вызывает ковалентное взаимодействие с биологической системой. Токсиканты, обладающие специфической токсичностью, также называются реактивными токсикантами и делятся на электрофильные, проэлектрофильные, цианогенные и множественные, в зависимости от механизмов. По классификации Липника нитрилы относятся к категории реактивных токсикантов (цианогенных). Токсичность нитрилов обусловлена прежде всего высвобождением ионов цианида в результате гидролиза. Свободные анионы ингибируют аэробное дыхание путем связывания металлопротеинов, таких как цитохромы, и чрезвычайно токсичны для животных в высоких концентрациях. [5,6].

Существуют ферменты, обладающие способностью восстанавливать нитрильную связь между углеродом и азотом. Микроорганизмы, синтезирующие нитрилгидролизующие ферменты, обладают способностью использовать нитрилы в качестве источника питания, конвертируя нитрилы до менее токсичных карбоновых кислот. Процесс протекает либо при участии нитрилазы, одностадийно, либо по нитрилгидратазно-амидазному пути с промежуточным продуктом амидом. Несмотря на аналогичную функциональность, нитрилазы и нитрилгидратазы имеют низкое сходство аминокислотных последовательностей. В настоящее время нитрилгидратазы успешно применяются в промышленности для производства акриламида, акрилата аммония, никотинамида и т.д. [6]. Применение неоникотиноидных инсектицидов в сельском хозяйстве вызывает ряд экологических и экологических проблем. Микробная деградация ацетамиприда и тиаклоприда с помощью нитрилгидратазы снижает негативные последствия их применения [7]. Нитрилазы также полезны для промышленного применения или биоремедиации [6]. Нитрилазы более устойчивы к действию продуктов спонтанного гидролиза циангидринов. Уже разработан промышленный процесс получения гликолевой кислоты из гликолонитрила с помощью нитрилазы.

Нитрилазы также позволяют получать оптически чистые изомеры альфа-оксикислот. Ярким примером двухстадийного гидролиза является синтез оптически активных 2-метил и 2,2-диметилциклопропанкарбоновых кислот и их производных. Эти соединения являются ключевыми интермедиатами для синтеза курацина – активного антимитотического агента и циластатина – ингибитора почечной дегидропептидазы, обычно вводимого в организм

совместно с антибиотиками, пинемом и карбопинемом для предотвращения их деградации в почках [8]. Ферментативный гидролиз нитрилов имеет преимущества перед химическим способом благодаря энергетической эффективности, стереоселективности и экологической безопасности процесса [9].

Поскольку очищенные ферменты не стабильны, цельноклеточная ферментация остаётся востребованной в промышленной сфере. Биокатализ протекает в «физиологических» условиях реакции, однако, для внедрения в производство возникает потребность в устойчивых продуцентах, адаптированных к широкому диапазону pH, высоким температурам, присутствию солей и органическим растворителям. Таким образом, поиск микроорганизмов и их ферментов из экстремальных сред обитания актуален для биотехнологии [10,11].

Цель работы – исследование влияния повышенных концентраций алифатических нитрилов на *Rhodococcus qingshengii* 5Э и *Rhodococcus erythropolis* 6Э и оптимизация сред культивирования по источнику азота и углерода.

Материалы и методы

В действующем шламонакопителе АО «Березниковский содовый завод» (Пермский край) из донных отложений с pH 11 и грунта старой карты шламохранилища с глубины 5 см на минеральной среде с 0,25% ацетонитрилом либо 10 мМ ацетамидом в качестве единственного источника углерода и энергии выделены изоляты нитрил- и амидгидролизующих бактерий. Штаммы идентифицированы методом секвенирования 16S рРНК как *R. qingshengii* 5Э (ИЭГМ 1416) и *R. erythropolis* 6Э (ИЭГМ 1417).

Изучено влияние различных концентраций источников углерода на рост и амидазную активность клеток *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э. Предварительно штаммы выращивали в 100 мл жидкой минеральной среды с составом (г/л): KH_2PO_4 – 1.0, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 3.7, NaCl – 0.5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.005, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.01 с добавлением 0,1%; 0,5%, 1% и 1,5% сорбита для *R. qingshengii* 5Э, а также 5, 25, 50 и 100 мМ ацетамида для *R. erythropolis* 6Э. Ацетонитрил в концентрации 0,05% использован как источник азота.

Для определения влияния концентраций источника азота на рост и амидазную активность штаммов в 100 мл жидкой минеральной среды указанного выше состава с 0,1% сорбита для *R. qingshengii* 5Э и 0,1 М ацетамида для *R. erythropolis* 6Э вносили 4,56; 9,12; 13,68 и 18,24 мМ ацетонитрила.

Штаммы культивировали до стационарной фазы при 22°C на шейкере со скоростью вращения 120 об/мин. Определяли оптическую плотность среды на фотоэлектроколориметре КФК-3 (Россия) при λ 540 нм.

Амидазную активность оценивали по продукту реакции – акриловой кислоте. Биомассу центрифугировали, промывали фосфатным буфером (pH 7,2) и вносили в реакционную среду объёмом 1 мл с 100 мМ акриламида. Через 2 часа вносили 50 мкл HCl для остановки реакции. Концентрацию акриловой кислоты и акриламида определяли методом ВЭЖХ на хроматографе Infinity II JC 1260 (Agilent, Германия) с колонкой (250×4.6 мм) Synergi 4u Hydro–RP 80A. В качестве подвижной фазы использовали 25 мМ NaH_2PO_4 , скорость потока 0,75 мл/мин при 25°C.

Бактериостатическое/бактерицидное действие алифатического предельного (ацетонитрил) и непредельного (акрилонитрил) нитрилов определяли следующим образом. В 96-луночный плоскодонный планшет с жидкой минеральной средой и ростовыми факторами вносили от 0,5 до 1,5 М ацетонитрила и от 0,5 до 1,5 М акрилонитрила, инокулировали 10 мкл суспензии *R. qingshengii* 5Э и *R. erythropolis* 6Э и инкубировали при 30°C. Бактериостатическое влияние учитывали путем посева на LB-агар через 7–10 суток, бактерицидное

оценивали по оптической плотности на планшетном спектрофотометре Infinite M1000 (Тесан, Швейцария) через 7–10 суток инкубирования.

Результаты и обсуждение

Наибольшее накопление биомассы ($ОП_{540}=0,805$) и максимальная активность амидазы (2,8 ммоль/г/ч) у *R. qingshengii* 5Э отмечены при концентрации сорбита 1,5% в среде культивирования. У *R. erythropolis* 6Э максимальный выход биомассы ($ОП_{540}=0,916$) зафиксирован при 100 мМ ацетамида в среде, а наибольшая активность (7,5 ммоль/г/ч) при 50 мМ ацетамида.

Изучили влияние различных концентраций ацетонитрила как единственного источника азота на накопление биомассы и амидазную активность родококков. Накопление биомассы до $ОП_{540}=0,856$ и активность фермента, равная 4 ммоль/г/ч, у *R. qingshengii* 5Э наблюдались при 18,24 мМ и 4,56 мМ ацетонитрила соответственно (рис. 1). *R. erythropolis* 6Э при 9,12 мМ ацетонитрила в среде накапливал биомассу до $ОП_{540}=0,750$ и проявлял амидазную активность, равную 10,1 ммоль/г/ч (рис. 2).

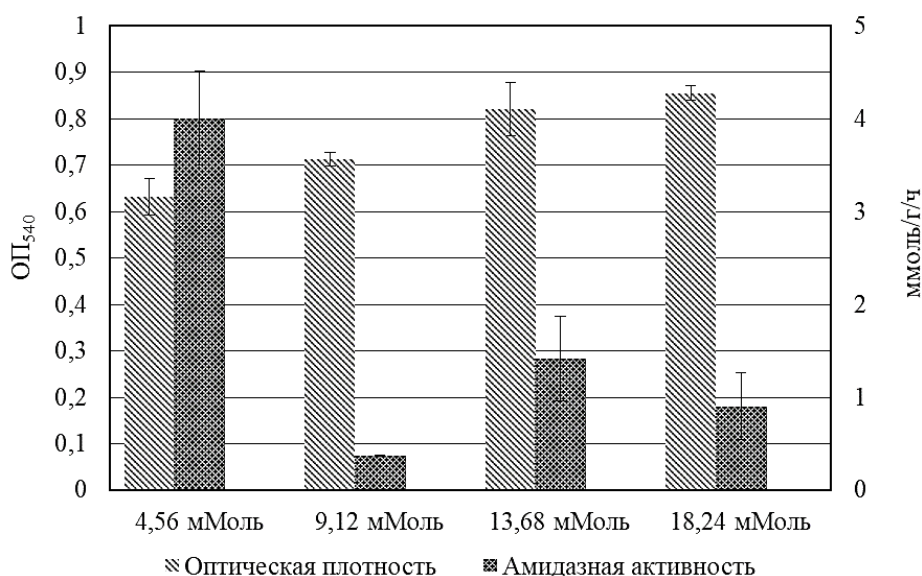


Рис. 1. Влияние различных концентраций ацетонитрила в среде на накопление биомассы и активность амидазы *R. qingshengii* 5Э

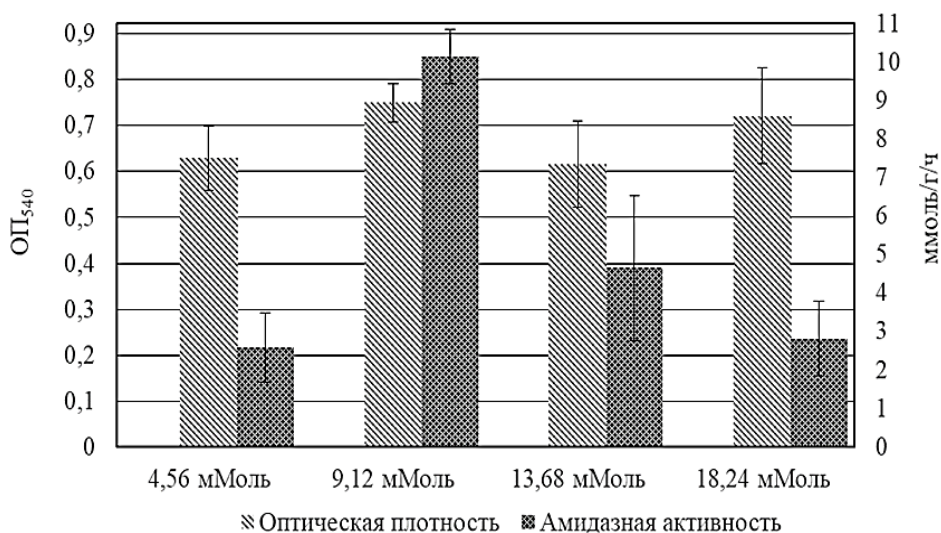


Рис. 2. Влияние различных концентраций ацетонитрила в среде на накопление биомассы и активность амидазы *R. erythropolis* 6Э

Для определения минимальных ингибирующих (МИК) и минимальных подавляющих концентраций (МПК) нитрилов в жидкую среду LB (и в минеральную среду с субстратами роста) добавляли повышающиеся концентрации акрило- и ацетонитрила. МИК и МПК не выявлены даже при насыщающей концентрации нитрилов (Табл.).

Таблица – Влияние высоких концентраций нитрилов на рост родококков

М	Биомасса, ОП ₅₄₀			
	<i>R. qingshengii</i> 5Э		<i>R. erythropolis</i> 6Э	
	Ацетонитрил	Акрилонитрил	Ацетонитрил	Акрилонитрил
0,5	1,148±0,066	0,958±0,051	1,007±0,026	0,818±0,048
0,75	1,083±0,039	0,840±0,071	0,995±0,045	0,889±0,022
1	1,074±0,093	0,837±0,037	0,965±0,038	0,784±0,062
1,25	1,096±0,061	0,826±0,061	0,993±0,038	0,836±0,073
1,5	1,039±0,059	0,900±0,043	1,049±0,035	0,772±0,026

Заключение

R. qingshengii 5Э и *R. erythropolis* 6Э, выделенные нами из экстремального биотопа с повышенной щелочностью и минерализацией, являются галоалкалотолерантными актино-бактериями. Оптимальная концентрация сорбита как источника углерода для *R. qingshengii* 5Э составила 1,5%. *R. erythropolis* 6Э накапливает максимальную биомассу при 100 мМ ацетамида в среде, а максимальная амидазная активность отмечается при 50 мМ ацетамида.

Максимальная биомасса *R. qingshengii* 5Э накапливалась при 18,24 мМ ацетонитрила в среде и наибольшая амидазная активность проявлялась в присутствии 4,56 мМ этого нитрила. У *R. erythropolis* 6Э повышенный выход биомассы и активность фермента зафиксированы при 9,12 мМ ацетонитрила в среде.

Рост родококков не был ингибирован в присутствии ацето- и акрилонитрила в концентрациях, соответствующих пределу растворимости. Экстремально высокая устойчивость штаммов к нитрилам может объясняться их адаптивной способностью, связанной с галотолерантностью.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта № С-26/507. Идентификация нитрилгидролизующих бактерий была выполнена в рамках темы «Поиск и селекция новых перспективных микроорганизмов для целей биотехнологии. Создание иммунохимических диагностических систем», номер госрегистрации 122010800029-1.

Библиографический список

1. Максимова А.В., Кузнецова М.В., Демаков В.А. Влияние синтетических нитрилов на морфологию и жизнеспособность некоторых видов бактерий // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2016. – № 6. – С. 631–637.
2. Поляк Ю.М., Сухаревич В.И. Почвенные ферменты и загрязнение почв: биodeградация, биоремедиация, биоиндикация // Агрохимия. – 2020, – № 3. – С. 83–93.

3. Rakshit A., Dhara H.N., Sahoo A.K., Patel B.K. The Renaissance of Organo Nitriles in Organic Synthesis // *Chemistry–An Asian Journal*. – 2022. – V. 17. – № 21. – P. 1–41.
4. Pollak P., Elvers B., Hawklins S., Schulz G. Ullman's encyclopedia of industrial chemistry// Wiley-VCH, Weinheim, 1991. – V. 17. – P. 363–376.
5. Huang C.P., Wang Y.J., Chen C.Y. Toxicity and quantitative structure–activity relationships of nitriles based on *Pseudokirchneriella subcapitata* // *Ecotoxicology and environmental safety*. – 2007. – V. 67. – № 3. – P. 439–446.
6. Schwartz S.L., Rangel L.T., Payette J.G., Fournier A G.P. Proterozoic microbial origin of extant cyanide-hydrolyzing enzyme diversity // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – V. 14. – P. 1130310.
7. Sun S. et al. Nitrile hydratases: from industrial application to acetamiprid and thiacloprid degradation // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2021. – V. 69. – № 36. – P. 10440–10449.
8. Дебабов В.Г., Яненко Г.А. Биокаталитический гидролиз нитрилов // *Обзорный журнал по химии*. – 2011. – Т. 1, № 4. – С. 376–394.
9. Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M. G. Dispelling the myths--biocatalysis in industrial synthesis // *Science*. – 2003. – V. 299. – № 5613. – P. 1694–1697.
10. Морозкина Е.В., Слуцкая Э.С., Фёдорова Т.В., Тугай Т.И., Голубева Л.И., Королёва О.В. Экстремофильные микроорганизмы: биохимическая адаптация и биотехнологическое применение // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2010. – Т. 46, № 1 – С. 5–20.
11. Cheng Z., Xia Y., Zhou Z. Recent advances and promises in nitrile hydratase: from mechanism to industrial applications // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2020. – V. 8. – P. 352.

УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОМИЦЕТОВ ГОРОДСКИХ И ТЕХНОГЕННЫХ ПОЧВ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ

Чайкина А.П., Горовцов А.В.

Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация. В работе изучена устойчивость штаммов актиномицетов, выделенных из техногенных и городских почв г. Ростов-на-Дону, к тяжелым металлам: Zn, Cu, Cd, Co, Pb. Большинство штаммов являлись представителями рода *Streptomyces*. Установлены минимальные ингибирующие концентрации (МИК) Zn, Cu, Cd, Co, Pb для большинства штаммов: МИК Cu варьировала в пределах 15-30 мг/кг; МИК Co – 50-250 мг/кг; МИК Zn составила более 250 мг/кг; МИК Cd – 15 мг/кг.

Ключевые слова: *Streptomyces*, тяжелые металлы, минимальные ингибирующие концентрации

TOLERANCE OF ACTINOMYCETES IN URBAN AND TECHNOGENIC SOILS TO HEAVY METALS

Chaykina A.P., Gorovtsov A.V.

Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

Abstract. Actinomycetes strains isolated from technogenic and urban soils were tested for resistance to heavy metals: Zn, Cu, Cd, Co, Pb. Most strains belonged to the genus *Streptomyces*. Minimal inhibitory concentrations of Zn, Cu, Cd, Co, Pb was found for most strains: the MIC of Cu varied between 15-30 mg/kg; the MIC of Co – 50-250 mg/kg; the MIC of Zn was 1150 mg/kg; the MIC of Cd – 15 mg/kg.

Keywords: *Streptomyces*, heavy metals, minimal inhibitory concentrations

Актиномицеты являются широкой и разнообразной группой микроорганизмов. Они играют важную экологическую роль в почве, внося большой вклад в круговорот органического вещества, разлагают сложные органические соединения, в том числе антропогенные загрязнители, а также способны сорбировать тяжелые металлы, снижая их биодоступность. Поэтому из почв зон высокой антропогенной нагрузки потенциально можно выделить штаммы актиномицетов, резистентные к высоким концентрациям тяжелых металлов.

Высокая устойчивость к тяжелым металлам и вероятная способность к их биоаккумуляции и биосорбции открывает перспективу использования ТМ-резистентных актиномицетов для биоремедиации загрязненных территорий.

Доминирующей группой актиномицетов в почве являются представители рода *Streptomyces*. По данным И. Г. Широких и соавторов, в условиях загрязнения почв тяжелыми металлами именно стрептомицеты являются доминирующей группой бактерий, тогда как в

ненарушенных почвах относительная доля актинобактерий составляет только 20% от всего микробного сообщества. Морфологические и биохимические особенности позволяют актиномицетам колонизировать новые экологические ниши в экстремальных условиях окружающей среды, включая интенсивное загрязнение ТМ. Стрептомицеты выработали ряд специальных стратегий, позволяющих им успешно существовать в условиях повышенного содержания ТМ в среде [1].

Для городских антропогенно-преобразованных почвах г. Ростова-на-Дону характерно превышение ПДК подвижных форм цинка и свинца, а по характеру распределения цинка выделяются локальные геохимические аномалии вокруг производств по изготовлению лакокрасочной продукции и выпуску цинковых белил (ЗАО “Эмпилс”), где содержание этого металла значительно превышает фон [2].

Материалом в работе служили пробы городских почв Ростова-на-Дону, а также пробы, отобранные на территории пересохшего озера Атаманского, расположенного в Каменском районе Ростовской области. Это озеро на протяжении нескольких десятилетий XX века использовалось в качестве резервуара для сброса промышленных стоков химического завода. Техноземы данной территории отличаются чрезвычайно высоким уровнем загрязнения лабильными формами тяжелых металлов (Cr, Ni, Cu, Zn, Pb, Cd), а содержание валового цинка превышает ПДК до 661 раза, валового свинца – до 50 раз [3]. Забор интегральных проб осуществлялся методом конверта с глубины 0-10 см. В городе пробы отбирались в центре города: ул. Московская, пр. Будёновский, на пересечении ул. Красноармейская и пр. Ворошиловский; одна точка отбора проб была расположена в импактной зоне лакокрасочного завода ЗАО «Эмпилс», где концентрации цинка в индустризидах достигают 1000 мг/кг (4,5 ОДК), а концентрации свинца превышают местный фон [4].

Выделение актиномицетов производили методом посева «газоном» из 10^{-4} почвенного разведения на минеральный агар Гаузе. Посевы инкубировались 7 суток при 30 °С. На 21 день культивирования культуры микроскопировали для определения характера спороношения и родовой принадлежности. Для определения минимальных ингибирующих концентраций тяжелых металлов (Zn, Cu, Pb, Cd, Co) для каждого из выделенных штаммов использовалась модификация метода серийных разведений в агаре. Для этого готовились стоковые растворы растворимых солей каждого из металлов ($ZnSO_4$, $CuCl_2$, $PbNO_3$, $CdCl_2$, $CoCl_2$) концентрацией, пропорциональной 50 ПДК подвижной формы соответствующего металла в почве. В качестве питательной среды использовали овсяный агар. В стерильный агар после автоклавирования вносился ряд концентраций солей тяжелых металлов, соответствующий 1 ПДК, 3 ПДК, 5 ПДК, 10 ПДК и 50 ПДК металла в почве [5]. ПДК подвижной формы кадмия официально не определено в России, поэтому ориентировались на ПДК Cd для сельскохозяйственных почв Китая (0,3 мг/кг) [6].

Посев производили методом реплики, добавляя в лунку по 50 мкл суспензии спор каждого изолята, засевая последовательно ряд чашек от меньшей к большей концентрации каждого металла (рис. 1). Всего из 29 изолятов 28 принадлежали роду *Streptomyces*, и 1 – роду *Streptosporangium*. Выделенные штаммы актиномицетов в целом были более чувствительны к кобальту, меди и цинку, чем к кадмию и свинцу.

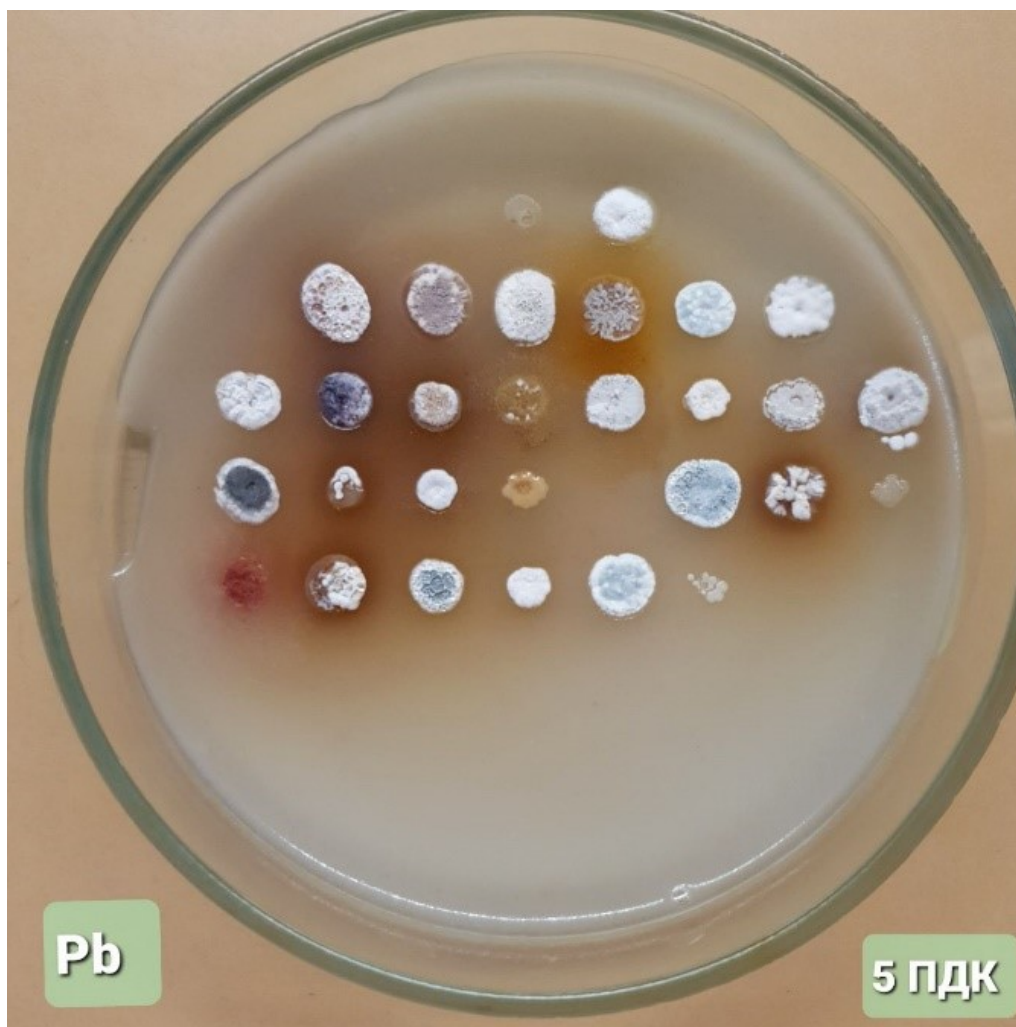


Рис. 1. Штаммы актиномицетов, посеянные репликой на питательную среду с содержанием свинца 30 мг/кг

По значениям введенного показателя роста каждого изолята для каждого ТМ были построены тепловые карты (рис. 2), где зеленым цветом обозначен хороший рост с формированием воздушного мицелия, желтым и красным цветами обозначены рост средней и слабой интенсивности без формирования спорового слоя, черным обозначено отсутствие роста – минимальная ингибирующая концентрация.

Рост большинства изолятов угнетался при концентрациях кобальта 50 мг/кг; к концентрации кобальта 250 мг/кг ни один изолят устойчив не был. Рост большинства изолятов ингибировали концентрации меди 15 мг/кг и 30 мг/кг; концентрация меди 150 мг/кг оказалась ингибирующей для всех штаммов. Для цинка концентрация 1150 мг/кг (50 ПДК), также оказалась ингибирующей для всех штаммов. МИК кадмия практически для всех штаммов оказалась 15 мг/кг (50 ПДК).

Для большинства штаммов МИК цинка была определена как 1150 мг/кг, что соответствует 50 ПДК Zn в почве; МИК кобальта – 50 мг/кг либо 250 мг/кг, что соответствует 10 и 50 ПДК Co в почве соответственно. МИК Cu сильно варьировали для всех штаммов.

Наиболее устойчивым оказался штамм стептомицетов ВК6, выделенный из урбанозема центра города. Для него определенная МИК Zn составила более 230 мг/кг, МИК Cu – более 30 мг/кг, МИК Co – более 50 мг/кг. Такие значения устойчивости к тяжелым металлам

сопоставимы с результатами М. Сімерманова и соавторов, где МИК Zn и МИК Cu были определены как 250 мг/кг на плотной питательной среде для наиболее устойчивых представителей рода *Streptomyces*, выделенных из почв вблизи шахт [7]. Средняя чувствительность штаммов, выделенных из разных типов антропогенно-нарушенных почв, не отличалась.

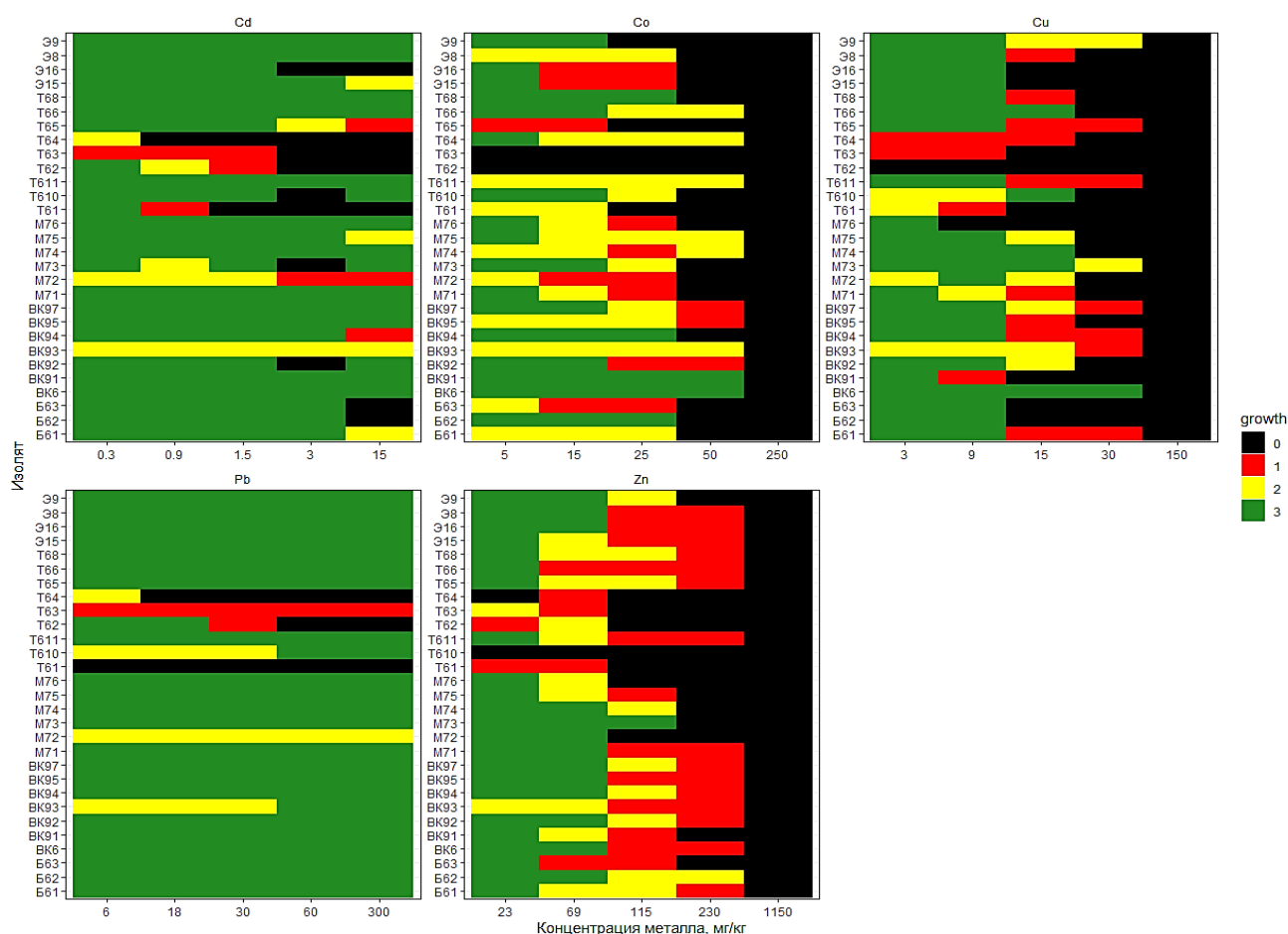


Рис. 2. Интенсивность роста штаммов в присутствии разных концентраций тяжелых металлов

Исследование выполнено при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, соглашение № 075-15-2023-587.

Библиографический список

1. Широких И.Г. Комплексы актиномицетов в почвах промышленной и селитебной зон Кирова / И.Г. Широких, Е.С. Соловьева, Т.Я. Ашихмина // Почвоведение. – 2014. – № 2. – С. 203.
2. Генотоксичность и загрязнение тяжелыми металлами естественных и антропогенно-преобразованных почв Ростова-на-Дону / С.Н. Горбов, О.С. Безуглова, Т.В. Вардуни [и др.] // Почвоведение. – 2015. – № 12. – С. 1519.
3. Эколого-геохимические исследования техногенных почв в пойменных ландшафтах Северского Донца (бассейн Нижнего Дона) / Т.В. Бауэр, В.Г. Линник, Т.М. Минкина [и др.] // Геохимия. – 2018. – № 10. – С. 956–966.

4. Шишкина Д. Тяжелые металлы в почвах Ростова-на-Дону. – Ростов-н/Д: изд. ЮФУ, 2017. – 98 с.
5. ГОСТ Р 53381-2009. Почвы и грунты. Грунты питательные. Технические условия.
6. Liu Q., Liu Y., Zhang M. Mercury and cadmium contamination in traffic soil of Beijing, China // Bulletin of environmental contamination and toxicology. – 2012. – V. 88. – P. 154–157.
7. Cimermanova M., Pristas P., Piknova M. Biodiversity of actinomycetes from heavy metal contaminated technosols // Microorganisms. – 2021. – Т. 9. – № 8. – С. 1635.

ОЦЕНКА РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ-НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ С УЧЕТОМ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КРИТЕРИЯ

Швеин А.В.¹, Куюкина М.С.^{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. Биоремедиация – один из самых эффективных и безопасных путей восстановления загрязненных почв. Однако, используемые для этого микроорганизмы могут нести в себе опасные для здоровья человека гены устойчивости к антибиотикам (ARG). В работе предпринята попытка классификации ARG, обнаруженных у актинобактерий- нефтедеструкторов, по классам риска на основе биоинформационного omics-based подхода с учетом экологического критерия.

Ключевые слова: биоремедиация, антибиотикорезистентность, экологический риск, актинобактерии

RISK ASSESSMENT OF ANTIBIOTIC RESISTANCE GENES FROM ACTINOBACTERIA-OIL DESTRUCTORS USING THE ECOLOGICAL CRITERION

Shvein A.V.¹, Kuyukina M.S.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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. Bioremediation is one of the most effective and safe ways to restore polluted soils. However, the microorganisms used may carry antibiotic resistance genes (ARG) that are dangerous to human health. The paper attempts to classify the APGS found in actinobacteria- oil destructors by risk classes based on the bioinformatic omics-based approach taking into account the environmental criterion.

Keywords: bioremediation, antibiotic resistance, ecological risk, actinobacteria

На сегодняшний день биоремедиация загрязненных нефтяными углеводородами почв является одним из наиболее безопасных и эффективных методов их восстановления. При этом очистка почв осуществляется путем естественного процесса биodeградации загрязнителей, осуществляемого природными бактериями-нефтедеструкторами, что снижает нагрузку на экосистему и потребление природных ресурсов [1].

В последнее время сильно выросло использование антибиотиков при лечении заболеваний человека и сельскохозяйственных животных [2]. Согласно прогнозу [3] количество антибиотиков, используемых в мире, удвоится к 2030 г. по сравнению с 2015 г.

В результате этого процесса возрастает и число бактерий устойчивых к антибиотикам (Antibiotic Resistance Bacteria – ARB), несущих гены резистентности к антибиотикам (Antibiotic Resistance Genes – ARG) [4]. Устойчивость к антибиотическим веществам возрастает не только у клинических штаммов, но и компонентов природных микробиоценозов в результате распространения ARB и ARG в экосистемах, загрязненных в результате антропогенного воздействия [1]. Таким образом, актуальной проблемой является антибиотикорезистентность штаммов микроорганизмов, используемых в составе биопрепаратов для биоремедиации загрязненных почв.

В результате анализа генетических детерминант антибиотикорезистентности в опубликованных (GenBank, NCIMB) геномах актинобактерий – известных нефтедеструкторов установлено [1], что представители актинобактериальных родов, играющих ключевую роль в биоремедиации, в частности *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia* и *Rhodococcus*, являются потенциальными хозяевами механизмов устойчивости к антибиотикам. При этом установлено, что не только патогенные и условно-патогенные виды актинобактерий (например, *Corynebacterium diphtheria*, *Gordonia terrae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia brasiliensis*, *Rhodococcus equi*), но и типичные почвенные обитатели, не ассоциированные с патогенностью, обладают генетическими детерминантами антибиотикорезистентности.

В данной работе нами предпринята попытка на основании биоинформационного анализа выявить у актинобактерий те ARG, которые обладают значительным потенциалом для создания угрозы общественному здоровью. Однако определить, какие именно ARG представляют угрозу для здоровья населения, непросто, поскольку многие ассоциированные с антибиотикоустойчивостью генные кластеры широко распространены у актинобактерий, выполняя важные биологические функции, такие как отток веществ из клеток или межклеточная сигнализация, и лишь небольшая часть этих генов представляет серьезную угрозу здоровью человека.

Таким образом, выявление генов резистентности “высокого риска” среди многочисленных предполагаемых ARG является важным шагом для решения глобальной проблемы распространения антибиотикорезистентности.

В соответствии с недавно предложенным подходом [5], мы применили критерий микробной экологии для ранжирования экологических рисков ARG, обнаруженных у актинобактерий. Система оценки рисков ARG представляет собой дерево решений, основанное на оценке трех критериев: (1) присутствие в среде обитания человека, (2) мобильность генов (способность к горизонтальному переносу) и (3) патогенность хозяина – наличие/отсутствие у шести высоковирулентных и устойчивых к антибиотикам бактериальных патогенов, включая: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp. [6]. Они образуют четыре категории риска: тем ARG, которые не соответствуют первому критерию, присваивается ранг IV (минимальный риск); тем, которые соответствуют первому, но не второму критерию, присваивается ранг III; тем, которые соответствуют первому и второму, но не третьему – ранг II; и тем, которые соответствуют всем трем критериям – ранг I (максимальный риск).

Таблица – Распределение ARG, выделенных из геномов актинобактерий-нефтедеструкторов (желтым выделены гены, гомологи которых относятся к разным рангам экологического риска)

Ранг экологического риска	I	II	III	IV	Н.д.
Гены	<i>acrR (tetR)</i>	<i>mdtH</i>	<i>acrB</i>	<i>marR</i>	<i>rarD</i>
	<i>aph</i>	<i>penA</i>	<i>ampC</i>	<i>sul1</i>	<i>folP</i>
	<i>msrA</i>	<i>mdtG</i>	<i>vanB</i>	<i>carB</i>	<i>folA</i>
	<i>emrB/qacA</i>	<i>tetO</i>	<i>pbp</i>	<i>pbp</i>	<i>pbp5</i>
	<i>mecA</i>	<i>emrD</i>	<i>acrA</i>	<i>mefA</i>	<i>tnpA</i>
	<i>bacA</i>	<i>tetW</i>	<i>bacA</i>	<i>bacA</i>	<i>strA</i>
	<i>tetM</i>	<i>aadA9</i>	<i>tetA</i>	<i>tetC</i>	<i>cphA</i>
	<i>floR</i>	<i>cmrA</i>	<i>tetB</i>	<i>pmrA</i>	<i>tolC</i>
	<i>aac</i>		<i>ermA</i>	<i>tetD</i>	<i>oprD</i>
	<i>mdtL</i>			<i>lmrA</i>	<i>cmr</i>
	<i>fosB</i>			<i>vanA</i>	<i>fabK</i>
	<i>mepA</i>			<i>vatD</i>	<i>strB</i>
	<i>cmx</i>			<i>mdtA</i>	<i>catA1</i>
	<i>ermB</i>			<i>pbp2a</i>	<i>aacC</i>
	<i>aadA2</i>			<i>msrC</i>	<i>cflA</i>
	<i>dfrA1</i>			<i>aac(6')-II</i>	<i>spcN</i>
	<i>ermC</i>			<i>qacB</i>	<i>aphA1</i>
	<i>mdtE</i>			<i>sul2</i>	<i>aadA1</i>
	<i>qacH</i>				<i>bla1</i>
	<i>tetL</i>				<i>vanYB</i>
	<i>vgb</i>				<i>aacC4</i>
					<i>fosB2</i>
					<i>nisB</i>
					<i>picA</i>
					<i>pikR1</i>
					<i>pikR2</i>
					<i>sulA</i>
					<i>yceL</i>

Первый критерий учитывает ARG, связанные с микробиомами человека или домашних животных, либо подверженные прямой селекцией на устойчивость к клиническим или ветеринарным антибиотикам. Присутствие таких ARG в среде обитания человека может быть оценено с использованием экологических метагеномных данных, что позволяет классифицировать остальные ARG, которые с меньшей вероятностью будут клинически значимыми, как вызывающие минимальный риск. Следовательно, ARG, не ассоциированные с человеком (ранг IV), с наименьшей вероятностью представляют угрозу для здоровья населения. Среди ассоциированных с человеком немобильные ARG (ранг III), не присутствующие у патогенных микроорганизмов, с меньшей вероятностью способствуют возникновению новой устойчивости у патогенов. Таким образом, остаются мобильные ARG, которые представляют наибольший риск развития новой или множественной лекарственной устойчивости у патогенов в будущем (ранг II – еще не присутствуют у патогенов) и в настоящее время (ранг I – уже присутствуют у патогенов).

Полученные результаты ранжирования ARG (табл.) свидетельствуют о преимущественно высоком риске для здоровья населения обнаруженных у актинобактерий генов антибиотикорезистентности. Так лишь 18 из 55 исследованных ARG были отнесены к IV рангу (минимальный риск), поскольку они не распространены в антропогенных местообитаниях. Показано, что анализ экологического риска осложняется присутствием в метагеномных базах нескольких гомологов одного и того же гена, характеризующихся различным распространением в окружающей среде, что приводит к неоднозначным результатам ранжирования (отнесение ARG одновременно к нескольким рангам). Однако отмеченные проблемы не уменьшают значимости экологического подхода при определении значимого риска антибиотикорезистентных генов для здоровья населения, наряду с традиционно применяемой ВОЗ системой оценки клинической значимости ARG, основанной на патогенности микроорганизма-хозяина и ассоциации ARG с мобильными генетическими элементами [7].

Работа выполнена в рамках госзаданий 123041400034-2, AAAA-A19-119112290008-4 и поддержана грантом МИГ С-26/827.

Библиографический список

1. Cunningham C.J., Kuyukina M.S., Ivshina I.B., Konev A.I., Peshkur T.A., Knapp C.W. Potential risks of antibiotic resistant bacteria and genes in bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils // *Environmental Science: Processes & Impacts*. – 2020. – V.22. – P. 1110–1124.
2. Li S. et al. Emerging soil contamination of antibiotics resistance bacteria (ARB) carrying genes (ARGs): New challenges for soil remediation and conservation // *Environmental Research*. – 2023. – V. 219. – P. 115132.
3. Klein E. et al. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2018. – V.115. – P. 201717295.
4. Zhang D. et al. Metagenomic Survey Reveals More Diverse and Abundant Antibiotic Resistance Genes in Municipal Wastewater Than Hospital Wastewater // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 1–9.
5. Zhang A.-N. et al. An omics-based framework for assessing the health risk of antimicrobial resistance genes // *Nat Commun*. – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 4765.
6. Mulani M.S. et al. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review // *Front Microbiol*. – 2019. – V. 10. – P. 539.
7. World Health Organization. 2019 antibacterial agents in clinical development: an analysis of the antibacterial clinical development pipeline. Geneva: World Health Organization, 2019.

МЕДИЦИНА, ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА, ИММУНОЛОГИЯ

ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНОЙ И МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ

Волкова М.С., Матузин С.Ю., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Хламидиоз и микоплазмоз являются одними из самых распространенных заболеваний у новорожденных. *Chlamydia trachomatis* и *Mycoplasma genitalium* являются внутриклеточными паразитами, способными развиваться внутри организма длительное время, что представляет большую угрозу в формировании хронического воспалительного процесса. Несмотря на различные пути передачи данных возбудителей, наиболее актуальным является вертикальный путь передачи (от матери к плоду).

Ключевые слова: хламидиоз, микоплазмоз, новорожденные, диагностика, заболевания

DIAGNOSIS OF CHLAMYDIA AND MYCOPLASMA INFECTIONS IN NEWBORNS

Volkova M.S., Matuzin S.Y., Soboleva O.M.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. Chlamydia and mycoplasmosis are among the most common diseases in newborns. *Chlamydia trachomatis* and *Mycoplasma genitalium* are intracellular parasites capable of developing inside the body for a long time, which poses a great threat in the formation of a chronic inflammatory process. Despite the different ways of transmitting these pathogens, the most relevant is the vertical transmission path (from mother to fetus).

Keywords: chlamydia, mycoplasmosis, newborns, diagnosis, diseases

Цель исследования. Изучение и анализ современных методов диагностики хламидийной и микоплазменной инфекций у новорожденных.

Характеристика хламидиозов. Наиболее труден в диагностике респираторный хламидиоз, чаще им инфицируются дети в возрасте 5-15 лет, но также данному заболеванию подвергаются и новорожденные [1,2]. Врожденный хламидиоз передается от не проходящей лечение матери через околоплодные воды и хламидии беспрепятственно проникают через плаценту. Чаще новорожденному ребенку ставят диагноз «хламидийный конъюнктивит», поскольку заболевание характеризуется поражением слизистой оболочки глаз [2,3].

Опаснее является легочный хламидиоз. Хламидии, попадая в легкие, могут спровоцировать серьезные заболевания, которые трудно поддаются терапии [2]. Возбудитель передается воздушно-капельным путем, вызывая у детей пневмонию. Если мать заболеет во время беременности, то инфицирование может произойти вертикальным путем [1,4]. Урогениталь-

ный хламидиоз вызывает у девочек вульвит, а у мальчиков уретрит. Данный вид хламидиоза передаются ребенку во время естественных родов [2]. Хламидии также могут передаваться с грудным молоком матери новорожденному ребенку [2,5]. Заболевание у детей характеризуется выраженным болезненным видом, поражением конъюнктивы глаз, гнойно-слизистыми выделениями из носа, тахипноэ, сухим кашлем и повышением температуры [1].

Заболевание может протекать остро, поражая одновременно несколько органов: сердце, печень, легкие, желудок, кишечник. Иногда поражается нервная система и головной мозг, при повышении возбудимости наблюдается дрожание конечностей. Данное заболевание при отсутствии лечения или неэффективной терапии может прогрессировать и перейти в хроническую форму [1,6].

Неблагополучное влияние хламидийной и микоплазменной инфекций оказывает влияние на плод и течение самих родов. При данных заболеваниях, как у новорожденного, так и у матери будет снижен иммунитет и созданы предпосылки к развитию гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) [7,8].

Характеристика микоплазмозов. При микоплазменной инфекции наиболее отчетливо изменяются сосуды, что указывает на важность гематогенного распространения заболевания по плаценте [4]. В современных исследованиях были выявлены случаи трудности протекания беременности (токсикоз и угрозы выкидышей), гипоксия плода, отслаивание плаценты [2]. При длительном течении микоплазменной инфекции в базальных пластинках выявляются очаги лимфоцитарно-плазмоцитарной инфильтрации и склероза. Микоплазменная инфекция сопровождается поражением стенок сосудов, в результате чего эндотелий набухает, уменьшается просвет, образуются тромбы. Изменения, происходящие в стенках сосудов, приводят к кровоизлияниям в базальной пластинке, что приводит к их разрыву [4,6].

Все новорожденные, пораженные микоплазменной инфекцией, рождаются в тяжелом состоянии и имеют низкую оценку по шкале Апгар. У некоторых отмечается пренатальная гипертрофия, острая асфиксия, связанная с плацентарной недостаточностью [4,6]. Чаще наблюдается летальный исход в первую неделю жизни, но иногда рождаются и жизнеспособные дети [2]. Во внутриутробном развитии наблюдается также нарушение кровообращения и воспалительные процессы [4].

Достаточно длительное время исследователи наблюдают высокую частоту развития ГВЗ (гнойно-воспалительных заболеваний) у детей неонатального периода. Данные заболевания занимают лидирующую позицию в развитии инфекционных заболеваний у новорожденных [9].

Причинами являются анатомо-физиологические особенности кожи и подкожной клетчатки, обширная сеть кровеносных сосудов, особенности микробиоты кожи и сниженная сопротивляемости к инфекциям. Также в этиологии гнойно-воспалительных заболеваний у новорожденных детей прослеживается высокий удельный вес хламидиоза и микоплазмоза, которые способствуют более тяжелому течению заболеваний [10].

По заключению Всемирной организации здравоохранения, хламидийная инфекция является широко распространенной среди взрослого населения и инфицирование чаще происходит интранатально, через родовые пути.

Современные исследования отечественных и зарубежных учёных выявили, что в 30–35% случаев инфекция *C. trachomatis* у новорожденных передается от инфицированной матери [4,10]. Чаще всего микоплазменную инфекцию обнаруживают в мазках из глотки, дающим положительную реакцию ПЦР при исследовании материала [8]. Случаи неонатальной пневмонии, вызванной *M. pneumoniae*, чаще встречаются именно у недоношенных детей,

выражаются в первые часы жизни. Обнаружение микоплазменной инфекции в воспаленной плаценте указывает на хориоамнионит. Смертность от микоплазмоза отмечается преимущественно в первые 6 месяцев жизни [4].

Методы диагностики. Клиническая картина хламидийной инфекции многолика и может проявляться в виде конъюнктивита, назофарингита, вульвита, уретрита, бронхита, пневмонии, гастроэнтерита, менингита и миокардита. Протекание хламидийной инфекции может быть в острой и хронической форме, поэтому профилактика, диагностика и незамедлительное лечение необходимо, чтобы процесс не переходил в хроническую форму [1,3].

Серологический метод диагностики. Иммуноферментный анализ (ИФА): специфические антитела IgG и IgM выявляют в крови пациента. Свидетельство об активной инфекции титра антител класса IgM должен быть выше 1:8, том числе IgG должен быть выше, чем у матери, чаще это более 1:64. Лабораторная диагностика опирается на обнаружении титра антител IgM, так как титр IgG свидетельствует о прошедшей инфекции. Так же имеет значение титр антител класса IgA, высокие значения будут указывать на реинфекцию [8,9]. Однако при оценке ИФА новорожденных детей следует учитывать, что общие и специфические IgG имеют материнское происхождение вследствие пассивного переноса через плаценту во время родов. И лишь превышающий титр антител в четыре раза указывает на наличие активной инфекции. Также влияние железа указывает на вирулентность хламидий: его дефицит приводит к снижению их активности [8,9].

Реакция иммунофлюоресценции (РИФ), прямая: готовят мазки со слизистых оболочек и их исследование с использованием коммерческих наборов [6,8].

Молекулярно-генетический метод. Выделение ДНК *C. trachomatis* производят методом ПЦР в биологических субстратах: моче, крови, ликворе, слюне или отделяемого конъюнктивального мешка. При микоплазменной инфекции материалом для изучения служит кровь, мазок со стенок влагалища или секрет с задней стенки глотки [8].

Гистологическое исследование. При микоплазменной инфекции наблюдается видимое изменение сосудов и нарушение кровообращения плода, возбудитель способен сорбироваться на эритроцитах. В плаценте обнаруживаются распространенные для микоплазменной инфекции изменения, которые характеризуются воспалительным инфильтратом во всех слоях плаценты и изменение децидуальных клеток и трофобласта [4,6].

Цитологическое исследование. После взятия мазков выявляются типичные для микоплазменной инфекции изменения в плаценте, хорионе, амнионе и базальной пластинке. При этом IgA выявляются в амнионе, а IgM в базальной пластинке [6].

Выводы. В обзоре проанализированы основные клинические особенности хламидиозов и микоплазмозов, указаны методы диагностики. Привлечение внимания медицинских работников к эпидемиологическим проблемам хламидийных и микоплазменных инфекций позволит решить указанные выше проблемы, восполнить недостающую информацию и разработать эффективный комплекс противоэпидемических мероприятий, направленных на предотвращение микоплазмоза и хламидиоза у новорожденных детей, и матерей.

Акушерам-гинекологам и педиатрам необходимо своевременно использовать лабораторную диагностику, чтобы остановить процесс развития инфекции и не допустить хронизации процесса.

Библиографический список

1. Giffard P.M., Singh G., Garland S.M. What does Chlamydia trachomatis detection in a urogenital specimen from a young child mean? // Sexually Transmitted Infections. – 2017. – Т. 93. – № 4. – Р. 236–237.
2. Егорова В.Б., Афанасьева В.П., Мунхалова Я.А., Семенова А.Е. Клинико-микробиологическая характеристика локальных форм гнойно-воспалительных заболеваний. // Вестник Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Серия: Медицинские науки. – 2021. – № 4(25). – С. 49–52.
3. Adachi K.N., Nielsen-Saines K., Klausner J.D. Chlamydia trachomatis Screening and Treatment in Pregnancy to Reduce Adverse Pregnancy and Neonatal Outcomes: A Review // Front Public Health. – 2021. – P. 1–2, 4–7, 12–13.
4. Huber B.M., Meyer Sauter P.M., Unger W.W.J., Hasters P., Eugster M.R., Brandt S., Bloembergen G.V., Natalucci G., Berger C. Vertical Transmission of Mycoplasma pneumoniae Infection. // Neonatology. – 2018. – P. 333–335.
5. Honkila M., Wikström E., Renko M., Surcel H.M., Pokka T., Ikäheimo I., Uhari M., Tapiainen T. Probability of vertical transmission of Chlamydia trachomatis estimated from national registry data. // Sex Transm Infect. – 2017. – P. 416–420.
6. Рябчук Ф.Н., Пирогова З.И. Клинико-лабораторная характеристика персистирующих инфекций хламидийной и микоплазменной этиологии у детей. // Лечащий врач. – 2011. – № 1. – С. 1–3.
7. Гребнева В.С., Ренге Л.В., Зорина В.Н., Григорьева Е.Ю., Власенко А.Е. Хламидийная инфекция у беременных: возможности оценки состояния плода и новорождённого с использованием некоторых острофазных показателей крови и методов логической регрессии. // Мать и дитя в Кузбассе. – 2022. – № 3(90). – С. 54–61.
8. Послова Л.Ю., Ковалишена О.В., Сергеева А.В., Каткова Н.Ю., Сенягина Н.Е. Эпидемиология внутриутробных инфекций: Учебное пособие // ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. – Нижний Новгород: Ремедиум Приволжье, 2019. – 118 с. – С. 24–29, 35–61.
9. Piñeiro L., Korta-Murua J., Cilla G. Prevention of the vertical transmission of Chlamydia trachomatis using a gestational screening. // An Pediatr (Engl Ed). – 2020. – P. 147–148.
10. Ренге Л.В., Григорьева Е.Ю., Зорина В.Н., Власенко А.Е. Новые белковые маркеры в прогнозе внутриутробной инфекции при преждевременных родах. // Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии. – 2020. – Т. 19, № 5. – С. 29–35.

ВЛИЯНИЕ PH-МОДИФИКАЦИИ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ЕГО АФФИННОСТЬ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ И ВИРУСНЫМ АНТИГЕНАМ

Гурская Д.А., Раззорова Е.А., Горшкова Е.Н.

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

Аннотация. Секреторный иммуноглобулин А (sIgA) – преобладающий класс антител на слизистых оболочках. Он поддерживает баланс между комменсальными микроорганизмами в просвете кишечника, а также защищает от бактериальных и вирусных инфекций. Нами было показано, что посттрансляционная индукция полиреактивности sIgA с помощью буфера с pH 2,6 увеличивает его аффинность к вирусным антигенам, что имеет важное значение для иммунной защиты организма.

Ключевые слова: секреторный IgA, полиреактивность, микробиота, вирусный антиген

INFLUENCE OF PH-MODIFICATION OF SECRETORY IMMUNOGLOBULIN A ON ITS AFFINITY TO BACTERIAL AND VIRAL ANTIGENS

Hurska D.A., Razzorenova E.A., Gorshkova E.N.

Lobachevsky Nizhny Novgorod State University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. Secretory immunoglobulin A (sIgA) is the predominant class of antibodies on mucous membranes. It maintains the balance between commensal microorganisms in the intestinal lumen and also protects against bacterial and viral infections. We have shown that post-translational induction of sIgA polyreactivity using a buffer with pH 2.6 increases its affinity for viral antigens, which is important for the immune defense.

Keywords: secretory IgA, polyreactivity, microbiota, viral antigen

Важную роль в защите организма человека играют поверхности слизистых оболочек. Важным участником иммунной системы слизистой оболочки является секреторный иммуноглобулин А (IgA). Секреторный IgA широко присутствует в желудочно-кишечном тракте, дыхательных путях, слезах, слюне, молозиве [1]. Секреторный IgA поддерживает баланс между комменсальными микроорганизмами и защищает поверхности слизистой оболочки от патогенов. Молекулы секреторного IgA могут взаимодействовать с гликанами бактерий кишечной микробиоты, такими как О-антигены, полисахаридные капсулы или тейхоевые кислоты. Было показано, что sIgA секретируется в ответ на присутствие в организме широкого спектра патогенных бактерий, включая *Campylobacter jejuni*, *Shigella sonnei*, *Aeromonas* sp. и др. [2-4]. Кроме этого, sIgA обладает способностью защищать среду кишечника от вирусов и паразитов, ингибируя внутриклеточную продукцию или нейтрализуя провоспалительные антигены [2,5].

В организме sIgA, вырабатываемый слюнными железами человека, легко проглатывается и попадает в просвет желудка, где значение pH колеблется в пределах 2,0-2,6. Секреторный IgA устойчив к действию пепсина, но подвержен влиянию кислотности среды. Это приводит к увеличению естественной активности антител, дальнейшая нейтрализация pH в просвете кишечника позволяет иммуноглобулину участвовать в иммунной защите [6].

Так, помимо возможного повышения активности антител при воздействии низкого pH в условиях *in vivo*, ранее было описано также приобретение полиреактивности иммуноглобулинов в связывании антигенов в ответ на воздействие различных дестабилизирующих агентов, включая буферы с низкими значениями pH, в лабораторных условиях [7-9]. Действие низкого pH на иммуноглобулины вызывает локальную молекулярную реорганизацию переменных областей Fab-фрагмента антител, приводящую к конформационным вариантам с измененной антигенсвязывающей способностью [7]. Это может быть использовано для создания новых препаратов на основе sIgA или улучшения уже существующих иммуноглобулиновых препаратов для лечения иммунно-опосредованных заболеваний, бактериальных и вирусных инфекций. На основании этого представляется важным изучение влияния модификации иммуноглобулинов на их способность связываться с различными видами комменсальных и патогенных бактерий, а также с бактериальными токсинами и вирусными белками.

В связи с этим целью данной работы явилось исследование влияния обработки секреторного иммуноглобулина A (sIgA) буферами с низким pH (2,6 и 4,0) на связывание sIgA с бактериальными клетками, а также на аффинность взаимодействия sIgA с бактериальными и вирусными антигенами.

Материалы и методы. В качестве материалов для исследования использовали препарат секреторного иммуноглобулина A (sIgA) (Sigma-Aldrich, США). В качестве объектов, используемых для оценки связывания модифицированного sIgA с бактериальными клетками, бактериальными и вирусными антигенами служили: *Lactobacillus plantarum* 8P-A3, источником которой был препарат Лактобактерин, *Escherichia coli* BL-21, *Proteus vulgaris* и *Staphylococcus aureus* 2879 М (лаборатория экспериментальной иммунологии Центра молекулярной биологии и биомедицины ИББМ ННГУ им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия), бактериальный липополисахарид (ЛПС) (Sigma-Aldrich, США), антигены VP1 норовируса, VP1, VP2 и VP3 энтеровируса, рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка коронавируса (ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной, Россия).

Растворенный в стерильном фосфатно-солевом буферном растворе (pH 7,4) sIgA (2 мг/мл) инкубировали в течение 10 мин с 0,2 М глициновым буфером (pH 2,6 и pH 4,0) в соотношении 1:9. После этого pH раствора модифицированного sIgA доводили до значения 7,4 путем диализа против PBS 2-кратно в течение 12 ч. Модифицированный sIgA (0,2 мг/мл) инкубировали с ночными культурами *L.plantarum*, *E.coli*, *P.vulgaris* и *S.aureus* (2×10^9 кл/мл) в соотношении 1:1. Цитофлуориметрическую оценку способности pH-модифицированного sIgA к взаимодействию с бактериями осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител против IgA человека, меченных флуоресцин изотиоцианатом (FITC) (ab97219, Abcam, Великобритания).

Оценка взаимодействия, pH-модифицированного sIgA с бактериальным и вирусными антигенами проводилась с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для этого препарат sIgA, обработанный буферами с pH 2,6 и 4,0, инкубировали в концентрациях: 1,5625,

3,125, 6,25, 12,5, 25 мкг/мл со следующими антигенами: бактериальным ЛПС, рекомбинантным антигеном VP1 норовируса, VP1, VP2 и VP3 энтеровируса, рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка коронавируса. С помощью вторичных антител, меченых пероксидазой хрена (HRP, Abscam, Великобритания), фотометрически оценивали связывание sIgA с антигенами.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием критерия Краскала-Уоллиса в программе GraphPad Prism 8.4.3. (GraphPad Software, США). Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты. В ходе исследования влияния обработки sIgA буфером с низким pH (pH 2,6 и 4,0) на способность иммуноглобулина связывать бактерии родов *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Staphylococcus* с помощью метода проточной цитофлуориметрии были выявлены отличия в интенсивности флуоресценции FITC между образцами, в которых бактерии обрабатывались нативным sIgA, и контролем, что свидетельствует о способности иммуноглобулина A распознавать и связываться как с комменсальными (*Lactobacillus plantarum*), так и с патогенными (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Staphylococcus aureus*) бактериями (рис. 1). При этом мы отметили снижение способности связывания sIgA после его обработки буферами pH 2,6 и 4,0 с патогенными микроорганизмами, но не с лактобактериями, хотя статистически эти различия не были подтверждены.

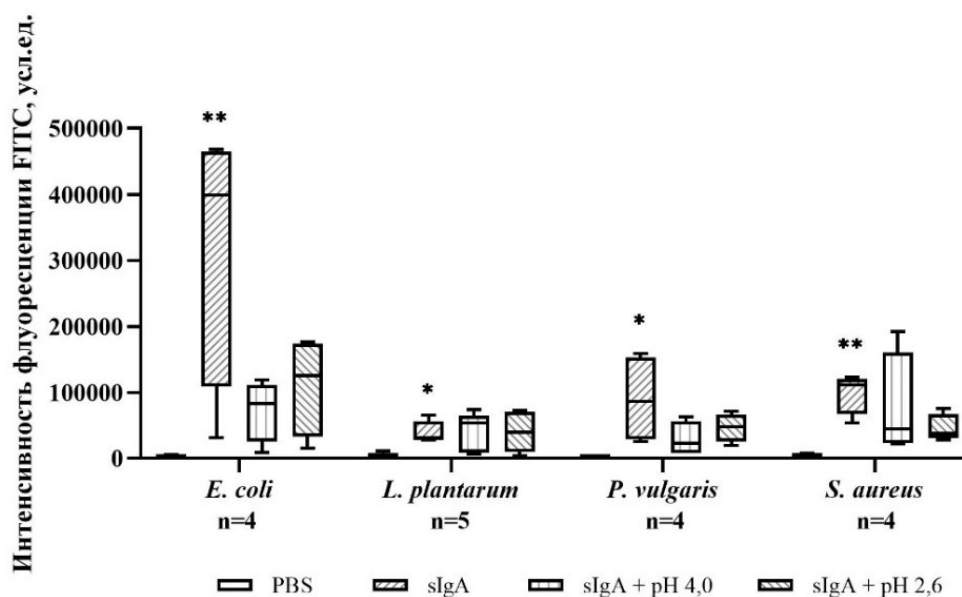


Рис. 1. Связывание нативного и обработанного буферами с низким pH (pH 4,0 и 2,6) секреторного IgA с клетками *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, регистрируемое по сигналу флуоресценции FITC.

* – статистически значимые различия по сравнению с контролем (PBS) при $p \leq 0,05$

** – статистически значимые различия по сравнению с контролем (PBS) при $p \leq 0,01$

При обработке данных, полученных в ходе исследования влияния модификации sIgA буферами с низким pH на связывание иммуноглобулина с бактериальным ЛПС с помощью метода ИФА, наблюдался высокий уровень аффинности иммуноглобулина к бактериальному эндотоксину при всех используемых концентрациях sIgA. Однако, не было выявлено статистически значимых различий в оптической плотности между sIgA, необработанным и обра-

ботанным буферами с низким pH. Таким образом, обработка sIgA буферами с низким pH не влияет на способность иммуноглобулина связываться с бактериальным антигеном (ЛПС) (рис. 2).

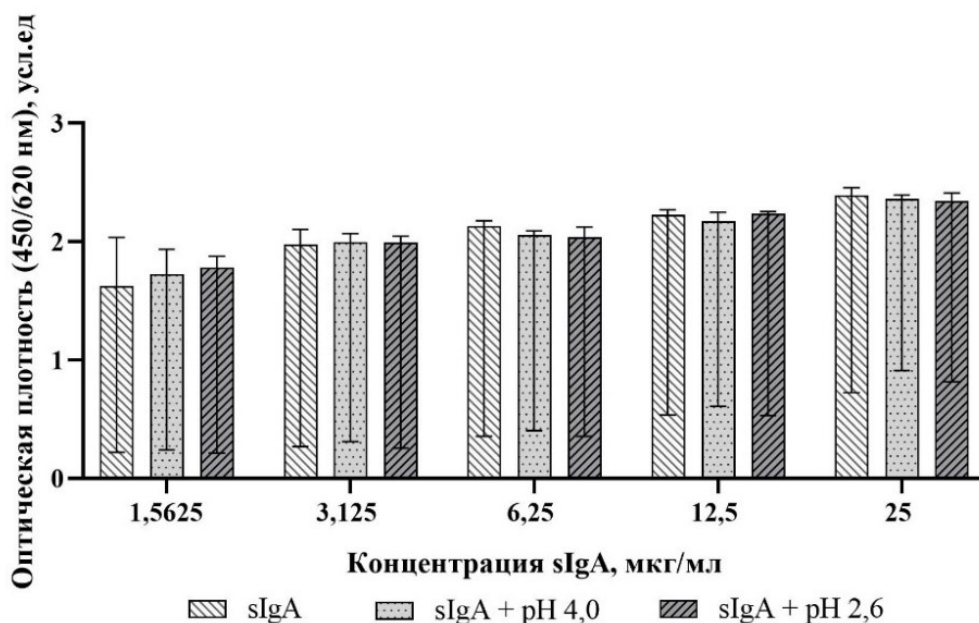


Рис. 2. Изменение оптической плотности при связывании необработанного и обработанного буферами с низким pH (pH 2,6 и 4,0) секреторного иммуноглобулина А (sIgA) с бактериальным ЛПС (n=4)

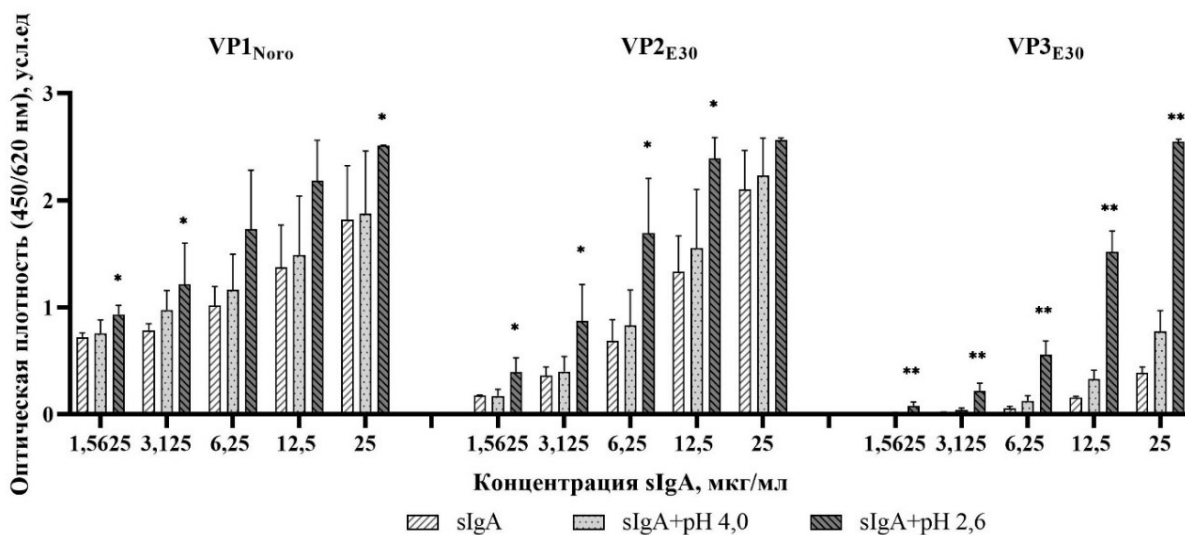


Рис. 3. Изменение оптической плотности при связывании необработанного и обработанного буферами с низким pH (pH 2,6 и 4,0) секреторным иммуноглобулином А (sIgA) с антигеном VP1 норовируса, VP2 и VP3 энтеровируса (n=4)

* – статистически значимые различия по сравнению с необработанным sIgA при $p \leq 0,05$

** – статистически значимые различия по сравнению с необработанным sIgA при $p \leq 0,01$

В то же время, были выявлены изменения во взаимодействии обработанного sIgA с рекомбинантными антигенами энтеровируса и норовируса. Так, увеличение оптической

плотности для образцов, в которых антигены VP1 норовируса, VP2 и VP3 энтеровируса были проинкубированы с обработанным буфером с pH 2,6 sIgA, было статистически значимым по сравнению с необработанным sIgA (рис.3).

В ходе исследования влияния буферов с низким pH на способность sIgA взаимодействовать с рецептор-связывающим доменом (RBD) S-белка коронавируса и с VP1 энтеровируса статистически значимое увеличение оптической плотности по сравнению с контролем регистрировалось только при взаимодействии sIgA (12,5 мкг/мл), обработанного буфером с pH 2,6, с антигеном VP1 энтеровируса (рис. 4). При этом было отмечено, что нативный sIgA гораздо хуже связывался с RBD S-белка коронавируса и с VP1 энтеровируса по сравнению с антигенами VP1 норовируса, VP2 и VP3 энтеровируса.

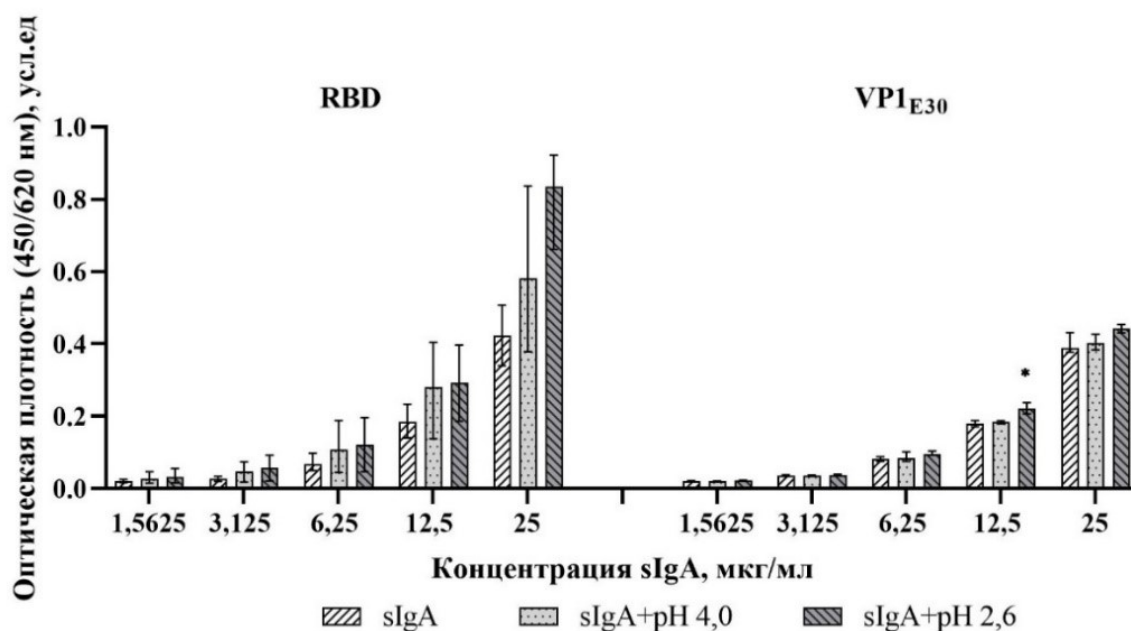


Рис. 4. Изменение оптической плотности при связывании необработанного и обработанного буферами с низким pH (pH 2,6 и 4,0) секреторным иммуноглобулином A (sIgA) с RBD S-белка коронавируса (n=6) и VP1 энтеровируса (n=4)

* – статистически значимые различия по сравнению с необработанным sIgA при $p \leq 0,05$

VP1 – наиболее вариабельный белок энтеровирусной оболочки, который содержит аминокислотные последовательности, определяющие серотип вируса [10]. Возможно, используемый нами белок VP1 имеет специфические антигенные эпитопы, с которым sIgA не имеет сайтов связывания. Также, используемый нами sIgA, возможно, не имеет сайтов взаимодействия с RBD S-белка коронавируса. Исходя из полученных результатов, существенные изменения в количестве образуемых комплексов sIgA и вирусных белков регистрировались нами для тех антигенов, с которыми нативный sIgA взаимодействует с высокой аффинностью. Вероятно, что обработка sIgA буферами с низким pH вызывает конформационные перестройки паратопов, которые ограничиваются имеющимися сайтами связывания с антигенами и не приводят к формированию новых участков взаимодействия – одним из 3 механизмов, которые описаны в статье Regenmortel [12]. При этом в нашем исследовании мы отмечаем, что, несмотря на высокую аффинность связывания нативным секреторным IgA липо-

полисахарида, рН-модификация иммуноглобулина никак не повлияла на его взаимодействие с этим антигеном. Возможно, обработка антител буферами с низким рН слабо влияет на реактивность связывания sIgA с небелковыми антигенами, что, например, также демонстрируют Leserf с соавторами для моноклональных антител, модифицированных прооксидантными агентами [9]. Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что обработка секреторного иммуноглобулина А буферами с низким рН не влияет на его способность связываться с бактериальными клетками и бактериальным липополисахаридом, однако, наблюдается увеличение аффинности sIgA по отношению к вирусным антигенам (VP1, VP2 и VP3 энтеровируса, VP1 норовируса) после его обработки буфером с рН 2,6.

Mathias и Corthesy показали, что как грамположительные (*Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Eubacterium*, *Clostridium*), так и грамотрицательные (*Bacteroides* и *Escherichia*) бактерии были покрыты sIgA, что способствует поддержанию баланса микробиоты в просвете кишечника посредством иммуноглобулинов [11]. Отсутствие влияния модификации sIgA буферами с низким рН на способность антитела связываться с бактериальными клетками и бактериальным эндотоксином, как показывают наши результаты, можно рассматривать с двух позиций. С одной стороны, рН-модифицированный sIgA, вероятно, не мог бы способствовать более эффективной элиминации бактериальных патогенов. С другой стороны, рН-модификация sIgA не поспособствовала бы нарушению баланса между микробиотой и патогенными бактериями в просвете кишечника, если такой секреторный IgA использовался, например, при борьбе с вирусными инфекциями.

Таким образом, способность рН-модифицированного секреторного IgA лучше связываться с одними антигенами без изменения в распознавании других антигенов, должно быть более подробно изучено. В целом, возможность влиять на антигенсвязывающую функцию антител может способствовать приобретению препаратами на основе sIgA новых полезных терапевтических свойств. Такие препараты, вероятно, помогут более эффективно выстраивать защиту организма от различного рода инфекционных агентов.

Библиографический список

1. León E.D., Francino M.P. Roles of secretory immunoglobulin A in host-microbiota interactions in the gut ecosystem // *Frontiers in Microbiology*. – 2022. – V. 13. – P. 880484.
2. Pietrzak B. et al. Secretory IgA in intestinal mucosal secretions as an adaptive barrier against microbial cells // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – V. 21. – № 23. – P. 9254.
3. Crivelli C., Demarta A., Peduzzi R. Intestinal secretory immunoglobulin A (sIgA) response to *Aeromonas* exoproteins in patients with naturally acquired *Aeromonas* diarrhea // *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. – 2001. – V. 30. – № 1. – P. 31–35.
4. Winsor D. K., Mathewson J. J., DuPont H. L. Comparison of serum and fecal antibody responses of patients with naturally acquired *Shigella sonnei* infection // *The Journal of infectious diseases*. – 1988. – V. 158. – № 5. – P. 1108–1112.
5. Corthesy B. Role of secretory IgA in infection and maintenance of homeostasis // *Autoimmunity reviews*. – 2013. – V. 12. – № 6. – P. 661–665.

6. Bouvet J.P. et al. Induction of natural autoantibody activity following treatment of human immunoglobulin with dissociating agents // *Journal of autoimmunity*. – 2001. – V. 16. – № 2. – P. 163–172.
7. Dimitrov J.D. et al. Heterogeneous antigen recognition behavior of induced polyspecific antibodies // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2010. – V. 398. – № 2. – P. 266–271.
8. Lecerf M., Jarossay A., Kaveri S.V. et al. Methods for posttranslational induction of polyreactivity of antibodies // *Natural Antibodies: Methods and Protocols*. – 2017. – P. 135–145.
9. Lecerf M., Kanyavuz A., Rossini S., Dimitrov J.D. Interaction of clinical-stage antibodies with heme predicts their physiochemical and binding qualities // *Communications Biology*. – 2021. – V. 4. – № 1. – P. 391.
10. Casas I., Palacios, G.F., Trallero, G., Cisterna, D., Freire, M. C., Tenorio, A. Molecular characterization of human enteroviruses in clinical samples: comparison between VP2, VP1, and RNA polymerase regions using RT nested PCR assays and direct sequencing of products // *Journal of medical virology*. – 2001. – V. 65. – № 1. – P. 138–148.
11. Mathias A., Corthésy B. N-Glycans on secretory component: mediators of the interaction between secretory IgA and gram-positive commensals sustaining intestinal homeostasis // *Gut microbes*. – 2011. – V. 2. – № 5. – P. 287–293.
12. Van Regenmortel M. H. V., Van Regenmortel M. H. V. Specificity, polyspecificity and heterospecificity of antibody-antigen recognition // *HIV/AIDS: Immunochemistry, Reductionism and Vaccine Design: A Review of 20 Years of Research*. – 2019. – P. 39–56.

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

Девятков С.О.¹, Кропанева М.Д.^{1,2}, Заморина С.А.^{1,2}, Раев М.Б.^{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. Определены оптимальные условия хранения иммуносорбентов на основе нитроцеллюлозной мембраны, предназначенных для конструирования иммунофилтративных систем. В работе использовали модельную тест-систему для определения простатспецифического антигена. В качестве диагностического реагента применяли конъюгат на основе железо-углеродных наночастиц. В результате исследования было показано, что обработанные 30%-ным водным раствором сахарозы иммуносорбенты, хранившиеся при 4°C, сохраняют функциональную активность, как минимум, в течение месяца (время наблюдения).

Ключевые слова: неинструментальные тест-системы, углеродные наноматериалы, иммунофилтрация, нитроцеллюлозная мембрана

OPTIMIZATION OF STORAGE CONDITIONS OF IMMUNOFILTRATION TEST SYSTEMS

Devyatov S.O.¹, Kropaneva M.D.^{1,2}, Zamorina S.A.^{1,2}, Raev M.B.^{1,2}

¹ Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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 optimal storage conditions for immunosorbents based on nitrocellulose membranes intended for the construction of immunofiltration systems have been determined. The work used a model test system to determine prostate-specific antigen. A conjugate based on iron-carbon nanoparticles was used as a diagnostic reagent. As a result of the study, it was shown that immunosorbents treated with a 30% aqueous solution of sucrose and stored at 4°C retain functional activity for at least a month (observation time).

Keywords: non-instrumental test systems, carbon nanomaterials, immunofiltration, nitrocellulose membrane

В Российской Федерации для скрининга используются серологические тесты, адаптированные для постановки как в качественном, так и полуколичественном варианте. Обязательному серологическому обследованию подлежат пациенты стационаров, лица, в течение года впервые посещающие амбулатории, декретированные группы населения [1].

Инструментальные методы диагностики: иммуноферментный анализ (ИФА), реакция иммунофлуоресценции (РИФ), несмотря на высокие показатели чувствительности и специ-

фичности, не могут выступать в качестве скрининговых, поскольку требуют применения дорогостоящего и сложного оборудования, а также наличия специалистов с соответствующей высокой квалификацией [2,8].

В данный момент разработка скрининговых аналитических систем на основе углеродных наноматериалов, конъюгированных с аффинным соединением посредством системы ковалентных связей, является перспективной. Подобные системы обладают простотой, оперативностью, требуемой чувствительностью и специфичностью, надежностью, достаточными для использования в качестве скрининговых тестов [3].

Длительное сохранение иммуносорбентом связывающих свойств является важным условием при внедрении новых аналитических систем в реальную медицинскую практику. Основными «враждебными» факторами являются протеазная активность контаминирующих твердую фазу микроорганизмов, а также колебания условий окружающей среды. Они вызывают структурноконформационные изменения молекул антигена, приводящие к нарушению процесса распознавания антигенных детерминант антителами и к снижению чувствительности и специфичности систем диагностики [4].

Мембраны на основе нитроцеллюлозы – перспективный и широко используемый материал для иммобилизации аффинных соединений, благодаря их низкой стоимости, разлагаемости, портативности, гибкости, биосовместимости и капиллярной силы [5]. Сенсибилизированные аффинным соединением мембраны могут быть приготовлены и использованы менее чем за 2 часа и стабильны в течение как минимум 1 недели при хранении в комнатной температуре. Кроме того, подобные тест-системы очень чувствительны и экономичны. Предыдущие исследования показали, что иммуноаналитические системы на основе нитроцеллюлозы работоспособны через 4 недели хранения в условиях комнатной температуры, темноты и герметичности [6].

Согласно санитарным правилам 3.3.2.3332-16 транспортирование и хранение большинства иммунологических лекарственных препаратов осуществляется при температуре в пределах от +2°C до +8°C включительно. Большинство исследований стабильности тест-систем для экспресс-диагностики выполняются в формате иммунохроматографии. Альтернативой иммунохроматографическим системам анализа являются тест-системы в формате иммунофильтрации. Особенности иммунофильтрации (большая чувствительность, отсутствие хук-эффекта, сокращение времени аналитической процедуры) делают такой вариант более привлекательным для использования в экспресс-диагностике. Соответственно, цель настоящего исследования: определение оптимальных условий хранения иммуносорбентов на основе нитроцеллюлозной мембраны при конструировании тест-систем в формате иммунофильтрации.

Материалы и методы

В работе использовали нитроцеллюлозную (н/ц) мембрану с диаметром пор 0,3 мкм «Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (MDI)» (Индия), бычий сывороточный альбумин (БСА) «Sigma» (США), простатспецифический антиген (PSA, ПСА) и анти-PSA моноклональные антитела (клоны 3А6 и 1А6) были получены от «Хайтест» (Россия). Для растворов и процедуры промывки использовали фосфатно-солевой буфер pH 7,4 (ФСБ), а также ФСБ + 0,1% Tween-20 (ФСБТ). Блокирование неспецифических сайтов связывания осуществляли при помощи раствора ФСБ + 0,4% Tween-20. Конъюгаты на основе железо-углеродных наночастиц синтезировали согласно методике, описанной в работе [7]. Конъюгаты, полученные данным способом, демонстрируют сохранность структурных и функциональных свойств при длительном хранении.

Для исследований использовали оптимизированные в ходе предварительных испытаний схему подготовки иммуносорбента и процедуру анализа. Подготавливали н/ц мембрану нужного размера. На область мембраны с размерами 10×10 мм точками по 2 мкл наносили моноклональные антитела против ПСА (клон 3А6), разведенные до необходимой концентрации в ФСБ (0,5 мг/мл). Для оценки специфичности также наносили 2 мкл БСА. Далее иммуносорбент высушивали 30 минут при комнатной температуре и 1 час 30 минут при 37°C. Затем иммуносорбент промывали 35 мл ФСБТ, процедуру повторяли 3 раза. После этого нитроцеллюлозную мембрану с иммобилизованными моноклональными антителами блокировали в течение 60 минут при 37°C, вновь промывали и высушивали. Часть иммуносорбентов дополнительно была обработана 30%-ным водным раствором сахарозы в течение 60 минут и аналогично высушена [8].

Подготовленные таким образом иммуносорбенты были использованы в конструкции приспособления для иммунофильтрации. Сконструированные тест-системы хранили при комнатной температуре, при 4°C и при 37°C, а также в условиях вакуума. В дальнейшем их использовали для определения ПСА через определенные сроки хранения (0, 7 и 30 дней).

Процедура анализа проходила следующим образом: в «окна» для внесения образца добавляли 200 мкл ФСБТ. После полного впитывания вносили 100 мкл анализируемого образца в блокирующем буфере, через 1 минуту иммунофильтрационную ячейку промывали 150 мкл ФСБТ. Далее вносили 80 мкл диагностического реагента на основе железоуглеродных наночастиц, функционализированных моноклональными антителами против ПСА (клон 1А6), в блокирующем буфере в конечной концентрации 0,25 мг/мл. Через 1 минуту ячейки вновь промывали и через 10 минут оценивали результаты анализа: иммунофильтрационную ячейку разбирали, а нитроцеллюлозную мембрану с образовавшимися иммунными комплексами помещали на прозрачную пленку и сканировали. Полученное изображение обрабатывали в программе ImageJ. Стабильность иммуносорбентов при хранении оценивали по наличию/отсутствию различий в показателях чувствительности и специфичности.

Для получения цифровых изображений иммуносорбентов использовали планшетный сканер CanoScan Lide 600f и программу CanoScan Toolbox 5.0 (Canon, Япония). Для количественной оценки цвета точек использовали программу ImageJ (National Institutes of Health, США). Использовались следующие параметры сканирования: режим – полутоновое изображение; разрешение – 600 dpi, формат файла – JPEG. Затем в программе ImageJ производилась коррекция гамма-фактора цифрового изображения до значения 2 (ImageJ > Process > Math > Gamma). С помощью команды «Measure» измеряли интенсивность окрашивания фона и пятен в месте образования иммунных комплексов в произвольных единицах (условные единицы, у.е.) в диапазоне от 255 (белый) до 0 (черный). Затем из интенсивности фона вычитали интенсивность пятна.

Полученные данные использовали для построения наглядных графиков, показывающих изменение чувствительности иммуносорбентов.

Результаты и обсуждения

Исследование стабильности сенсibilизированных моноклональными антителами против ПСА нитроцеллюлозных мембран производили в предварительно подобранном оптимальном режиме. Концентрация ПСА в анализируемых образцах составляла 10000 нг/мл, 1000 нг/мл, 100 нг/мл и 0 нг/мл. Иммунофильтрационный анализ для определения ПСА проводили в день получения иммуносорбентов и далее через 7 и 30 дней.

Анализ результатов исследования показал, что значения чувствительности иммунофильтрационных тест-систем, хранившихся при 4°C, оставались неизменными. Показатели

чувствительности иммунофльтрационных тест-систем, хранившихся при комнатной температуре, снижались не более чем на 20%, что соответствует стабильности в течение 1 года при температуре от 2 до 8°C [9]. В то же время чувствительность тест-систем, выдержанных при температуре 37°C, снизилась на 36,17%. Во всех случаях чувствительность иммуносорбентов, обработанных сахарозой была выше необработанных на 21,58%. Результаты исследования представлены в виде гистограмм (рис. 1).

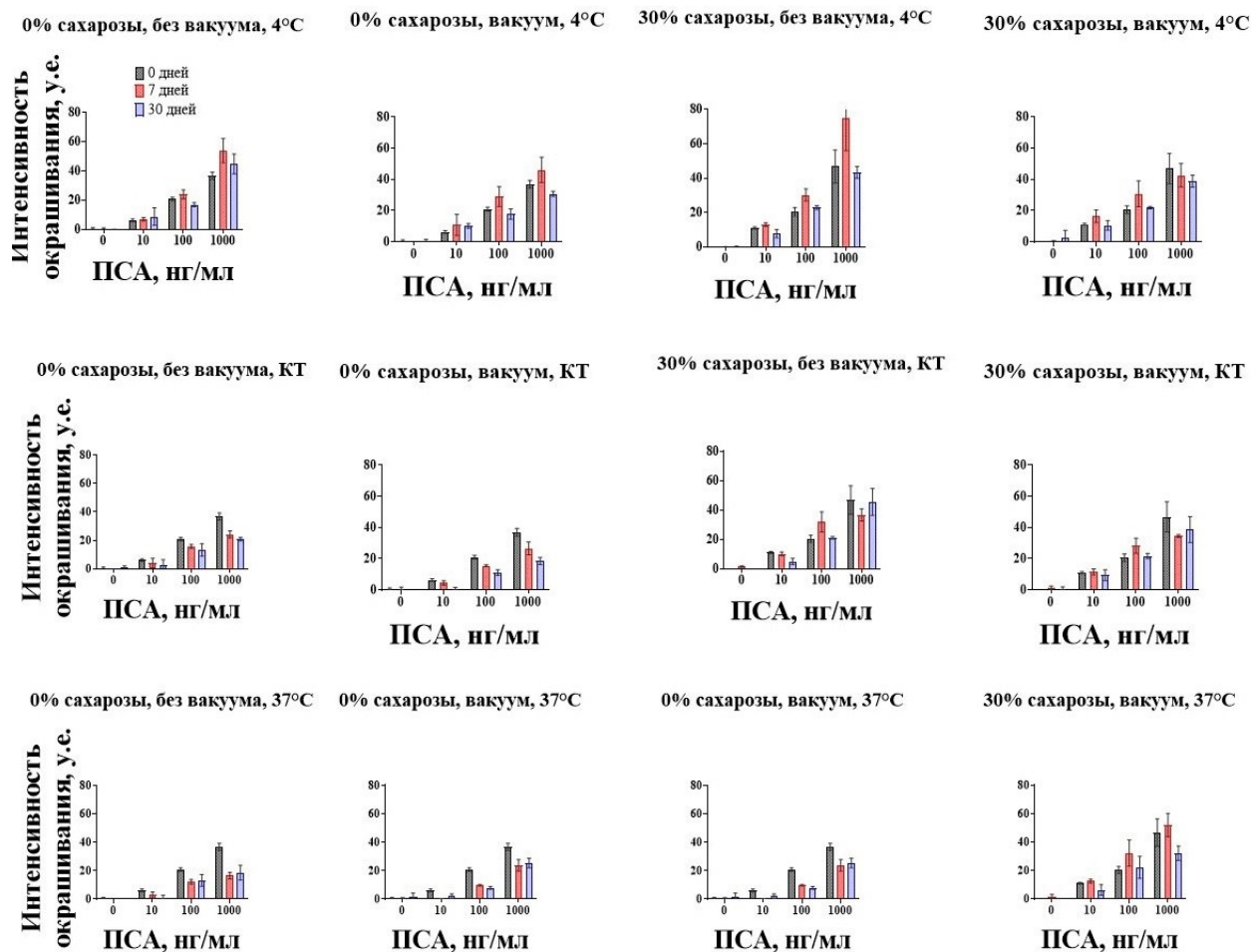


Рис. 1. Изменение чувствительности тестов в различных условиях

Таким образом, были определены оптимальные условия для хранения иммунофльтрационных тест-систем на основе нитроцеллюлозной мембраны. Показатели чувствительности в течение месяца наблюдения оставались практически неизменными при предварительной обработке 30%-ным водным раствором сахарозы иммуносорбентов, хранившихся при 4°C, при этом хранение в условиях вакуума не повлияло на изменение аналитического сигнала.

Данные, полученные при анализе свойств систем на основе иммуносорбентов, хранившихся при комнатной температуре, могут быть экстраполированы в пользу вывода о сохранности свойств в течение года в условии хранения при температуре 4–8°C. Стабилизация иммуносорбентов водным раствором сахарозы также может быть использована при транспортировке иммуносорбентов в летнее время или в регионах с жарким климатом.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 22-24-20091.

Библиографический список

1. Об утверждении протокола ведения больных сифилисом: приказ МЗ РФ №327 от 25 июля 2003.
2. Родионов А.Н. Сифилис. – СПб.: Питер. – 2007. – 320 с.
3. Раев М.Б. Нанобиотехнологии в неинструментальной иммуноаналитике / под. ред. В.А. Демакова. – Екатеринбург: УрО РАН. – 2012. – 140 с.
4. Храмов П.В., Бочкова М.С., Раев М.Б. Исследование функциональных свойств иммуносорбентов неинструментальных дот-иммуноаналитических тест-систем на основе антигенов *Treponema pallidum* // Вестник ПГУ. Биология. – 2014. – № 1. – С. 57–62.
5. Nitrocellulose membrane for paper-based biosensor / Tang R., Xie M.Y., Li M. [et al] // Applied Materials Today. – 2022. – Vol. 26. – P. 101305.
6. Rossi C.L., Tsang V.C., Pilcher J.B. Rapid, low-technology field- and laboratory-applicable enzyme-linked immunosorbent assays for immunodiagnosis of *Schistosoma mansoni* // ASM Journals Journal of Clinical Microbiology – 1991. – Vol. 29. – № 9. – P. 1836–1841.
7. Khramtsov P., Kropaneva M., Bochkova M., Timganova V., Zamorina S., Rayev M. Solid-phase nuclear magnetic resonance immunoassay for the prostate-specific antigen by using protein-coated magnetic nanoparticles // Microchimica Acta – 2019. – Vol. 186. – № 9. – P. 1630.
8. Раев М.Б. Способ защиты и стабилизации твердофазных реагентов иммуноаналитических систем: пат. Рос. Федерации. № 2327992; заявл. 27.06.2008 // Бюл. «Изобретения. Полезные модели». – 2008. – № 18. – С. 785.
9. Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (Hepeviridae, Orthohepevirus, Orthohepevirus A) методом линейного иммуноанализа / Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н. [и др.] // Вопросы вирусологии. – 2020. – №3. – С. 132–142.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛЮКОЗЫ GLUT-1 НК-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ

Орлова Е.Г.^{1,2}, Логинова О.А.¹, Горбунова О.Л.¹, Кирьянова В.Ю.², Баянгулова А.Р.²,
Ширшев С.В.¹

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

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Аннотация. Изучена экспрессия молекул белка-транспортера глюкозы Glut-1 разными субпопуляциями НК-клеток периферической крови при физиологической беременности. Установлено, что разные субпопуляции НК-клеток периферической крови небеременных женщин отличаются по экспрессии транспортера глюкозы Glut-1. В первом триместре беременности экспрессия Glut-1 повышается на регуляторных CD56^{bright}CD16^{dim} и цитотоксических CD16⁺CD56^{dim} НК-клетках. В третьем триместре экспрессия Glut-1 на разных субпопуляциях НК-клеток периферической крови не отличается от небеременных. Таким образом, полученные результаты расширяют имеющиеся представления о механизмах регуляции функциональной активности НК-клеток при беременности.

Ключевые слова: Glut-1, натуральные киллеры, беременность

EXPRESSION OF GLUCOSE TRANSPORTER PROTEIN GLUT-1 BY NK CELLS OF PERIPHERAL BLOOD OF PREGNANT WOMEN

Orlova E.G.^{1,2}, Loginova O.A.¹, Gorbunova O.L.¹, Kirianova V.Yu.², Bayangulova A.R.²,
Shirshev S.V.¹

¹ *Institute of Ecology and Genetic of microorganisms, Ural Branch of the Russian Academy
of Sciences – branch of the PFRC, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Perm, Russia*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Abstract. The expression of glucose transporter protein Glut-1 molecules by different subpopulations of peripheral blood NK cells during physiological pregnancy was studied. It was found that different subpopulations of NK cells in the peripheral blood of non-pregnant women differ in the expression of the glucose transporter Glut-1. In the first trimester of pregnancy, the expression of Glut-1 increases on regulatory CD56^{bright}CD16^{dim} and cytotoxic CD16⁺CD56^{dim} NK cells. In the third trimester, the expression of Glut-1 on different subpopulations of peripheral blood NK cells does not differ from non-pregnant ones. Thus, the obtained results expand the existing understanding of the mechanisms of regulation of the functional activity of NK cells during pregnancy.

Keywords: GLUT-1, natural killers, pregnancy

В качестве основного источника энергии НК-клетки используют глюкозу, которая попадает в клетку с помощью белков-транспортеров (Glut-1) [1]. Glut-1 осуществляет пассивный транспорт глюкозы, а также других гексоз внутрь клетки. При беременности функциональная активность НК-клеток периферической крови существенно меняется, что связано с ограничением их цитотоксической активности и участием в формировании периферической иммунной толерантности [2]. Популяция НК-клеток периферической крови гетерогенна и представлена цитотоксическими $CD16^+CD56^{dim}$ НК-клетками (более 90%), регуляторными $CD16^{dim}CD56^{bright}$ НК-клетками (менее 10%), а также незначительным количеством цитотоксических $CD16^{hi}CD56^-$ НК-клеток, которые ряд авторов характеризуют как истощенные, функция которых не изучена [2]. При беременности количество и цитотоксический потенциал $CD16^+CD56^{dim}$ НК-клеток периферической крови снижается, что необходимо для предотвращения реакций на антигены плода [2,3]. Тогда как число регуляторных $CD16^{dim}CD56^{bright}$ НК-клеток увеличивается, поскольку они активно продуцируют противовоспалительные цитокины, ангиогенные факторы и играют ведущую роль в формировании пула децидуальных НК-клеток и зоны иммунной толерантности в области фетоплацентарного контакта [2,3]. Функциональная активность НК-клеток напрямую взаимосвязана с их метаболическим статусом. Поэтому целью данного исследования было изучение экспрессии Glut-1 разными субпопуляциями НК-клеток периферической крови беременных.

Материалы и методы. Исследовали периферическую кровь условно-здоровых небеременных (I фаза менструального цикла) и женщин с физиологически протекающей беременностью в I и III триместрах. Критериями включения являлось: наличие одной и более успешно завершившихся беременностей; отсутствие патологий беременности в прошлом и настоящем; отсутствие острых и хронических соматических, эндокринных, аутоиммунных, генетических заболеваний; отрицание диет, приема контрацептивных и гормональных, противовоспалительных или антибактериальных препаратов; наличие добровольного информированного согласия на использование биологического материала. Исследование одобрено локальным этическим комитетом ИЭГМ УрО РАН (протокол №16 от 5.06.2022) и проведено в соответствии с этическими стандартами национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. Клиническая и демографическая характеристика участников исследования представлена в таблице 1. Исследуемые группы не отличались по возрастному составу.

Таблица 1 – Клиническая и демографическая характеристика участников исследования

Исследуемые группы	N	Возраст	Срок беременности, недель
Небеременные женщины	5	29 (20–37)	-
Беременные, I триместр	7	26 (21–35)	10 (5–12)
Беременные, III триместр	5	33 (27–41)	35 (28–39)

Примечание: данные представлены в виде Медианы и межквартильного размаха, Me(Q1-Q3); N – количество проведенных исследований

Анализ фенотипа клеток. Венозную кровь забирали из локтевой вены утром натощак объемом 2 мл в вакуумные пробирки с ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота) в качестве антикоагулянта. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMCs) выделя-

ли методом седиментации в градиенте плотности фиколл-урографина (1,077 г/см³) по стандартной методике. После двукратной отмывки в фосфатно-солевом буфере (PSB) проводили окрашивание клеток с использованием антител (табл. 2).

Таблица 2 – Характеристика используемых антител

Антитело	Флюорохром	Клон	Изотип	Компания-производитель
CD3	PE	ОКТ3	Mouse/IgG2a, κ	eBioscience, США
CD14	PE	M5E2	Mouse/IgG2a, κ	BioLegend, США
CD19	PE	H1B19	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD56 (NCAM)	Brilliant Violet 605™	HCD56	Mouse/IgG1, κ	BioLegend, США
CD16	Pacific blue™	3G8	Mouse IgG1, κ	BioLegend, США
GLUT1	PE-Cy5.5	polyclonal	Rabbit IgG	Biorbyt, Великобритания
Zombie UV™	-	-	-	BioLegend, США

Фенотип клеток определяли методом проточной цитометрии (проточный цитометр «CytoFlex S» и программное обеспечение «CytExpert 2.0», Beckman Coulter, США). Для анализа фенотипа клеток использовали не менее 1×10^6 событий в каждой пробе. Для контроля неспецифического связывания и выделения негативного по флюоресценции окна использовали соответствующие FMO (Fluorescence Minus One) и негативные контроли. Определяли количество регуляторных CD56^{bright}CD16⁻NK-клеток, цитотоксических CD56^{dim}CD16⁺ и CD56⁻CD16^{hi} NK-клеток в гейте CD3⁺/CD14⁺/CD19⁺ живых PBMCs [16, 36]. Затем в каждой субпопуляции NK-клеток определяли экспрессию молекулы Glut-1 (рис. 1). На рис. 1 представлены гистограммы одного репрезентативного эксперимента.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с помощью программы «Prism 8.0.1.» (Graphpad, США). Для проверки нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова. Достоверность различий между группами (небеременные – NP (группа сравнения); беременные в I триместре (I); беременные в III триместре (III)) определяли с использованием критерия Крускала-Уоллиса для множественных сравнений независимых переменных. Данные в рисунке представлены в виде медианы (Me), нижних (LQ) и верхних квартилей (UQ). Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

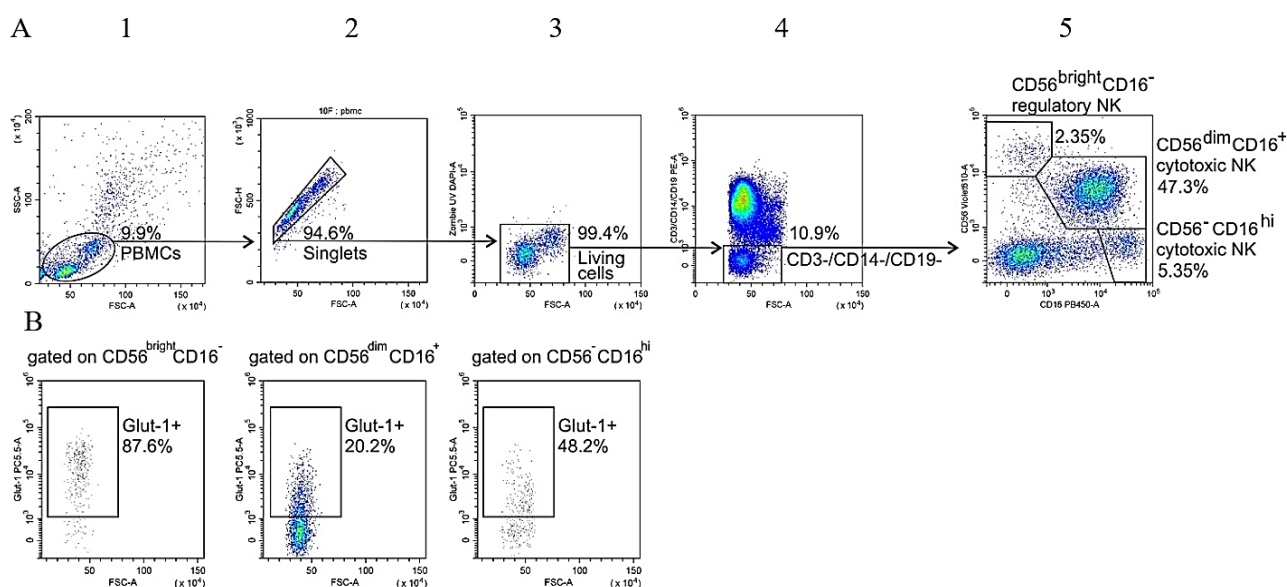


Рис. 1. Стратегия гейтирования, используемая для анализа разных субпопуляций НК-клеток периферической крови и экспрессии Glut-1. (А) 1 – выделение лимфоцитарного гейта по параметрам площади прямого (FSC-A) и высоты бокового (SSC-H) светорассеивания; 2 – дискриминация слипшихся клеток (дуплетов) по параметрам площади и высоты прямого светорассеивания (FSC-A/FSC-H); 3 – определение живых клеток (living cells), негативных по окрашиванию Zombie UV™ (Zombie UV™ Fixable Viability Kit, BioLegend); 4 – выделение негативной популяций по маркерам CD3/CD14/CD19 в гейте живых PBMcs; 5 – определение регуляторной субпопуляции (regulatory) NK-клеток как процента CD16⁻CD56^{bright}- и цитотоксических субпопуляций (cytotoxic) NK-клеток как процента CD16⁺CD56^{dim} и CD16^{hi}CD56⁻ в гейте CD3/CD14/CD19-негативных PBMcs. (В) оценка экспрессии молекулы Glut-1 в исследуемых субпопуляциях NK-клеток.

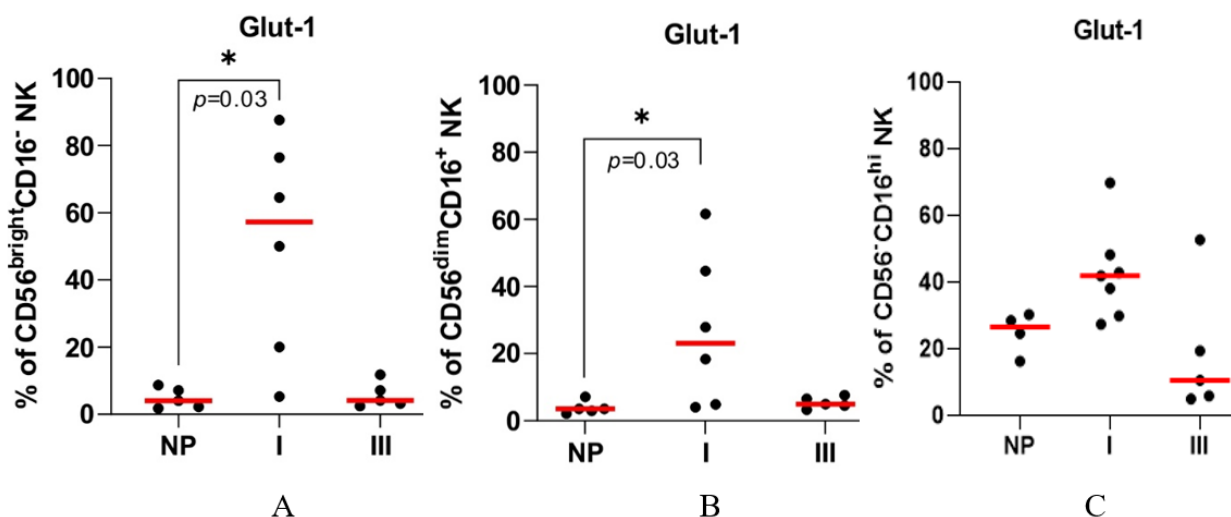


Рис. 2. Экспрессия молекулы Glut-1 в исследуемых субпопуляциях НК-клеток. Данные представлены в виде процента Glut-1-экспрессирующих клеток от исследуемых субпопуляций: регуляторной (regulatory) CD16⁻CD56^{bright}-клеток; цитотоксических (cytotoxic) CD16⁺CD56^{dim}, цитотоксической истощенной CD16^{hi}CD56⁻ NK. * – $p < 0,05$ по отношению к небеременным (NP) по критерию Крускала-Уоллиса для множественных сравнениях независимых выборок

Результаты и обсуждение. Установлено, что разные субпопуляции NK-клеток периферической крови небеременных женщин отличаются по экспрессии транспортера глюкозы Glut-1. Так у небеременных наибольшая экспрессия Glut-1 выявляется на цитотоксических истощенных $CD16^{hi}CD56^{-}$ NK-клетках, а на цитотоксических $CD16^{+}CD56^{dim}$ и регуляторных $CD16^{dim}CD56^{bright}$ NK-клетках экспрессия Glut-1 ниже и не отличается друг от друга (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о разной метаболической активности и объясняют функциональную гетерогенность субпопуляций NK-клеток периферической крови, что согласуется с исследованиями других авторов [1]. В первом триместре беременности экспрессия Glut-1 значительно увеличена на регуляторных $CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK-клетках, тогда как в третьем триместре количество $Glut-1^{+}CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK-клеток возвращается к исходным значениям и не отличается от небеременных (рис. 2). На цитотоксических $CD16^{+}CD56^{dim}$ NK-клетках экспрессия Glut-1 также увеличивается в первом триместре по сравнению с небеременными (рис. 2). А в третьем триместре количество цитотоксических $Glut-1^{+}CD16^{+}CD56^{dim}$ NK-клеток не отличается от небеременных.

Поскольку транспорт глюкозы в клетку напрямую отражает ее метаболическую активность, можно заключить, что в первом триместре беременности существенные изменения функциональной активности NK-клеток обусловлены усиленным потреблением глюкозы и, как следствие, активацией метаболизма. Причем регуляторные $CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK-клетки, функциональная активность которых претерпевает существенные изменения именно в первом триместре беременности, демонстрируют наиболее значимое увеличение экспрессии Glut-1 по сравнению с другими субпопуляциями NK-клеток. Количество цитотоксических $Glut-1^{+}CD16^{hi}CD56^{-}$ NK-клеток не меняется ни в первом, ни в третьем триместре по сравнению с небеременными, что, по-видимому, объясняется исходно высокой экспрессией Glut-1.

Полученные результаты согласуются с мнением ряда авторов, характеризующих $CD16^{hi}CD56^{-}$ NK-клетки как истощенные или терминально дифференцированные клетки с низкой функциональной активностью [4]. Таким образом, можно заключить, что разные субпопуляции NK-клеток отличаются по экспрессии транспортера глюкозы Glut-1 как у небеременных, так и по триместрам беременности, что отражает изменения из функциональной активности. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о механизмах регуляции функциональной активности NK-клеток при беременности.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №22-25-00694.

Библиографический список

1. Dzamukova M.R., Dzamukova M.R., Naumenko E.A., Lvov Y.M., Fakhrullin R.F. Enzyme-activated intracellular drug delivery with tubule clay nanoformulation // *Sci. Rep.* – 2015. – V.5. – № 10560. – P. 1–11.
2. Keating S.E., Zaiatz-Bittencourt V., Loftus R.M., Keane C., Brennan K., Finlay D.K., Gardiner C.M. Metabolic Reprogramming Supports IFN- γ Production by $CD56^{bright}$ NK Cells. // *J. Immunol.* – 2016. – V. 196(6). – P. 2552–2560.
3. Saito S., Nakashima A., Myojo-Higuma S., Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy // *J. of Reprod. Immunol.* – 2008. – V. 77(1). – P. 14–22.

4. Shojaei Z., Jafarpour R., Mehdizadeh S., Bayatipoor H., Pashangzadeh S., Motalebnezhad M. Functional prominence of natural killer cells and natural killer T cells in pregnancy and infertility: A comprehensive review and update // *Pathol. Res. Pract.* – 2022. – V. 238. – P. 154062.
5. Cocker A.T.H., Liu F., Djaoud Z., Guethlein L.A., Parham P. CD56-negative NK cells: Frequency in peripheral blood, expansion during HIV-1 infection, functional capacity and KIR expression. // *Front. Immunol.* – 2022. – V.13 – P. 992723.

ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ CAMPYLOBACTER С СИСТЕМОЙ СЕКРЕЦИИ VI ТИПА

Кравченко А.С., Соболева О.М.

Кемеровский государственный медицинский университет, Кемерово, Россия

Аннотация. Система секреции VI типа (T6SS) – контактно-зависимая система секреции, присутствующая у ряда грамотрицательных бактерий, включая некоторые штаммы *Campylobacter*. Наличие T6SS определяет характер взаимодействия с макроорганизмом, бактериальный антагонизм и колонизационные возможности изолятов *Campylobacter*. Особенности строения T6SS кампилобактерий обуславливают необходимость ее функционального и структурного исследования.

Ключевые слова: кампилобактериоз, кампилобактерии, система секреции

FEATURES OF CAMPYLOBACTER ISOLATES WITH A TYPE VI SECRETION SYSTEM

Kravchenko A.S., Soboleva O.M.

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia

Abstract. Type VI secretion system (T6SS) is a contact-dependent secretion system present in a number of Gram-negative bacteria, including some *Campylobacter* strains. The presence of T6SS determines the nature of interaction with the macroorganism, bacterial antagonism and colonization abilities of *Campylobacter* isolates. The structural features of campylobacteria T6SS require their functional and structural study.

Keywords: campylobacteriosis, *Campylobacter*, secretion system

Введение

Campylobacter – ведущий возбудитель бактериального гастроэнтерита человека, комменсал желудочно-кишечного тракта сельскохозяйственных животных, потенциально канцерогенный микроорганизм. Изучение особенностей патогена является актуальным на фоне его высокой распространенности и социально-экономической значимости. Одним из таких свойств является наличие системы секреции VI типа.

Структура и механизм действия T6SS

Бактериальные системы секреции необходимы для доставки в клетки-мишени активных белков (ферментов, токсинов) для реализации их патогенной/защитной функции. Различают 10 (I-X) систем секреции, отличающихся по своему строению и механизму действия.

Система секреции VI типа (T6SS) не самая распространенная, она является контактно-зависимой и осуществляет доставку как в соседние клетки, так и во внеклеточное пространство.

Полностью собранный аппарат T6SS требует минимального набора из 13 белков, называемых ядерными компонентами. Компоненты образуют четыре различные структуры: комплекс мембранного ядра, базовую пластинку, цитоплазматическую сократительную оболочку и прокалывающую иглу, состоящую из внутренней трубки и шипа.

Мембранный комплекс и базовая пластинка формируют каркас системы секреции, а цитоплазматическая сократительная оболочка выталкивает прокалывающую иглу. Именно данная структура обеспечивает доставку эффекторных белков в клетки-мишени [1]. Эффекторы выполняют несколько функций, играя роль фактора патогенности, проявляя антибактериальную конкуренцию, а также осуществляя межбактериальную коммуникацию [2].

Основной белок прокалывающей иглы – корегулируемый гемолизином белок (Hcp) – формирует внутреннюю трубку, шип и выполняет не только структурную, но и эффекторную функцию. В отличие от остальных грамотрицательных бактерий, которые имеют несколько типов Hcp, выполняющих либо структурную, либо функциональную роль, T6SS кампилобактерий характеризуется наличием только одного Hcp, несущего смешанную функцию.

Такой «смешанный» Hcp характеризуется слабой цитотоксичностью, низкой гемолитической активностью, однако усиливает объем образования биопленки штаммами *Campylobacter* [3].

Бактериальный антагонизм

T6SS может напрямую вводить токсины не только в эукариотические, но и в прокариотические клетки, что способствует поддержанию межбактериальной конкуренции [4].

T6SS способна нацеливаться на протеобактериальных комменсалов, таких как полезные симбиотические штаммы *E.coli*, которые занимают взаимовыгодные ниши. Это особенно важно для кампилобактерий – кишечных патогенов, конкурирующих с устоявшимися популяциями в кишечнике. После стабильной колонизации, осуществляемой в том числе и системой T6SS, *Campylobacter* приобретает преимущество перед другими колонизаторами и резидентами.

Для изолятов *Campylobacter* бактериальный антагонизм необходим не только для колонизации интактного кишечника, но и для получения конкурентного преимущества в условиях опухолевого развития и перестройки микробиоты на грамотрицательную. Подобное антипрокариотическое взаимодействие определяет роль кампилобактерий как «бактерий-пассажира» в канцерогенезе [5].

Реализация антибактериального действия посредством T6SS возможна за счёт эффекторов, среди которых:

- мурамидаза и глюкозаминидаза, разрушающие гликановую основу пептидогликана;
- эффекторы с фосфолипазной активностью, направленные на разрушение клеточных мембран;
- эффекторы с нуклеазной активностью [6].

Межбактериальное взаимодействие также может осуществляться не только через механизмы агрессии, но и через механизмы защиты. В системе эффекторов T6SS выделяют иммунные белки, наделенные свойствами антитоксинов. Они необходимы для предотвращения самоинтоксикации и нейтрализации токсинов других микроорганизмов [7].

Так как T6SS является не единственной секреторной системой, встречающейся среди изолятов *Campylobacter*, предполагается, что ее синтез определяется чувством кворума и имеет превалирующее межбактериальное значение, а патогенность микроорганизма для организма-хозяина определяется функционированием систем секреции III/IV типа [8].

Взаимодействие с макроорганизмом

Во время колонизации организма хозяина *Campylobacter* подвергается иммунному ответу в желудочно-кишечном тракте, например, через воздействие факторов местного иммунитета – желчных кислот или развитие оксидативного стресса.

T6SS показывает неоднородное взаимодействие с защитными механизмами макроорганизма. В сравнении со штаммами *Campylobacter*, обладающими системами секреции III или IV типа, штаммы с T6SS проявляют лучшую сопротивляемость воздействию активных форм кислорода и меньшую устойчивость к действию желчных кислот.

Установлено, что среди эффекторов системы секреции VI типа, по-видимому, присутствуют каталаза и супреоксиддисмутаза, которые способствуют нейтрализации активных форм кислорода и уменьшению окислительного стресса. Показана повышенная способность к выживанию после воздействия оксидативного стресса у T6SS-ассоциированных штаммов *Campylobacter* [7].

Функционирующая система T6SS *Campylobacter jejuni* способствует выживанию микроорганизма при воздействии верхнего диапазона физиологических концентраций солей желчных кислот. Однако эти же изоляты *Campylobacter* проявляют сильное торможение роста при экстремальных концентрациях дезоксихолевой кислоты. Наличие T6SS не влияет на мембранную проницаемость, поэтому повышенная чувствительность к дезоксихолевой кислоте связана с особенностями строения системы секреции и обусловлена повышенным притоком желчных кислот, ингибирующих рост клеток [9].

По этой причине T6SS-ассоциированные изоляты кампилобактерий не могут эффективно колонизировать те области кишечника, где отмечается высокая концентрация желчных кислот, например, тонкий отдел кишечника. Существует предположение, что наличие T6SS является эволюционным приспособлением для изолированной колонизации толстого кишечника, где также успешно реализуется функция бактериального антагонизма T6SS.

Изоляты *Campylobacter*, ассоциированные с системой секреции VI типа, проявили повышенную адгезионную способность, так как Hcp – ключевой белок T6SS – играет важнейшую роль в усилении адгезии и инвазии клеток организма-хозяина [9].

Имеющиеся предположения о корреляции кровавой диареи и носительства T6SS среди штаммов кампилобактерий не подтверждены. На сегодняшний день нет сведений о клинических особенностях течения T6SS-ассоциированных кампилобактериозов. T6SS характеризуется большей распространенностью среди лиц с сопутствующей патологией, в особенности среди лиц, получающих иммуносупрессивную терапию [10].

Заключение

Наличие T6SS не является существенным для жизнеспособности, роста или подвижности кампилобактерий. Система секреции VI типа – важный инструмент межбактериального взаимодействия, который применяется изолятами *Campylobacter* для успешной колонизации отделов толстого кишечника. Особенности строения T6SS кампилобактерий проявляются отличиями во взаимодействии с организмом хозяина. Ранее считавшаяся редкостью в микробном мире, система T6SS характеризуется нарастающей распространенностью среди грамотрицательных патогенов и требует дальнейшего изучения.

Библиографический список

1. Coulthurst S. The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon // *Microbiology (Reading)*. – 2019. – V. 165. – № 5. – P. 503–515. – DOI 10.1099/mic.0.000789.

2. Панкратов Т.А. Анализ геномов двух бактериобионтов лишайников, *Lichenibacterium ramalinae* и *Lichenibacterium minor*: токсин-антитоксин системы и белки секреции / Т.А. Панкратов П.А. Никитин, Е.О. Патутина // Микробиология. – 2022. – Т. 91, № 2. – С. 191–203. – DOI 10.31857/S0026365622020112.
3. Noreen Z, Jobichen C, Abbasi R, Seetharaman J, Sivaraman J, Bokhari H. Structural basis for the pathogenesis of *Campylobacter jejuni* Hcp1, a structural and effector protein of the Type VI Secretion System // FEBS J. – 2018. – V. 285. – № 21. – P. 4060–4070. – DOI 10.1111/febs.14650.
4. Sana TG, Lugo KA, Monack DM. T6SS: The bacterial "fight club" in the host gut // PLoS Pathog. – 2017. – V. 13. – № 6. – P. 1006325. – DOI 10.1371/journal.ppat.1006325.
5. Wang Y, Zhang C, Hou S, Wu X, Liu J, Wan X. Analyses of Potential Driver and Passenger Bacteria in Human Colorectal Cancer // Cancer Manag Res. – 2020. – V. 12. – P. 11553–11561. – DOI: 10.2147/CMAR.S275316.
6. Russell A., Peterson, S. & Mougous, J. Type VI secretion system effectors: poisons with a purpose // Nat Rev Microbiol. – 2014. – V. 12. – P. 137–148. – DOI 10.1038/nrmicro3185
7. Liaw J., Hong G, Davies C, Elmi A, Sima F, Stratakis A, Stef L, Pet I, Hachani A, Corcionivoschi N, Wren BW, Gundogdu O, Dorrell N. The *Campylobacter jejuni* Type VI Secretion System Enhances the Oxidative Stress Response and Host Colonization // Front Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 2864. – DOI:10.3389/fmicb.2019.02864
8. Gabbert AD, Mydosh JL, Talukdar PK, Gloss LM, McDermott JE, Cooper KK, Clair GC, Konkel ME. The Missing Pieces: The Role of Secretion Systems in *Campylobacter jejuni* Virulence // Biomolecules. – 2023. – V. 13. – №1. – P. 135. – DOI 10.3390/biom13010135
9. Lertpiriyapong K, Gamazon ER, Feng Y, Park DS, Pang J, Botka G, Graffam ME, Ge Z, Fox JG. *Campylobacter jejuni* type VI secretion system: roles in adaptation to deoxycholic acid, host cell adherence, invasion, and in vivo colonization // PLoS One. – 2012. – V. 7. – №8. – P. 42842. – DOI 10.1371/journal.pone.0042842.
10. Agnetti J, Seth-Smith HMB, Ursich S, Reist J, Basler M, Nickel C, Bassetti S, Ritz N, Tschudin-Sutter S, Egli A. Clinical impact of the type VI secretion system on virulence of *Campylobacter* species during infection // BMC Infect Dis. – 2019. – V. 19. – №1. – P. 237. – DOI 10.1186/s12879-019-3858-x.

ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА, ИНДУЦИРОВАННАЯ КИСЛОЙ СРЕДОЙ

Курасова Д.А., Кулакова Ю.С., Раззорова Е.А., Горшкова Е.Н.

*Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия*

Аннотация. Сегодня все больше внимания получают комплексные иммуноглобулиновые препараты. Хотя существует множество данных, подтверждающих увеличение терапевтических свойств препаратов на основе IgG в результате индукции полиреактивности антител, для комплексных препаратов подобных сведений нет. В ходе исследования была показана возможность приобретения полиреактивности иммуноглобулинами в составе комплексного иммуноглобулинового препарата на примере комплексного иммуноглобулинового препарата для энтерального применения под действием буферов с кислым значением pH.

Ключевые слова: иммуноглобулины; комплексные иммуноглобулиновые препараты (КИП), полиреактивность; буферы с кислым значением pH

POLYREACTIVITY OF IMMUNOGLOBULINS IN A COMPLEX IMMUNOGLOBULIN PREPARATION INDUCED BY AN ACIDIC ENVIRONMENT

Kurasova D.A., Kulakova Yu.S., Razzorenova E.A., Gorshkova E.N.

Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract. Complex immunoglobulin preparations are gaining increasing attention. Although there is a wealth of evidence to support an increase in the therapeutic properties of IgG-based preparations as a result of the induction of antibody polyreactivity, there is no such evidence for complex preparations. In the course of this study, the possibility of polyreactivity being acquired by immunoglobulins as part of a complex immunoglobulin preparation was demonstrated using a complex immunoglobulin preparation for enteral administration under the influence of acidic pH buffers.

Keywords: immunoglobulins; complex immunoglobulin preparations (KIP); polyreactivity; acidic pH buffers

За последнее время достигнут большой прогресс в использовании иммуноглобулинов для лечения и профилактики различных заболеваний от раковых до инфекционных, потому что эти молекулы играют важную роль защите нашего организма от патогенов, которые они распознают, связывают и способствуют их уничтожению.

Однако до сих пор активно изучается возможность улучшения терапии с использованием антител [1][2]. Одним из способов повышения эффективности терапевтических препаратов может стать приобретение ими способности связывать несколько структурно не род-

ственных антигенов, т.е. индукция их полиреактивных свойств [3]. Впервые это явление было обнаружено при изучении целевых свойств семи коммерческих препаратов IgG ($\geq 95\%$ IgG), предназначенных для внутривенного введения.

Препараты IgG, которые в процессе своего фракционирования подверглись обработке буферами с кислым значением pH, приобрели полиреактивные свойства по отношению к смеси антигенов [4]. Позже была установлена способность иммуноглобулина G под действием других мягких денатурирующих факторов, например, ионами Fe^{2+} , хаотропными агентами или геминном, приобретать подобную антигенсвязывающую полиреактивность [5].

В настоящее время данные о возможности приобретения полиреактивных свойств иммуноглобулинами в составе комплексных иммуноглобулиновых препаратов отсутствуют. В связи с чем целью работы стало исследование возможности приобретения полиреактивных свойств иммуноглобулинами классов G, A и M в составе комплексного иммуноглобулинового препарата (КИП) под действием буферов с кислыми значениями pH.

В работе был использован комплексный иммуноглобулиновый препарат (КИП) для энтерального применения (Микроген, Россия), в состав которого входят иммуноглобулины классов G, A и M (50% IgG, 25% IgA, 25% IgM). В качестве антигенов использовали рекомбинантный антиген VP3 норовируса, антиген VP1 энтеровируса (предоставлен НИИЭМ имени академика И.Н. Блохиной, Нижний Новгород, Россия) и фактор свертывания крови IX.

Иммуноглобулины G, A и M в составе КИП модифицировали под действием кислых условий среды. Для этого использовали 0,25 М глицин-HCl буфер или глициновый буфер (0,25 М глицин) со значениями pH 2,6 и 4,0. Компоненты добавляли в соотношении 9:1 и инкубировали в течение 10 мин. Реактивность иммуноглобулинов против антигенов оценивали с помощью иммуноферментного анализа. Показатели кислотности среды были подобраны в соответствии с наиболее часто используемыми значениями pH на отдельных этапах коммерческого производства иммуноглобулиновых препаратов.

В результате проведенных экспериментов нами было продемонстрировано, что после обработки буферами с кислыми значениями pH иммуноглобулины класса M в составе КИП снижают свою аффинность в отношении антигенов VP3 Norovirus (рис. 1), VP1 Enterovirus (рис. 2) и фактора свертывания крови IX (рис.3), в то время как иммуноглобулины классов G и A никак не изменяют свою антигенсвязывающую способность.

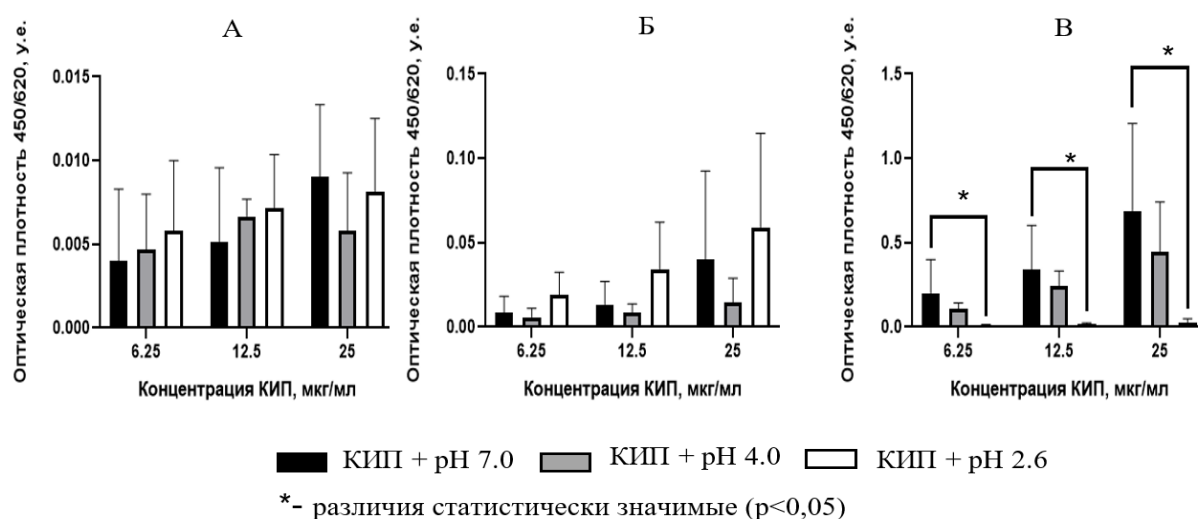


Рис. 1. Изменение оптической плотности, отражающее количество модифицированных буферами с кислыми значениями pH иммуноглобулинов классов А (А), G (Б) и М (В), связавшихся с антигеном VP1 *Enterovirus*

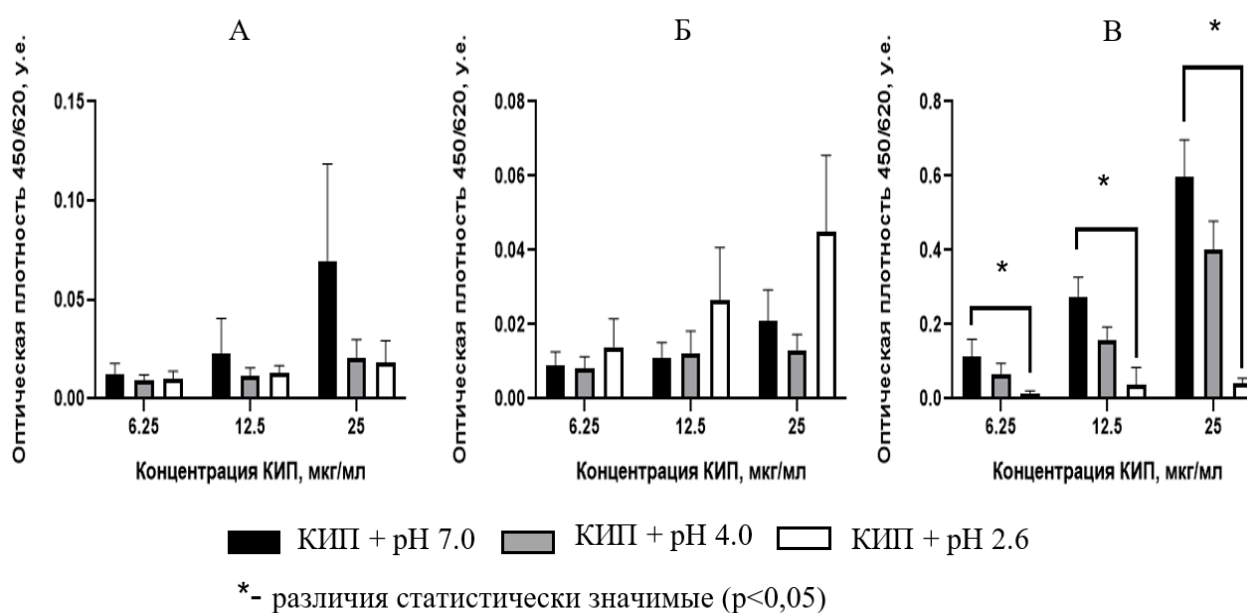


Рис. 2. Изменение оптической плотности, отражающее количество модифицированных буферами с кислыми значениями pH иммуноглобулинов классов А (А), G (Б) и М (В), связавшихся с антигеном VP3 *Norovirus*

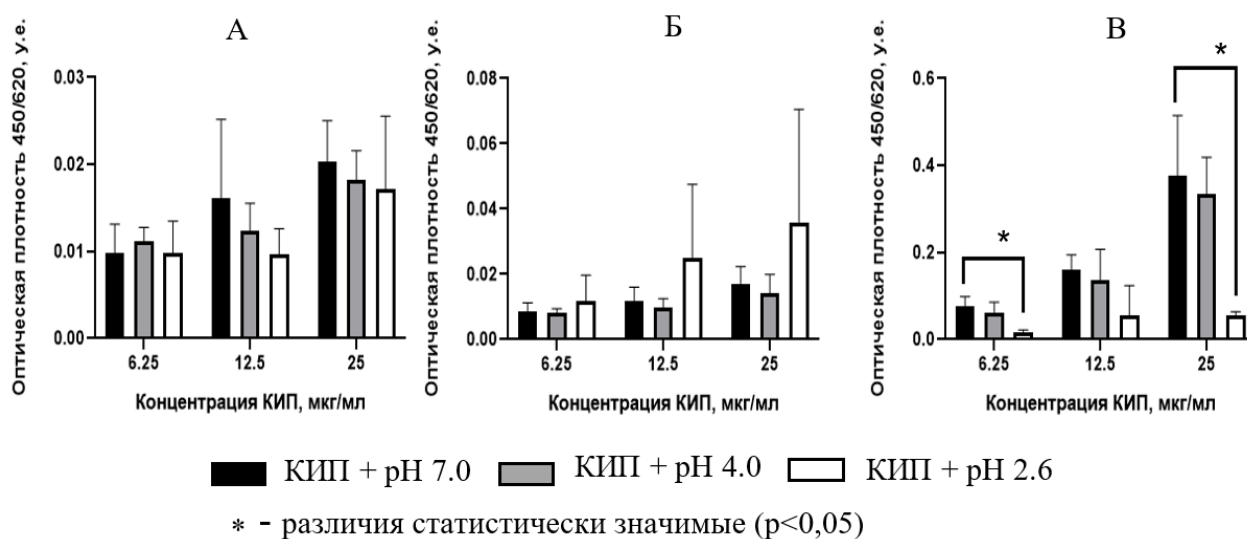


Рис. 3. Изменение оптической плотности, отражающее количество модифицированных буферами с кислыми значениями pH иммуноглобулинов классов А (А), G (Б) и М (В), связавшихся с фактором свертывания крови IX.

Таким образом нами было показано, что буферы с кислым значением pH могут влиять на антигенсвязывающие свойства иммуноглобулинов классов G, А и М в составе КИП.

Библиографический список

1. Черешнев В.А., Шмагель К.В. Иммунология. М.: Издательский дом «Магистр-Пресс», 2012. 448 с.
2. Otten M., Rudolph E., Dechant M. et al. Immature Neutrophils Mediate Tumor Cell Killing via IgA but Not IgG Fc Receptors // J Immunol. 2005. Vol. 174, № 9. P. 5472–5480.

3. Dimitrov J., Pashov A., Vassilev T. Antibody Polyspecificity: What Does It Matter? // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2012. Vol. 750. P. 213–226.
4. Djoumerska I., Tchorbanov 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.
5. Василев Ч.Л., Старкина О.В. Иммуноглобулины человека как иммуномодулирующие препараты // *Молекулярная биология*. 2019. Т. 53, № 5. С. 860–870.

РОЛЬ ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК (ILC) В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

Некрасова И.В.

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

Аннотация. Рассеянный склероз – аутоиммунное заболевание, поражающее центральную нервную систему и характеризующееся демиелинизацией нейронов, приводящей к изнурительному течению болезни. В последнее время увеличилось количество публикаций о роли недавно выделенной популяции клеток врожденного иммунитета – врожденных лимфоидных клеток (ILC) – в патогенезе рассеянного склероза, что и будет рассмотрено в данном обзоре.

Ключевые слова: врожденные лимфоидные клетки, рассеянный склероз

ROLE OF INNATE LYMPHOID CELLS IN MULTIPLE SCLEROSIS PATHOGENESIS

Nekrasova I.V.

*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. Multiple sclerosis is an autoimmune disease that attacks the central nervous system, and is characterized by demyelination of neurons resulting in a debilitating illness. Recently, there has been an increase in the number of publications on the role of a recently isolated population of innate immunity cells, innate lymphoid cells (ILC), in multiple sclerosis pathogenesis that will be discussed in this review.

Keywords: innate lymphoid cells, multiple sclerosis

Рассеянный склероз (РС) – воспалительное и хроническое заболевание центральной нервной системы (ЦНС), при котором потеря аксонов/нейронов и глиоз вызваны демиелинизацией. Примерно у 85% пациентов наблюдается рецидивирующе-ремиттирующее (РР) течение с острыми приступами с последующей ремиссией. РС является мультифакториальным заболеванием, и общепринято считать, что он имеет аутоиммунную этиологию с участием факторов окружающей среды у лиц с генетической предрасположенностью [1]. Установлено, что аутореактивные CD4⁺ Т-клетки, специфически нацеленные на компоненты миелина в ЦНС, наряду с большим количеством иммунных клеток, играют решающую роль в запуске воспаления, вызывают демиелинизацию и нейроаксональное повреждение [2].

В последнее время увеличилось количество публикаций о роли недавно выявленной популяции клеток врожденного иммунитета – врожденных лимфоидных клеток (ILC) – в патогенезе РС [3]. На поверхности этих клеток отсутствуют антигенспецифические реаранжи-

рованные рецепторы Т- или В-клеток. ILC распознают и связывают не специфические антигены, а молекулы или растворимые факторы, экспрессируемые на других клетках. Как следствие, они быстро реагируют на сигналы внеклеточной среды и представляют собой одну из первых линий защиты организма. ILC существуют в первичных и вторичных лимфоидных органах, а также их можно обнаружить в периферической крови.

Номенклатура ILC

ILCs начинают дифференцироваться от общего лимфоидного предшественника в костном мозге или печени плода. Дальнейшее последовательное вовлечение микробных сигналов, цитокинов и факторов транскрипции имеет решающее значение для развития трех отдельных групп зрелых ILC. ILC1 образуются в ответ на IL-12; они состоят из естественных клеток-киллеров (NK) и нецитотоксических ILC1, экспрессируют T-bet и продуцируют IFN- γ и TNF- α . ILC2 высоко экспрессируют GATA3, чувствительны к IL-25, IL-33 и TSLP и продуцируют IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 и амфирегулин. ILC3 чувствительны к IL-1 β и IL-23, экспрессируют ROR γ t и продуцируют IL-17 и/или IL-22 [3]. Считается, что благодаря своему транскрипционному и цитокиновому профилям зрелые ILCs, по-видимому, являются врожденным аналогом Т-хелперных клеток CD4. Действительно, ILC1 аналогичны Th1, ILC2 отражают Th2, а ILC3 – подтип Th17/22. Однако, как и в случае с Т-хелперными клетками, эта классификация не является полностью фиксированной, поскольку гетерогенность и пластичность являются характерными особенностями ILC во всех подтипах [4].

Эффекторные функции хелперных ILC во многом определяются продуцируемыми ими цитокинами. При многих воспалительных процессах ILCs, по-видимому, служат ранним источником Т-хелперных цитокинов до того, как в игру вступают адаптивные иммунные клетки. Однако следует отметить, что механизмы, используемые ILC для регуляции адаптивных лимфоцитов и миелоидных клеток, не ограничиваются продукцией цитокинов, но также включают презентацию антигена и экспрессию коингибирующих и/или костимулирующих молекул [4].

ILC1

На мышинной модели РС – экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) – было показано, что NKp46⁺T-bet⁺ хелперные ILC находятся в мозговых оболочках. Эти клетки продуцируют IFN- γ и тем самым способствуют созданию провоспалительной цитокиновой среды, которая приводит к проникновению миелин-реактивных клеток Th17 в ЦНС [5]. Важно отметить, что NKp46⁺-клеточная делеция транскрипционного фактора Eomes, который экспрессируется в классических NK-клетках («киллерных» ILC), но не в хелперных ILC, не влияет на тяжесть заболевания, что исключает важную роль NKp46⁺T-bet⁺ NK-клеток в этой модели переноса ЭАЭ. В то время как мыши со специфичной для NKp46 делецией T-bet имели более низкие средние клинические показатели и заболеваемость, максимальные клинические показатели у больных животных были сопоставимы с таковыми у контрольных мышей, что позволяет предположить, что, хотя NKp46⁺T-bet⁺ клетки важны для инициации заболевания, они могут быть чрезмерно активированы в эффекторной фазе воспаления ЦНС [5].

ILC1 в стабильном сосудистом сплетении (СС) продуцируют TNF- α и IFN- γ при ЭАЭ; при этом они могут синергически регулировать уровни TNF-R1 и IFN- γ R, экспрессируемые эндотелием СС [6]. IFN- γ активирует широкий спектр транспортных молекул, экспрессируемых эпителием СС, таких как хемокины (CCL2, CCL5, CXCL9, CXCL10, CX3CL1), молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM1) и молекула 1 адгезии сосудистых клеток (VCAM1), которые способствуют перемещению иммунных клеток через эпителиальные барьеры СС [6]. Та-

ким образом, ILC1 в СС, вероятно, действуют как привратники для проникновения иммунных клеток в результате нейровоспаления в ЦНС.

NK-клетки

NK-клетки обладают способностью регулировать аутоиммунные механизмы посредством продукции цитокинов или цитотоксического действия непосредственно против эффекторных клеток, таких как аутореактивные Т-клетки или антигенпрезентирующие клетки. В то же время они также могут лизировать лиганды NKG2D микроглии, астроцитов и олигодендроцитов, что указывает на двойную функцию NK-клеток при РС. Рецептор NKp44 экспрессируется только на активированных NK-клетках и передает как активирующие, так и ингибирующие сигналы. Его лиганд NKp44L экспрессируется астроцитами, а взаимодействие NKp44-NKp44L активирует функцию NK-клеток, что приводит к NK-опосредованной гибели астроцитов [7].

Некоторые исследования показали дефицит цитотоксической активности NK-клеток в периферической крови больных РС [8]. Кроме того, снижение цитотоксической активности NK-клеток было выявлено у пациентов с РС до появления поражений ЦНС и клинических симптомов, и эта недостаточная активность коррелировала с приступами РС и возникновением новых поражений [8]. Дефицит цитотоксической активности NK-клеток может приводить к увеличению доли аутоиммунных клеток, что может быть связано с прогрессированием заболевания. В свою очередь, цитотоксичность противовирусных NK-клеток также необходимо учитывать в патогенезе РС. Вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус герпеса человека (HHV)-6 и цитомегаловирус (CMV) считаются кандидатами на роль индукторов РС в результате молекулярной мимикрии. IFN- β представляет собой противовирусный цитокин, эффективно используемый в лечении РС, это подтверждает гипотезу о том, что вирусные инфекции считаются факторами риска РС. В настоящее время имеются доказательства того, что способность контролировать хронические вирусные инфекции участвует в запуске аутоиммунных реакций, приводящих к РС [9]. Следовательно, цитотоксическая активность NK-клеток также важна для защиты от развития РС, поскольку они являются ранними защитниками от вирусных инфекций. При этом связь сниженной цитотоксичности и приступов РС предполагает, что ценность цитотоксической активности NK-клеток не ограничивается предотвращением прогрессирования заболевания посредством контроля вирусных инфекций, но также полезна для замедления прогрессирования заболевания.

NK-клетки CD56^{bright} активно изучаются в контексте РС из-за их иммунорегуляторных функций. Эта подгруппа NK-клеток может подавлять пролиферацию Т-клеток и опосредовать ответы Т-клеток, секретируя IFN- γ и IL-10. Также известно, что NK-клетки CD56^{bright} убивают некоторые клетки-мишени, особенно аутологичные здоровые Т-клетки. Показано, что CD56^{bright} и CD56^{dim} NK-клетки могут лизировать Т-клетки с разными состояниями активации в ответ на разные стимулы [10]. Таким образом, различия в функциональных характеристиках NK-клеток CD56^{bright} и CD56^{dim} требуют отдельной интерпретации данных исследований NK-клеток при РС. Некоторые исследования показали, что у пациентов, получавших алемтузумаб, даклизумабанд и производные IFN- β , наблюдался повышенный уровень CD56^{bright} NK-клеток по сравнению со здоровыми людьми [11]. Эти данные свидетельствуют о защитном эффекте NK-клеток CD56^{bright} при РС, но функциональный анализ клеток не столь однозначен. Основными цитокинами, продуцируемыми NK-клетками CD56^{bright}, являются IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, IL-10 и IL-13, что зависит от окружения. Из-за своей важной роли в аутоиммунитете IFN- γ и Th1 клетки, продуцирующие IFN- γ , рассматриваются как потенциальные патогенные факторы развития РС. Поскольку IFN- γ является одним из основ-

ных цитокинов NK-клеток, его уровни были измерены и показано, что продукция изменена в CD56^{bright} NK-клетках нелеченных пациентов с РС. Показано, что уровни IFN- γ в клетках CD56^{bright} снижаются у леченных пациентов с РС и у нелеченных пациентов даже после приема добавок IL-12 (основной стимулятор IFN- γ) [12].

ILC2

ILC2 играют потенциально защитную роль при аутоиммунном нейровоспалении в отличие от подтипов ILC1 и ILC3. Показано, что снижение количества ILC2 в воспаленной ЦНС может быть ответом на гендерные различия в восприимчивости к ЭАЭ, наблюдаемые у мышей SJL. ILC2 накапливались в ЦНС самцов, резистентных к ЭАЭ, при этом восприимчивые самки характеризовались отсутствием клеток в очаге воспаления. Следует отметить, что самцы W/W^v мышей SJL с мутацией Kit, делающей их дефицитными по ILC2, восстанавливали восприимчивость к ЭАЭ, как и восприимчивые самки. Этот фенотип не зависел от сопутствующего дефицита тучных клеток. Предположение о противовоспалительной роли ILC2 при нейровоспалении подтверждается несколькими исследованиями, демонстрирующими, что у мышей с дефицитом ST2/IL-33R α , лишенных ILC2, наблюдается обострение ЭАЭ. Дальнейшее лечение IL-33 (индуктором ILC2) уменьшает количество клеток TH1 и TH17, проникающих в ЦНС, облегчая исход заболевания. С другой стороны, Treg и другие типы клеток, чувствительных к IL-33, могут способствовать защите, опосредованной IL-33. Недавно было обнаружено, что ILC2 также встречаются в мозговых оболочках мышей, где они могут способствовать контролю повреждений при травме спинного мозга [13]. Это повышает вероятность того, что менингеальные ILC2 могут противодействовать воспалительному действию NKp46⁺ ILC1 в мозговых оболочках.

У женщин с РС симптомы проявляются в более молодом возрасте и имеют более тяжелое течение заболевания, чем у мужчин в целом. Было обнаружено, что тестостерон может увеличивать экспрессию IL-33, который стимулирует и поддерживает непатогенный миелин-специфичный ответ Th2. Напротив, у женщин возникает энцефалитогенный ответ Th17, который можно отменить лечением IL-33. Следовательно, мужчины с повышенным уровнем IL-33 могут привести к повышенной активации ILC2 и ингибированию симптомов РС [14]. Кроме того, поскольку ILC2 играют жизненно важную роль в подавлении метастазирования и роста опухолей, гендерные различия в выработке IL-33 также могут способствовать различиям в заболеваемости глиомой [15].

ILC3

Повышенная частота cKit⁺ROR γ t⁺ ILC3 в кровообращении пациентов с РС снижалась до контрольных уровней после блокады передачи сигнала IL-2 с помощью CD25-специфического моноклонального антитела даклизумаба, что сопровождалось снижением симптомов интратекального воспаления. Более того, в спинномозговой жидкости пациентов с РС та же группа исследователей также обнаружила повышенные уровни ILC3, которые снижались после лечения даклизумабом [16].

ILC3 участвуют в воспалении ЦНС, поскольку удаление клеток MHCII⁺ ILC3 приводит к потере симптомов, связанных с ЭАЭ. В нейровоспалительной модели ILC3 способны презентировать антиген аутоиммунным Т-клеткам в очаговых поражениях и тем самым опосредовать нейровоспаление в паренхиме ЦНС [17]. Каким образом эти ILC получают антигены и представляют их на своем MHC-II, остается неизвестным, поскольку не было показано, что они обладают фагоцитирующим действием. Накопленные ILC3 способны продуцировать провоспалительные цитокины, такие как IFN- γ , IL-17 и GM-CSF, которые ответственны за хроническое воспаление [18].

Заключение

Таким образом, ILC клетки играют двойственную роль в патогенезе РС: активация подтипов ILC1 и ILC3 приводит к усилению аутоиммунного процесса, ILC2 клетки обладают протективными свойствами; роль NK-клеток неоднозначна.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-25-00787, <https://rscf.ru/project/22-25-00787>.

Библиографический список

6. Dendrou C.A., Fugger L., Friese M.A. Immunopathology of multiple sclerosis // *Nat. Rev. Immunol.* – 2015. – V. 15. – № 9. – P. 545–558.
7. Steinman L. Multiple sclerosis: a two-stage disease // *Nat. Immunol.* – 2001. – V. 2. – № 9. – P. 762–764.
8. Ebbo M., Crinier A., Vély F., Vivier E. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases // *Nat. Rev. Immunol.* – 2017. – V. 17. – № 11. – P. 665–678.
9. Gasteiger G., Rudensky A.Y. Interactions between innate and adaptive lymphocytes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2014. – V. 14. – P. 631–639.
10. Gold R., Giovannoni G., Selmaj K., Havrdova E., Montalban X., Radue E.W., et al. Daclizumab high-yield process in relapsing-remitting multiple sclerosis (SELECT): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet.* – 2013. – V. 381. – № 9884. – P. 2167–2175.
11. Lunemann J.D., Munz C. Do natural killer cells accelerate or prevent autoimmunity in multiple sclerosis? // *Brain J. Neurol.* – 2008. – V. 131(Pt 7). – P. 1681–1683.
12. Gross C.C., Schulte-Mecklenbeck A., Runzi A., Kuhlmann T., Posevitz-Fejfar A., Schwab N., et al. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113. – № 21. – P. E2973–2982.
13. Xu W., Fazekas G., Hara H., Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis // *J. Neuroimmunol.* – 2005. – V. 163. – № 1-2. – P. 24–30.
14. Tarlinton R.E., Martynova E., Rizvanov A.A., Khaiboullina S., Verma S. Role of Viruses in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis // *Viruses.* – 2020. – V. 12. – № 6. – P. 643.
15. Laroni A., Uccelli A. CD56^{bright} Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis // *J. Clin. Med.* – 2020. – V. 9. – № 5. – P. 1450.
16. Bielekova B., Richert N., Herman M.L., Ohayon J., Waldmann T.A., McFarland H., et al. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis // *Neurology.* – 2011. – V. 77. – № 21. – P. 1877–1886.
17. Lunemann A., Tackenberg B., DeAngelis T., da Silva R.B., Messmer B., Vanoaica L.D., et al. Impaired IFN-gamma production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis // *Int. Immunol.* – 2011. – V. 23. – № 2. – P. 139–148.
18. Khalid R. Contributing Factors in Multiple Sclerosis and the Female Sex Bias // *Immunol. Lett.* – 2014. – V. 162. – P. 223–232.
19. Russi A.E., Ebel M.E., Yang Y., Brown M.A. Male-Specific IL-33 Expression Regulates Sex-Dimorphic EAE Susceptibility // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2018. – V. 115. – P. E1520–1529.

20. De Boeck A., Ahn B.Y., D'Mello C., Lun X., Menon S.V., Alshehri M.M., et al. Glioma-Derived IL-33 Orchestrates an Inflammatory Brain Tumor Microenvironment That Accelerates Glioma Progression // *Nat. Commun.* – 2020. – V.11. – P. 4997.
21. Lin Y.C., Winokur P., Blake A., Wu T., Romm E., Bielekova B. Daclizumab reverses intrathecal immune cell abnormalities in multiple sclerosis // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* – 2015. – V. 2. – P. 445–455.
22. Simic M., Manosalva I., Spinelli L., Gentek R., Shayan R.R., Siret C., et al. Distinct Waves From the Hemogenic Endothelium Give Rise to Layered Lymphoid Tissue Inducer Cell Ontogeny // *Cell Rep.* – 2020. – V. 32. – P. 108004.
23. Hatfield J.K., Brown M.A. Group 3 Innate Lymphoid Cells Accumulate and Exhibit Disease-Induced Activation in the Meninges in EAE // *Cell Immunol.* – 2015. – V. 297. – P. 69–79.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ

Пономарева В.Н.¹, Власова В.В.^{1,2}, Сайдакова Е.В.^{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. Цель: изучить влияние кратковременной криоконсервации на метаболизм моноклеарных клеток (МНК). МНК замораживали при -80°C на неделю, либо при -196°C на месяц. Показатели гликолиза и окислительного фосфорилирования оценивали на анализаторе Seahorse XFe96. Показано, что криоконсервация МНК сопряжена с изменением метаболических показателей и ослаблением метаболической реактивности МНК в ответ на стимуляцию. Таким образом, для изучения метаболизма МНК следует использовать свежевыделенные клетки.

Ключевые слова: моноклеарные лейкоциты, криоконсервация, метаболизм, гликолиз, окислительное фосфорилирование

ANALYSIS OF SHORT-TERM CRYOPRESERVATION IMPACT ON THE METABOLIC ACTIVITY OF MONONUCLEAR LEUKOCYTES

Ponomareva V.N.¹, Vlasova V.V.^{1,2}, Saidakova E.V.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² 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. Aim was to study the effect of short-term cryopreservation on mononuclear cells (MNC) metabolism. MNCs were stored at -80°C for a week, or at -196°C for a month. Glycolysis and oxidative phosphorylation were assessed with a Seahorse XFe96 analyzer. We showed that MNC cryopreservation is associated with metabolic changes in MNCs and weakening of their metabolic reactivity in response to stimulation. Thus, to study MNC metabolism, freshly isolated cells should be used.

Keywords: mononuclear leukocytes, cryoconservation, metabolism, glycolysis, oxidative phosphorylation

Все функции моноклеарных лейкоцитов, включая их дифференцировку, пролиферацию, синтез цитокинов и сигнальных молекул, поддерживаются метаболизмом. Обменные процессы позволяют клеткам удовлетворять свои потребности в энергии и прекурсорах для молекулярного биосинтеза. Так, гликолиз и окислительное фосфорилирование – магистральные метаболические пути клетки – обеспечивают ее энергией, кофакторами для фермента-

тивных реакций, а также разнообразными молекулами-предшественниками нуклеотидов, аминокислот и липидов [1]. Исследование взаимосвязи между функциональной активностью лейкоцитов и их метаболизмом необходимо для разработки новых терапевтических стратегий при широком спектре заболеваний, включая онкологические и аутоиммунные [2]. Поэтому, изучение метаболической активности моноклеарных лейкоцитов является актуальной задачей биологии и медицины.

Современным способом оценки клеточного метаболизма является одновременное измерение скорости внеклеточного закисления (англ. extracellular acidification rate – ECAR – показатель гликолиза) и потребления кислорода (англ. oxygen consumption rate – OCR – показатель окислительного фосфорилирования) в одном эксперименте с использованием анализатора Seahorse XFe96 (Agilent Technologies, США) [3]. Стоит отметить, что достоверность результатов такого исследования повышается при единовременном изучении образцов из разных групп сравнения. Доступность больших количеств биоматериала обеспечивается хранением образцов в криоконсервированной форме. Однако влияние криоконсервации и хранения при отрицательных температурах на метаболизм лейкоцитов мало изучено.

Целью настоящего исследования было изучение влияния кратковременной (до 1 мес) криоконсервации на метаболическую активность моноклеарных лейкоцитов.

Для достижения цели исследования были поставлены следующие задачи:

1. Выявить влияние криоконсервации и хранения при отрицательных температурах на базальную скорость потребления кислорода и скорость закисления среды моноклеарными лейкоцитами.
2. Определить, как стимуляция фитогемагглютинином воздействует на метаболические показатели свежевыделенных и подвергшихся криоконсервации моноклеарных клеток.
3. Установить, как криоконсервация влияет на способность моноклеарных лейкоцитов реагировать на стимуляцию изменением скоростей окислительного фосфорилирования и гликолиза.

Материалы и методы. Периферическую венозную кровь забирали у относительно здоровых доноров (n=3) в пробирки, обработанные этилендиаминтетрауксусной кислотой. Моноклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием периферической крови в градиенте плотности Диаколл (1,077 г/мл, Диаэм, Россия) стандартным методом. Полученные образцы разделяли на аликвоты и подвергали программируемому замораживанию до –80°C в среде, содержащей 90% инактивированной теплом эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, Колумбия) и 10% диметилсульфоксида (AppliChem, Германия). Через неделю образцы переносили в жидкий азот (-196°C). Для проведения исследования клетки размораживали и ресуспендировали в среде XF RPMI Medium, содержащей 10 мМ глюкозы, 2 мМ глутамин, 1 мМ пирувата натрия. Для образования монослоя вносили по 200 тыс. клеток в лунки планшета, заранее покрытого поли-D-лизином (Sigma, США). Затем планшет центрифугировали при 200g в течение 4 мин. При помощи анализатора Seahorse XFe96 определяли OCR и ECAR. Измерения производили на базальном уровне и в течение 40 мин стимуляции фитогемагглютинином (ФГА; Serva, Германия). Базальную скорость потребления кислорода рассчитывали, как суммарную OCR в течение всего времени измерения, т.е. представляли полученные данные в виде площади под кривой (англ. area under the curve – AUC). Изменение скорости потребления кислорода (ΔOCR) рассчитывали согласно формуле:

$$\Delta OCR = (OCR_{max} * 100 / OCR_{basal}) - 100\%,$$

где OCR_{max} – это максимальное потребления кислорода, а OCR_{basal} – первое измерение после внесения ФГА. Базальную скорость закисления среды и ее изменения рассчитывали аналогично скорости потребления кислорода. Для получения полной картины исследование проводили в трех временных точках: работа со свежевыделенными клетками (до заморозки), через неделю после программируемого замораживания до -80°C (-80°C неделя) и через месяц хранения в жидком азоте (-196°C месяц). Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок средних. Достоверность различий между группами устанавливали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с применением критерия Уэлча. Проведение статистических расчетов осуществляли при помощи программного обеспечения “GraphPad Prism 8” (GraphPad Software, США).

Результаты. Выявлено, что базальная скорость потребления кислорода МНК зависит от продолжительности их хранения при отрицательных температурах (рис.1). По сравнению со свежевыделенными клетками, в хранившихся неделю при -80°C лейкоцитах базальная OCR возросла в 1,6 раз ($p < 0.01$). Еще более значительный прирост базальной OCR был отмечен в клетках, хранившихся в течение месяца при -196°C : различие со свежевыделенными МНК составило 2,5 раза ($p < 0.001$). Разница между криоконсервированными образцами с различными сроками хранения также была статистически значимой ($p < 0.001$). Базальная скорость закисления среды при замораживании образцов, напротив, имела тенденцию к снижению, однако различия не являлись статистически значимыми ($p > 0.05$).

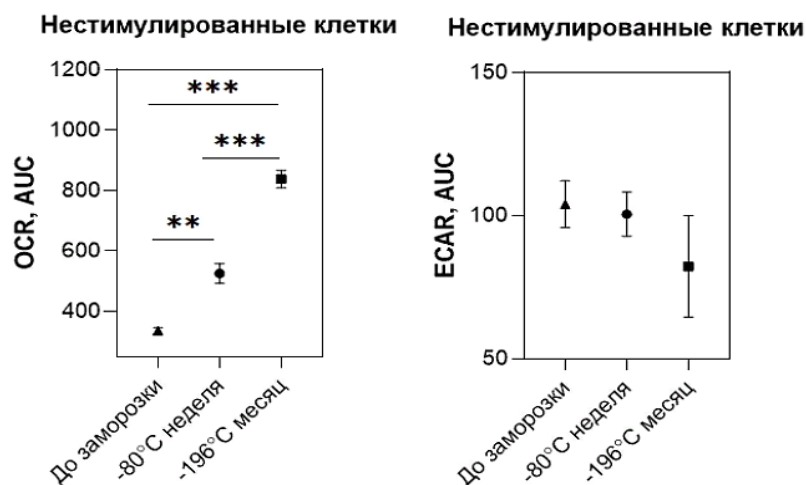


Рис. 1. Изменение базального уровня метаболических показателей лейкоцитов, подвергшихся кратковременной криоконсервации. Указаны средние и стандартные ошибки средних. Данные представлены в виде площади под кривой (AUC). OCR – скорость потребления кислорода.

ECAR – скорость внеклеточного закисления. Для сравнения групп количественных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ; множественные сравнения между группами проводили с помощью критерия Тьюки. ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$

Известно, что активация МНК митогенами запускает их пролиферацию, что сопровождается увеличением интенсивности метаболических процессов, в том числе митохондриального дыхания и гликолиза [4, 5, 6]. В настоящем исследовании было показано, что даже кратковременная стимуляция (40 мин) клеток ФГА оказывает влияние на метаболические показатели клеток. Примечательно, что статистически значимые различия между стимулиро-

ванными и полежащими лейкоцитами были отмечены нами только при исследовании свежесыделенных МНК. В свою очередь при стимуляции прошедших криоконсервацию лейкоцитов различия между стимулированными и полежащими клетками не достигли уровня статистической значимости ($p > 0.05$) (рис. 2).

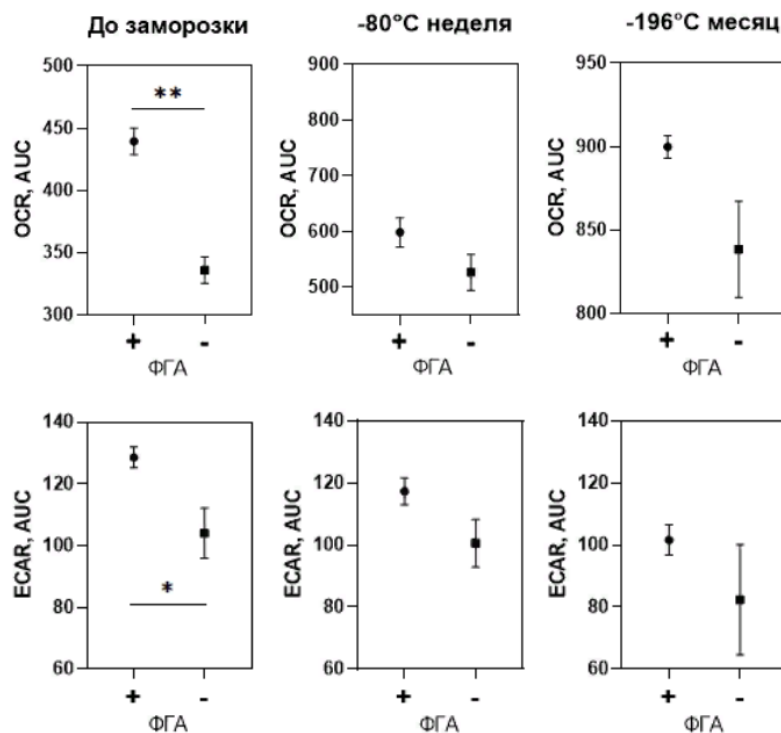


Рис. 2. Скорость окислительного фосфорилирования и гликолиза в стимулированных и нестимулированных мононуклеарных лейкоцитах. Указаны средние и стандартные ошибки средних. Данные представлены в виде площади под кривой (AUC). OCR – скорость потребления кислорода, ECAR – скорость внеклеточного закисления. Для сравнения двух групп количественных данных использовали t-тест Стьюдента. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$

Для того чтобы проанализировать изменение скорости потребления кислорода митохондриями и скорости закисления среды до и после воздействия ФГА мы рассчитали показатели ΔOCR и $\Delta ECAR$ соответственно. Было установлено, что криоконсервация существенно снижает метаболическую реактивность мононуклеарных лейкоцитов (рис.3).

Заключение. Таким образом, криоконсервация оказывает существенное влияние на метаболическую активность мононуклеарных лейкоцитов. Помимо увеличения базальной скорости потребления кислорода, она снижает способность клеток реагировать на стимуляцию ФГА усилением окислительного фосфорилирования и гликолиза. Исходя из полученных данных, можно сделать вывод, что для получения достоверных сведений о метаболической активности мононуклеарных лейкоцитов предпочтительно использовать свежесыделенные клетки.

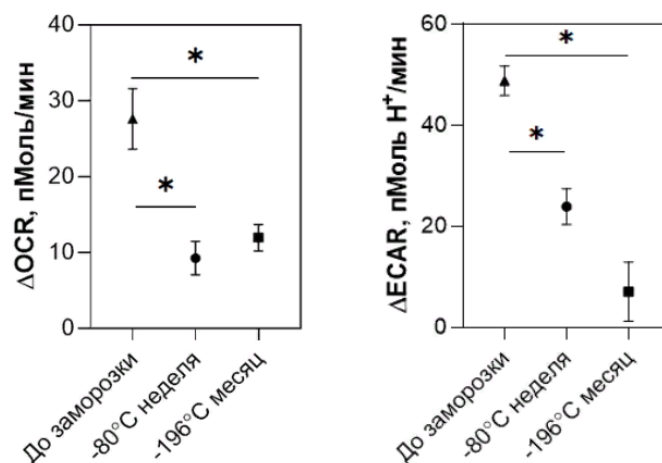


Рис. 3. Изменение метаболических показателей мононуклеарных лейкоцитов стимулированных фитогемагглютинином. Указаны средние и стандартные ошибки средних.

OCR – скорость потребления кислорода, ECAR – скорость внеклеточного закисления.

Сравнение групп: однофакторный дисперсионный анализ с применением критерия Уэлча.

Исследование выполнено в рамках государственного задания №121112500044-9 и поддержано грантом РФФИ и Пермского края (№ 20-415-596002).

Библиографический список

1. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, Т. 2: биоэнергетика и метаболизм. 2014. – 636 с.
2. Makowski M., Chaib L., Rathmell G.C. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation // Immunological Reviews. – 2020. – № 295. – P. 5–14.
3. Nicholls DG, Darley-Usmar VM, Wu M, Jensen PB, Rogers GW, Ferrick DA. Bioenergetic profile experiment using C2C12 myoblast cells // J Vis Exp. – 2010. – № 46.
4. Desdín-Micó G., Soto-Herederо G., Mittelbrunn M. Mitochondrial activity in T cells // Mitochondrion. – 2017. – № 41. – P. 51–57.
5. Савилова А.М., Чулкина М.М., Алексеев Л.П. Сравнительное исследование экспрессии мРНК интерлейкина-2 и рецептора интерлейкина-2α в лимфоцитах, активированных ФГА и КонА // Иммунология. – 2013. – № 13. – С. 76–80.
6. Lomsadze G, Gogebashvili N, Enukidze M, Machavariani M, Intskirveli N, Sanikidze T. Alteration in viability and proliferation activity of mitogen stimulated Jurkat cells // Georgian Med News. – 2011. – № 198. – P. 50–55.

АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА *ADRB2* У ДЗЮДОИСТОВ С РАЗНОЙ СПОРТИВНОЙ КВАЛИФИКАЦИЕЙ

Сорокина А.В.^{1,2}, Корякова А.С.¹, Закиров Р.М.³, Грачев А.С.³, Низамова В.А.³

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

² *Пермская государственная фармацевтическая академия Минздрава России, Пермь, Россия*

³ *Спортивная школа олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь»
им. И.И. Пономарева», Пермь, Россия*

Аннотация. Цель – выявление взаимосвязи полиморфных вариантов гена *ADRB2*, ассоциированного с выносливостью, у занимающихся дзюдо спортсменов с разной спортивной квалификацией, с использованием ПЦР в реальном времени. В зависимости от спортивной квалификации 50 дзюдоистов в возрасте от 10 до 16 лет были распределены на две группы. Анализ взаимосвязи между аллельными вариантами гена у дзюдоистов и их спортивной квалификацией установил достоверно значимое отличие для генотипа A/A гена *ADRB2*.

Ключевые слова: ген *ADRB2*, дзюдоисты, спортивная квалификация

ANALYSIS OF *ADRB2* GENE POLYMORPHISM IN JUDO ATHLETES WITH DIFFERENT SPORTS QUALIFICATIONS

Sorokina A.V.^{1,2}, Koryakova A.S.¹, Zakirov R.M.³, Grachev A.S.³, Nizamova V.A.³

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia*

² *Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia*

³ *«Vityaz» Perm Sambo and Judo Olympic Reserve Sports School, Perm, Russia*

Abstract. Objective is identifying the relationship of polymorphic variants of the *ADRB2*, gene associated with endurance in judo athletes with different sports qualifications using PCR in real time. Depending on the sports qualification, 50 judo artists aged 10 to 16 were divided into two groups. An analysis of the relationship between allelic variants of gene in judo athletes and their sports qualifications established significantly significant differences for the A/A genotype of the *ADRB2* gene.

Keywords: *ADRB2* gene, judo athletes, sports qualification

Изучение генетической предрасположенности у спортсменов является важным компонентом для прогноза развития их физических качеств. Спортивных высот достигают те спортсмены, которые наиболее предрасположены к специфике конкретного вида спорта [1]. Знание генетической предрасположенности поможет улучшить качество тренировочного процесса.

Дзюдо, как и все единоборства, относится к ациклическим видам спорта. Большее значение имеет развитие у спортсменов таких физических качеств, как «скорость/сила» и

«выносливость». Существует свыше 140 генов, которые влияют на формирование этих физических качеств. Например, к генам, ассоциированным с выносливостью, относятся такие гены, как *ACE*, *EPAS1*, *GNB3*, *HFE*, *NFATC4*, *NOS3*, *PPARA*, *PPARGC1A*, *PPARGC1B*, *TFAM*, *VEGFR2*, *ADRB2*, *ADRB3* [2].

Ген *ADRB2* (местоположение 5q31-q32) кодирует β 2-адренергический рецептор, обеспечивающий расслабление гладкой мускулатуры (бронходилатацию и вазодилатацию) [3]. Также рецептор *ADRB2* связан с мобилизацией липидов в жировых клетках человека. Данные метаанализа свидетельствуют о связи полиморфизма rs1042713 (Arg16Gly) гена *ADRB2* с ожирением и риском эссенциальной гипертензии, который возрастает с увеличением индекса массы тела, сердечной недостаточностью, бронхиальной астмой, инсулинорезистентностью [4]. В различных работах показано, что полиморфизм rs1042713 гена *ADRB2* (аллель G) ассоциируется с проявлением выносливости у спортсменов. Носительство аллеля Gly (аллель G) является неблагоприятным фактором для спортивных результатов и коррелирует со значительным увеличением индекса массы тела, по сравнению с генотипом Arg16 [5].

Цель работы – выявление взаимосвязи полиморфных вариантов гена *ADRB2*, ассоциированного с выносливостью, у занимающихся дзюдо спортсменов с разной спортивной квалификацией, с использованием ПЦР в реальном времени.

Молекулярно-генетический анализ проведен у 50 спортсменов, занимающихся дзюдо в спортивной школе олимпийского резерва по самбо и дзюдо «Витязь» им. И.И. Пономарева» города Перми в России. Возраст испытуемых варьировал от 10 до 16 лет. Дзюдо относится к ациклическим видам спорта, в которых важное значение имеют такие физические качества, как «скорость/сила» и «выносливость». В соответствии со спортивной квалификацией (спортивным разрядом) сформированы две группы дзюдоистов: Группа I с высокой квалификацией включает 25 дзюдоистов с 1 юношеским разрядом, а также КМС; среди которых 20 спортсменов мужского пола и 5 женского пола. Группа II с низкой квалификацией включает 25 дзюдоистов, имеющих второй и третий юношеские разряды, из которых 21 спортсмен мужского пола и 4 женского пола. Единоборства являются преимущественно мужскими видами спорта, а потому в выборках преобладают лица мужского пола.

Применялся лабораторный метод исследований с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ), который включал в себя определение полиморфизма гена *ADRB2*, ассоциированного 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 выравнивали до 5 нг/мкл. Реагенты для определения полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2* (rs1042713) синтезированы в ООО «Синтол» (г. Москва, Россия). Реактивы для амплификации ДНК в виде компонентов 2,5*реакционной смеси, содержащей все необходимые компоненты для проведения ПЦР-РВ, 2,5* разбавителя и Taq-полимеразы смешивали в нужном объеме непосредственно перед проведением исследования. К реакционной смеси добавляли 5 мкл пробы ДНК индивидуально каждого единоборца. В качестве контроля использовали: а) отрицательный контроль (ОКО); б) положительный контрольный образец (ПКО) – ПКО 1

А/А, ПК0 2 А/Г, ПК0 3 Г/Г. Определение аллелей и генотипов гена *ADRB2* проводилось при помощи программы Bio-Rad (USA). ПЦР-РВ для амплификации полиморфных локусов гена *ADRB2* проводили по программе, описанной в инструкции к набору реагентов для определения полиморфизма Arg16Gly гена *ADRB2*: предварительная денатурация при 95°C – 3 мин.; 40 циклов амплификации: 95°C – 15 сек., 63°C – 40 сек. По каналу флуоресценции FAM (синий), качественно определяется наличие в пробе аллеля А. По каналу флуоресценции HEX (зеленый), можно обнаружить аллель Г. Каждая проба была проанализирована индивидуально. Эксперимент повторялся дважды.

ПЦР-РВ проведена при условиях, предусмотренных в инструкции производителя ООО «Синтол». Интерпретация результатов ПЦР-РВ была проведена в программе Bio-Rad CFX Manager по инструкции компании ООО «Синтол». 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 $p = 0,05$).

Рост по каналу FAM свидетельствует о присутствии аллеля А в пробе ДНК испытуемого. Рост по каналу HEX обозначает наличие аллеля Г в пробе ДНК (рис.). Соответственно, присутствие обоих аллелей в пробе говорит о наличии генотипа А/Г. Результаты подлежат учету только в случае, когда положительный контрольный образец имеет положительные результаты по каналам FAM и HEX, а отрицательный контрольный образец имеет отрицательные результаты по каналам FAM и HEX. Положительный контрольный образец необходим для определения специфичности набора реагентов к аллелям А и Г гена *ADRB2*. Отрицательный контрольный образец необходим для подтверждения отсутствия в реакционной смеси контаминации и ингибирования.

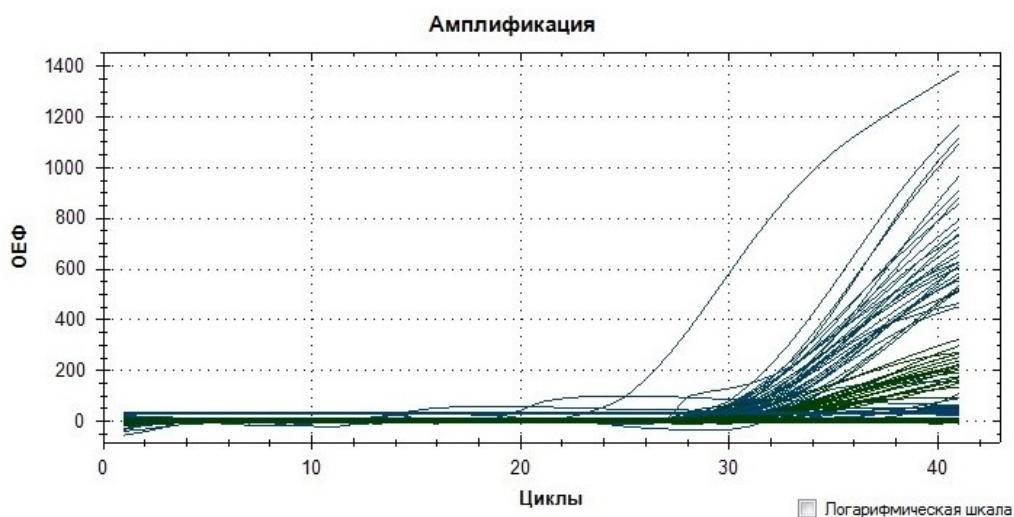


Рис. Кинетические кривые флуоресценции, полученные для образцов ДНК из буккального эпителия спортсменов, занимающихся дзюдо, на приборе для ПЦР-РВ CFX96 (Bio-Rad); цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: FAM (аллель А гена *ADRB2*) – синий, HEX (аллель Г гена *ADRB2*) – зеленый; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции, циклы – циклы амплификации

В ходе ПЦР в реальном времени аллель А в Группе I с высокой квалификацией был обнаружен с частотой 0,58, аллель G – с частотой 0,42 (табл.). В Группе II с низкой квалификацией частота встречаемости аллеля А равна 0,46, аллеля G – 0,54.

Таблица – Частота генотипа гена *ADRB2* у единоборцев города Перми с разной квалификацией (n=50)

Аллели/ генотипы	Частоты аллелей / генотипов в группах спортивной квалификации (число спортсменов)		Частоты аллелей / генотипов на общую выборку в 50 чел (число спортсменов)	$F_{оп} < F_{st}$
	Группа I (25 человек)	Группа II (25 человек)		
A	0,58	0,46	0,52	1,16<1,96
G	0,42	0,54	0,48	1,16<1,96
A/A	0,24 (6)	0,08 (2)	0,16 (8)	2,16>1,96
A/G	0,68 (17)	0,76 (19)	0,72 (36)	0,86<1,96
G/G	0,08 (2)	0,16 (4)	0,12 (6)	1,20<1,96

Примечание: ген *ADRB2* (*Adrenoceptor Beta 2*) полиморфизм A/G; Группа I – спортсмены с высокими спортивными разрядами (1 юн, КМС); Группа II – спортсмены с низкими спортивными разрядами (2 юн, 3 юн); $F_{оп}$ – F-критерий Фишера, F_{st} – критерий Фишера стандартный равен 1,96 (при $p=0,05$); полужирным шрифтом выделены значимые отличия.

Анализ частоты более благоприятного для развития физического качества «выносливость» генотипа A/A гена *ADRB2* показал значимые различия ($F_{оп} 2,16>1,96$ при $p = 0,05$) между Группой I с высокой квалификацией (частота 0,24) и Группой II с низкой квалификацией (частота 0,08). Отличия по менее благоприятному генотипу G/G гена *ADRB2* между Группой I с высокой квалификацией и Группой II с низкой квалификацией оказались незначимыми ($F_{оп} 1,20<1,96$ при $p = 0,05$). Гетерозиготный генотип A/G в Группе I с высокой квалификацией встречался с частотой 0,68, а в Группе II с низкой квалификацией с частотой 0,76, что статистически недостоверно ($F_{оп} 0,86<1,96$ при $p = 0,05$).

В целом среди спортсменов обеих групп чаще встречался генотип A/G – частота 0,72, у 36 спортсменов. Данный генотип ассоциирован с различными физиологическими эффектами. Генотип A/A обнаружен у 8 человек, с частотой 0,16. Этот генотип является наиболее благоприятным для развития выносливости, так как аллель А ассоциируется с низкой плотностью $\beta 2$ -адренергического рецептора и низкими значениями сердечного выброса в покое, уменьшенной бронходилатацией, низким уровнем систолического артериального давления и низким риском развития ожирения. Самый неблагоприятный генотип G/G определен у 6 человек, с частотой 0,12. Данный генотип коррелирует со значительным увеличением индекса массы тела, по сравнению с генотипом A/A.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в процессе отбора спортсмены с неблагоприятными генотипами отсеиваются. Одной из причин этого является генетически обусловленная низкая работоспособность спортсменов.

Преобладание в Группе I с высокой квалификацией наиболее благоприятного генотипа также указывает на возможность выявления перспективных спортсменов путем изучения генетического профиля. Генотип A/A гена *ADRB2*, ассоциированный с физическим качеством «выносливость», может служить в качестве генетического маркера, указывающего на

высокую работоспособность при отборе кандидатов для занятий единоборствами, в том числе дзюдо.

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 [6]. Для спортсменов с генотипами A/G и G/G гена *ADRB2* рекомендуется уменьшенное количество тренировок, а также чередование нагрузки и отдыха во время тренировки. Спортсменам с данными генотипами не стоит рассчитывать на быстрые результаты. Для спортсменов с генотипом A/A возможны интенсивные нагрузки на тренировках.

Изучение предрасположенности спортсменов позволит в дальнейшем повысить надежность и эффективность системы индивидуального отбора и подготовки высококвалифицированных спортсменов. Наличие благоприятных генотипов необходимо учитывать наряду с другими факторами, влияющими на достижения единоборцев в спортивной карьере. Помимо генотипов в достижении высоких спортивных результатов большую роль играют и другие факторы, например, такие как морфометрические показатели, физиологическое и психологическое состояние организма.

Библиографический список

1. Скорина А.А. Прогнозирование наследственной предрасположенности к скоростно-силовой работе в каратэ на основе генетических маркеров // Здоровье для всех: материалы V Международной научно-практической конференции. Пинск, 2013. Ч. I. С. 239–243.
2. Баранов В.С. Генетический паспорт – основа индивидуальной и предиктивной медицины. СПб.: Изд-во Н-Л, 2009. 420 с.
3. Тимашева Я.Р., Насибуллин Т.Р., Имаева Э.Б., Мирсаева Г.Х., Мустафина О.Е. Полиморфизм генов бета-адренорецепторов и риск эссенциальной гипертензии // Артериальная гипертензия. 2015. Т. 21, № 3. С. 259–66.
4. Zhang H, Wu J, Yu L. Association of Gln27Glu and Arg16Gly Polymorphisms in Beta2-Adrenergic Receptor Gene with Obesity Susceptibility: A Meta-Analysis // PLoS ONE. 2014. Vol. 9, № 6. P. 683–688.
5. Иманбекова М.К., Жолдыбаева Е.В., Есентаев Т.К., Момыналиев К.Т. Спорт и генетика // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2013. № 2. С. 2–12.
6. Predictive Genomics DNA Profiling for Athletic Performance / Kambouris M., Ntalouka F., Ziogas G., Maffulli N. // Recent Patents on DNA & Gene Sequences. 2012. Vol. 6 № 3. P. 229–239.

ГРАФЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ГИПЕРТЕРМИЯ КЛЕТОК ЛИНИЙ THP-1 И JURKAT

Усанина Д.И.^{1,2}, Бочкова М.С.^{1,2}, Тимганова В.П.¹

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

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Аннотация. Изучали эффект гипертермии, индуцированной наночастицами оксида графена (ОГ), на жизнеспособность и апоптоз клеток линий Jurkat и THP-1. Установлено, что наночастицы не оказывают влияния на жизнеспособность данных клеток, однако спустя 24 часа после термического воздействия обнаруживается усиление апоптоза клеток линии Jurkat под действием наночастиц размерами 1-5 мкм в концентрации 25 мкг/мл. Частицы меньших размеров (100-200 нм) не оказывали влияния на изучаемые параметры.

Ключевые слова: оксид графена, гипертермия, Jurkat, THP-1, апоптоз

GRAPHENE-INDUCED HYPERTHERMIA IN JURKAT AND THP-1 CELL LINES

Usanina D.I.^{1,2}, Bochkova M.S.^{1,2}, Timganova V.P.¹

¹ *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*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Abstract. We studied the effects of hyperthermia induced by graphene oxide (GO) nanoparticles on the viability and apoptosis of Jurkat and THP-1 cell lines. It was found that GO had no effect on the viability of these cells. However, big nanoparticles (1-5 μm) at high concentrations (25 $\mu\text{g/mL}$) could significantly increase the number of Jurkat cells in apoptosis 24 hours after thermal influence. Small particles (100-200 nm) had no effect on the parameters studied.

Keywords: graphene oxide, hyperthermia, Jurkat, THP-1, apoptosis

Одно из современных направлений в терапии раковых заболеваний – фототермическая терапия. Фототермические агенты облучаются светом определённой длины волны, что приводит к нагреву окружающей их микросреды [1]. Обычно с помощью фототермической терапии достигается температура выше 60 °С, что приводит к мгновенной гибели опухолевых клеток вследствие денатурации белка и разрушения плазматической мембраны [2]. В качестве перспективных фототермических агентов выступают материалы на основе графена, что связано с их способностью поглощать свет в ближнем ИК-диапазоне.

Кроме того, ароматическая решётка графена позволяет нагружать наночастицы лекарственными препаратами, что делает возможным совмещение фототермической терапии с химической для достижения лучшего терапевтического эффекта [3]. Удобным инструментом

в исследованиях рака являются клеточные линии: они не могут в полной мере отображать процессы, происходящие в опухолях, однако обладают схожими характеристиками. Злокачественные заболевания крови – лейкозы – подразделяются в зависимости от поражаемого ростка кроветворения на миелобластные и лимфобластные. Для данного исследования были выбраны клеточные линии, относящиеся к обеим группам: ТНР-1 представляет собой линию острого моноцитарного лейкоза, Jurkat – острого Т-лимфобластного лейкоза.

Таким образом, целью настоящей работы являлось изучение гипертермии, индуцированной наночастицами пегилированного оксида графена, на показатели жизнеспособности и апоптоза клеточных линий ТНР-1 и Jurkat.

В исследовании использовали наночастицы оксида графена размерами 100-200 нм («м») и 1-5 мкм («б») (Ossila Ltd, Великобритания), функционализированные методом ковалентной пришивки двумя формами полиэтиленгликоля: линейной (П-ОГ) и разветвлённой (рП-ОГ). Характеристика используемых частиц, а также процедура функционализации были описаны ранее [4].

Изучали влияние графен-индуцированной гипертермии на две клеточные линии: ТНР-1 и Jurkat, полученные из периферической крови пациентов с острым моноцитарным и лимфобластным лейкозами, соответственно. Клетки обеих линий помещали в питательную среду на основе RPMI-1640 (без фенолового красного) (Gibco, США) с добавлением 2мМ L-глутамина (ICN Pharmaceuticals, США), 100 Ед пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мкг/мл амфотерицина В (BI, Израиль) и 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки. Далее клетки помещали в 96-луночный планшет в концентрации 1 млн клеток/мл и добавляли наночастицы оксида графена до конечных концентраций 5 и 25 мкг/мл. Число повторностей для каждого типа и концентрации наночастиц составило 3. В качестве источника инфракрасного излучения использовали лампу для фототерапии Hydrosun 750 (Hydrosun Medizintechnik, Германия). Время облучения составило 25 минут; расстояние от лампы до планшета – 28 см в соответствии с рекомендациями производителя.

Для каждой из клеточных линий было подготовлено по два аналогичных планшета: в одном производили окрашивание непосредственно после облучения, во втором – спустя 24 часа культивирования в CO₂-инкубаторе (37 °C, 5% CO₂).

Для определения жизнеспособности клетки окрашивали красителем Zombie aqua (ZA) (Invitrogen, США). Для оценки числа апоптотирующих клеток использовали Annexin V FITC (BioLegend, США). Оценивали апоптоз в целом (AnnV⁺), а также отдельные стадии: ранний (ZA⁻AnnV⁺) и поздний апоптоз (ZA⁺AnnV⁺) клеток. Окрашенные образцы анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S (Beckman Coulter, США). Порог между позитивными (окрашенными) и негативными субпопуляциями клеток определяли с использованием неокрашенных проб, а также контролей флуоресценции минус один (FMO). Данные проточной цитометрии анализировали с помощью программы CytExpert (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку полученных данных проводили в программе GraphPad Prizm 8.0.1. Для оценки использовали критерий Краскела-Уоллиса. Уровень значимости принимали за 0,05. В качестве контроля служили лунки без добавления наночастиц.

В результате анализа полученных данных выяснено, что графен-индуцированная гипертермия не оказывает влияния на жизнеспособность клеток линий ТНР-1 и Jurkat как непосредственно после облучения, так и спустя 24 часа (рис. 1).

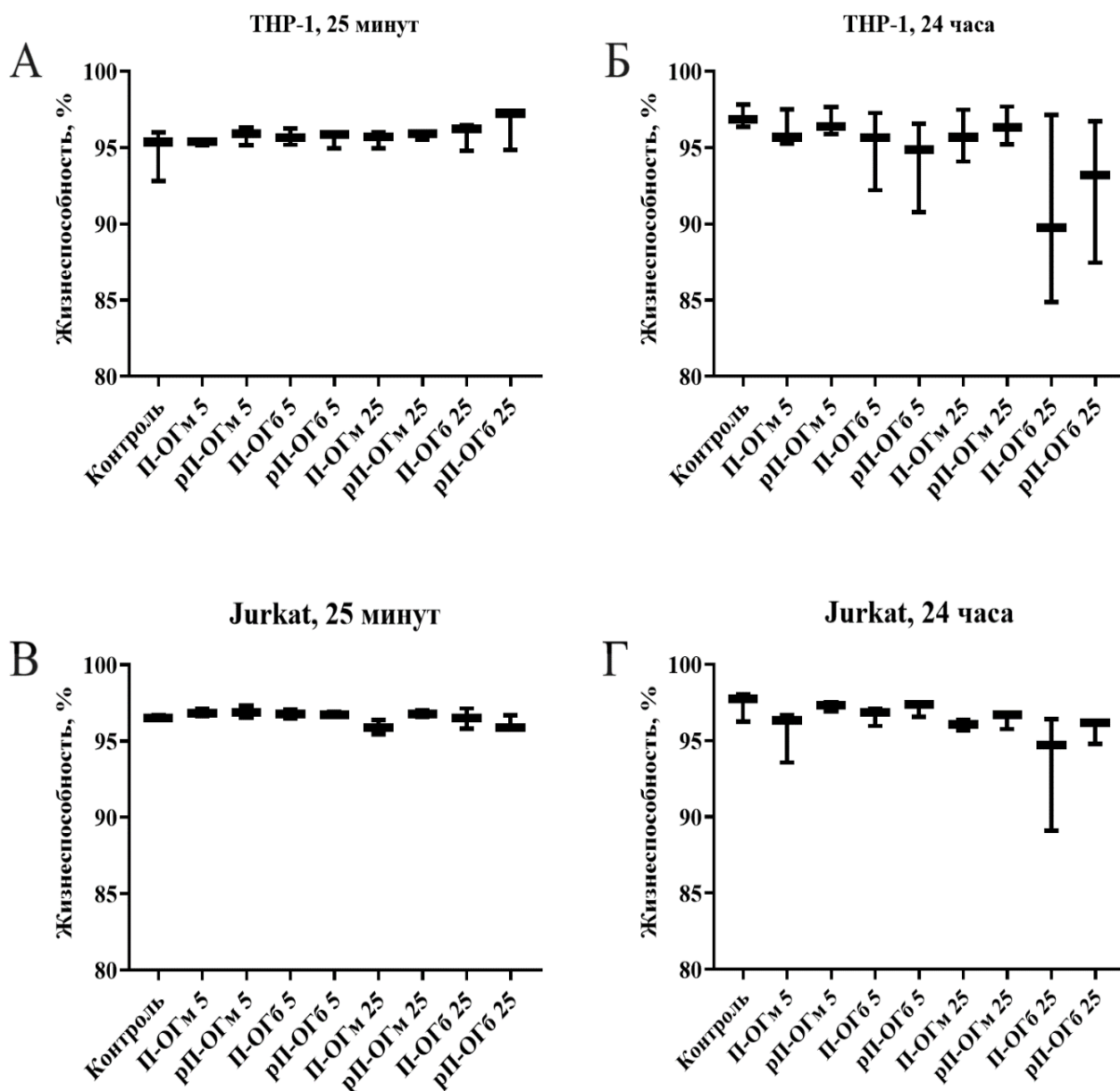


Рис. 1. Жизнеспособность клеток линий THP-1 и Jurkat после 25-минутного облучения лампой Hydrosun 750 в присутствии оксида графена (А, В) и спустя 24 часа после облучения (Б, Г). По оси Х обозначены тип и концентрация наночастиц, по оси Y – число живых клеток (%).

Не зафиксировано также достоверных изменений раннего апоптоза клеток обеих линий (рис. 2).

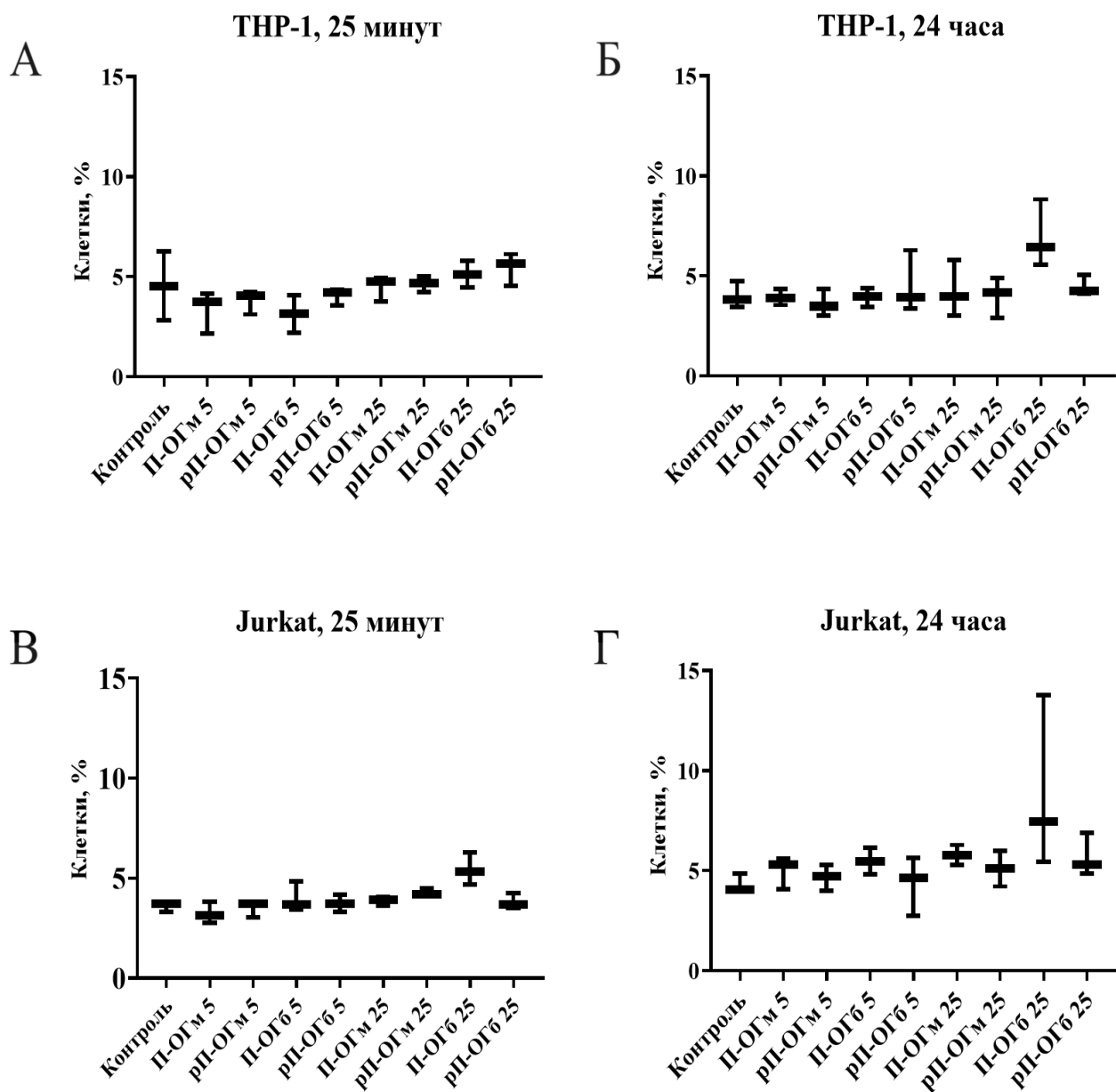


Рис. 2. Влияние графен-индуцированной гипертермии на ранний апоптоз клеток линий THP-1 и Jurkat после 25-минутного облучения лампой Hydrosun 750 в присутствии оксида графена (А, В) и спустя 24 часа после облучения (Б, Г). По оси Х обозначены тип и концентрация наночастиц, по оси Y – число клеток в состоянии раннего апоптоза (%).

Число клеток линии Jurkat в состоянии позднего апоптоза повышается спустя 24 часа после 25-минутного облучения в присутствии крупных частиц ОГ (1-5 мкм) в высокой концентрации (25 мкг/мл) вне зависимости от типа поверхностной функционализации (рис. 3).

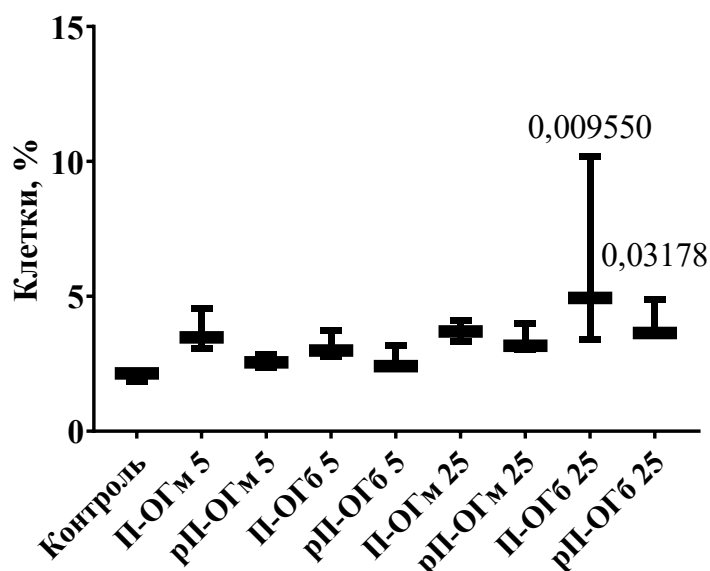


Рис. 3. Влияние графен-индуцированной гипертермии на поздний апоптоз клеток линии Jurkat спустя 24 часа после 25-минутного облучения лампой Hydrosun 750 в присутствии оксида графена.

По оси X обозначены тип и концентрация наночастиц, по оси Y – число клеток в состоянии позднего апоптоза (%). Указаны значения «р» ($<0,05$) в сравнении с контролем.

Если говорить об апоптозе клеток в целом, без разделения на стадии, то обнаруживается усиливающий эффект крупный частиц ОГ, функционализированных линейным полиэтиленгликолем, в концентрации 25 мкг/мл в отношении клеточной линии Jurkat (спустя сутки после облучения) (рис. 4).

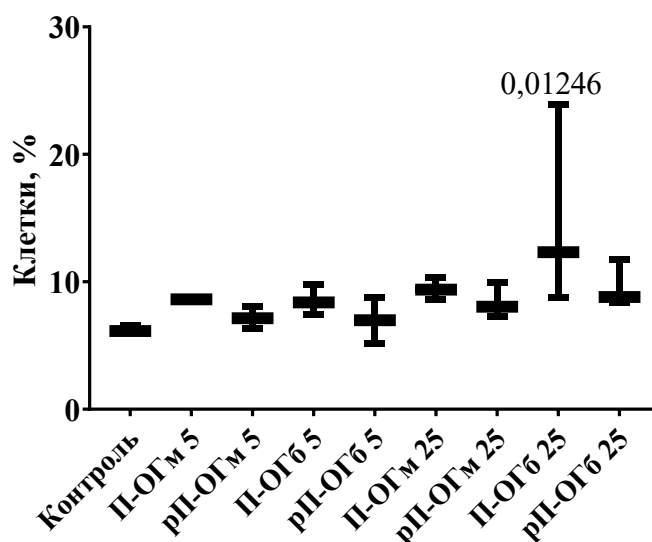


Рис. 4. Влияние графен-индуцированной гипертермии на апоптоз клеток линии Jurkat спустя 24 часа после 25-минутного облучения лампой Hydrosun 750 в присутствии оксида графена.

По оси X обозначены тип и концентрация наночастиц, по оси Y – число клеток в состоянии позднего апоптоза (%). Указаны значения «р» ($<0,05$) в сравнении с контролем

Проведённые эксперименты показали, что клеточная линия Jurkat в большей степени подвержена эффектам графен-индуцированной гипертермии, нежели клетки линии ТНР-1. При этом все зафиксированные изменения наблюдались спустя сутки после инкубации, что

свидетельствует об отложенном эффекте гипертермии на клетки. Также следует отметить, что малые концентрации частиц (5 мкг/мл) не оказывают влияния на клетки, что согласуется с ранее проведёнными исследованиями [4-6].

Клетки линии ТНР-1, являясь моноцитами, способны поглощать наночастицы оксида графена [4], в то время как клетки линии Jurkat (лимфоциты) – нет [5]. Ожидалось, что моноцитарные клетки будут в большей степени подвержены гипертермическим эффектам ОГ за счёт интернализации частиц, однако мы получили иные результаты. Для объяснения наблюдаемых явлений требуются дополнительные исследования. Планируется дальнейшее изучение влияния графен-индуцированной гипертермии на клетки ТНР-1 и Jurkat, а также иные клеточные линии и иммунные клетки здоровых доноров.

Работа поддержана грантом РНФ № 19-15-00244-П.

Библиографический список

1. Li X., Lovell J.F., Yoon J., Chen X. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer *Nat Rev Clin Oncol.* – 2020. – Vol. 17. – № 11. – P. 657–674. doi: 10.1038/s41571-020-0410-2.
2. Knavel E. M., Brace C. L. Tumor ablation: common modalities and general practices // *Tech. Vasc. Interv. Radiol.* – 2013. – Vol. 16. – P. 192–200. doi: 10.1053/j.tvir.2013.08.002.
3. de Melo-Diogo D., Lima-Sousa R., Alves C.G., Correia I.J. Graphene family nanomaterials for application in cancer combination photothermal therapy // *Biomater Sci.* – 2019. – Vol. 7. – № 9. – P. 3534-3551. doi: 10.1039/c9bm00577c.
4. 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. – Vol. 12. – № 126. doi: 10.3390/nano12010126.
5. Заморина С.А., Храмцов П.В., Раев М.Б., Тимганова В.П., Бочкова М.С., Нечаев А.И., Шунькин Е.О., Хазиахматова О.Г., Малащенко В.В., Литвинова Л.С. Взаимодействие наночастиц оксида графена с клетками линии Jurkat в системе Cell-IQ // Доклады российской академии наук. Науки о жизни. – 2021. – Т. 501. – С. 78–84. doi: 10.31857/S2686738921060196.
6. Усанина Д.И., Ужвиюк С.В., Заморина С.А. Влияние наночастиц оксида графена на апоптоз Т-лимфоцитов и клеток линии Jurkat // *Российский иммунологический журнал.* – 2023. – Т. 26. – № 3. – С. 409–414. doi: 10.46235/1028-7221-9635-EOG.

БОТАНИКА, ГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

СОРТИМЕНТ АБРИКОСА НАХИЧЕВАНСКОЙ АВТОНОМНОЙ РЕСПУБЛИКИ

Багиров О.Р.

*Нахчыванское отделение Национальной академии наук Азербайджана,
Нахчыван, Азербайджан*

Аннотация. В исследовательской работе, осуществленной путём полевых экспедиций в стационарных и камерально-лабораторных условиях, изучены биологические особенности и помологические показатели 19 форм абрикосы с высокими показателями, принадлежащие к местным и интродуцированным сортам, выращиваемым на территории Нахчыванской Автономной Республики, и произведено сравнение с контрольным сортом Шалах. В результате проведенных исследований установлено, что среди сортообразцов абрикоса, выращиваемых на территории Нахчыванской Автономной Республики, 42,9% составляют местные сорта, 11,9% интродуцированные сорта и 45,2% форма. По генетическому составу выявлено, что 31,6% форм раннеспелыми, 42,1% среднеспелыми и 26,3% позднеспелыми. Путем исследований выявлено, что формы Кетам-2, Даста-4 в сравнение с другими сортами и форма являются наиболее скороспелыми. При прослеживании фаз развития выявлена зависимость цветения от климатических условий, а созревания от генотипических характеристик. Отмечено, что у исследованных формах масса плодов составляет 36,0-58,4 г, а доля мякоти 92,9-95,8%. При дегустации 26,3% среди форма оценены наиболее высокими баллами.

Ключевые слова: форма, созревания, масса плода, местные сорта, интродуценты, дегустационная оценка

SORTMENT OF APRICOT OF THE NAKHCHIVAN AUTONOMOUS REPUBLIC

Baghirov O.R.

Nakhchivan Section of Azerbaijan National Academy of Science, Nakhchivan, Azerbaijan

Abstract. According to the field expeditions, the researches done in the stationary and cameral-laboratory conditions, the biological feature and the pomological parameters of 19 forms of the local and introduced sorts of apricot cultivated in Nakhchivan Autonomous Republic were studied and they were analyzed in comparison with Shalakh sort. Result of the investigations it was specified that about the 42,9% of the apricot sorts cultivated in Nakhchivan are local sorts, 11,9% of them are introduction sorts and 45,2% of the are forms. It was defined that 31,6% of forms are early ripen, 42,1% of them are middle ripen, 26,3% of them are late ripen. Result of the investigations it is noted that Kotam-2, Dasta-4 forms is ripen earlier than the other sorts and forms. During the learning of the phase it was proved that the blossom period is depend on climate factors and ripen-

ing period is depending on genotype features. Weight the forms is about 36,0-58,4 g and the pulp is between 92,9-95,8%. During the degustation 26,3% *forms* are highly valued.

Keywords: form, ripening, mass of fruit, local sort, introduced, degustation evaluation

Природно-климатические условия Нахчыванской Автономной Республике позволяют выращивать большинство плодовых растений, в том числе и абрикос. Изучение сортов и форм абрикоса способствует обогащению сортимента ценными, адаптированными приспособленными к местным условиям сортами различных сроков созревания и выделению исходного материала для использования их в селекции. Как сказал величайший селекционер Иван Мичурин «Сорт решает успех всего дела». Местные сорта абрикосы в Нахчыванской Автономной Республике, местные специалисты по селекции получили из существующих в регионе дикорастущих видов методом простого отбора и постоянно совершенствуя их, вывели новые полезные сорта. Говоря о сортах, культивируемых в Нахчыванской АР, необходимо отметить, что ряд местных сортов, таких как Абуталиби, Шалах, Балярим, Хагверди, Аг эрик, Теберзе и другие возделываются во всех зонах республики [3].

В более ранних исследованиях по изучению выращиваемых сортообразцов абрикоса [1, 2, 4, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 18, 20] сообщают о некоторых характеристиках сортов. На протяжении веков в этом регионе сформировался аборигенный сортимент абрикоса, богатое генотипическое разнообразие и отличающийся специфическими хозяйственными биологическими свойствами, особенности его никем подробно не исследовались.

В настоящее время в автономной республике ведутся работы по усилению контроля над оборотом генетически модифицированных организмов и их производных, восстановлению фруктовых садов и посадке новых, стимулированию экспорта фруктов, селекции сортов, возникших на основе естественной селекции за счет природных условий, давности выращивания и интродуцированных сортов. Путем наблюдений выявлено, что биологические и помологические особенности выращиваемых меняются в зависимости от их происхождения и эволюции. Исходя из этого, выявление генотипического разнообразия абрикосы в автономной республике, его изучение, сохранение, отбор наиболее ценных сортов и форм является актуальным и представляет большой научный и практический интерес. Основной целью наших исследований было выявление и изучение генотипического разнообразия абрикосы в различных экологических зонах Нахчыванской АР, отбор наиболее ценных сортов и форм народной селекции для размножения и передачи лучших из них в государственное сортоиспытание.

В качестве материала взяты 19 формы абрикосы и произведено сравнение с контрольным сортом Шалах. Собранные на территории Нахчыванской АР материалы наблюдений по биологическим признакам генотипов сортов абрикосы изучены сравнительным образом, анализированы и систематизированы. Полевые и экспедиционные исследования производились в стационарных и камерально-лабораторных условиях. Во время экспедиций определялась форма сортообразца, проводились измерения плодов (ширина, длина, высота), их масса, вкус (по 5-и бальной шкале) и т.д. Результаты заносились в специальный лист «Помологическое описание плодов». Биологические свойства форм, а также фенологические и помологические особенности изучались в соответствии с общепринятыми методиками: Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ [5], Методические рекомендации по производственному сортоиспытанию косточковых плодовых культур [14],

Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур [17], Практикум по селекции и сортоведению плодовых и ягодных культур [19], Плодоводство (лабораторный практикум) [8], Государственный реестр разрешенных и защищенных селекционных достижений, используемых для производства для сельскохозяйственного производства на территории Азербайджанской Республики [21], Помология [16], Плодоводство [7].

Генофонд выращиваемых в Нахчыванской АР абрикосов на 78,3% состоит из местных сортов и на 21,7% – из интродуцированных. Во время проведенных экспедиционных исследований выявлено, что абрикос выращивается преимущественно в Ордубадском районе автономной республики. Собранные на территории Нахчыванской АР материалы наблюдений по морфологическим признакам генотипов сортов абрикоса изучены и систематизированы. В результате проведенных исследований уточнены выращиваемые сорта и формы абрикоса. Выяснено, что на территории произрастают следующие местные сорта: Нахчыван новрести, Хагверди, Агчанабад, Гейчанабат, Шалах, Аг новрест, Кырмызы новрест, Сары шалах, Бадам эрик, Бадами, Ордубади, Нахчыван кырмызысы, Абуталиби, Теберзе, Сары теберзе, Гечйетишен, Тохум Шемси, Балярим, Аг эрик, Сары эрик и интродуцированные сорта: Хосровшахи, Кырмызыанаг, Красный партизан.

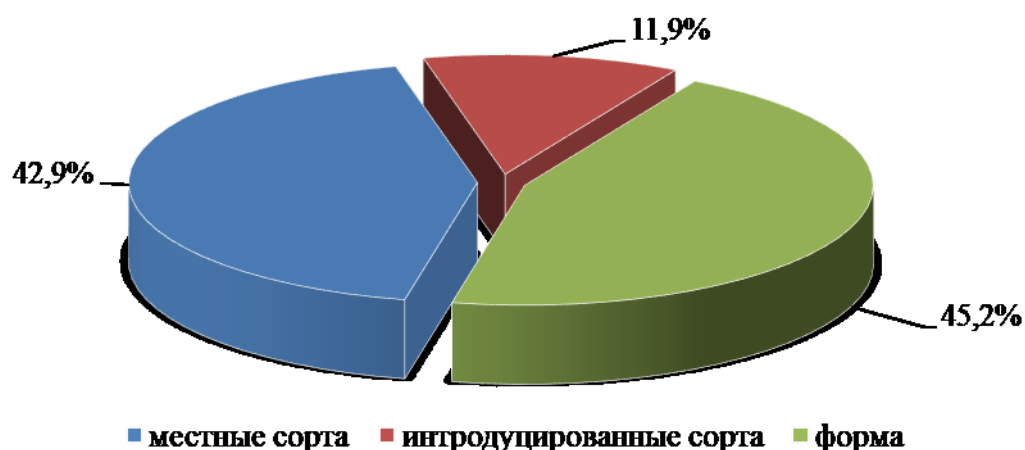


Рис. Генетические ресурсы абрикоса в Нахчыванской АР

Во время исследований выявлено несколько форм абрикоса, отличающихся высокими (диаметр самого большого поперечного разреза, масса плода, процент мякоти, дегустация и т.). После анализа и разбора 19 выявленных форм (*Ордубад-6*, *Ордубад-12*, *Кетам-2*, *Гянза-5*, *Андамидж-7*, *Нюс-Нюс-3*, *Гильанчай-3*, *Вананд-7*, *Вананд-10*, *Аза-4*, *Даста-4*, *Даста-9*, *Ханегах-2*, *Джуга-5*, *Шарур-5*, *Сиягут-6*, *Ханлыглар-3*, *Зейнадин-3*, *Нахчыван-4*) были подробно исследованы в стационарных пунктах. В целом, в результате проведенных исследований, выявлено, что на территории выращиваются 42 сортообразца абрикоса. Доля выращиваемых форм (45,2%) преобладает над долей местных (42,9%) и интродуцированных сортов (11,9%) (рис.).

Началом цветения принято считать период, когда дерево расцвело на 5-10%; концом цветения, когда опало или увяло 75% цветов; время созревания плода определяется по форме и цвету, во время съема с дерева, когда подошел срок потребительской спелости.

В Нахчыванской АР фаза цветения абрикосы начинается в конце марта. Наблюдения показали, что у раннецветущих сортообразцов, не отмечается раннее созревание плодов, то есть раннеспелость не зависит от сроков наступления цветения. Проследивание фенологических фаз выявило различие в их проявлении у одних и тех же сортообразцов в зависимости от орографического характера местности. В зонах с выраженным резко континентальным климатом цветение абрикоса происходит с промежутками в 3-4 дня (эшелонами), в зависимости от местоположения генеративной почки на побеге и местонахождения дерева. Несмотря на то, что ранней весной заморозки могут поражать раскрывшиеся цветки, они не могут повредить цветки, находящиеся в фазе бутонизации, именно это свойство дает возможность получать урожай каждый год, хотя и в небольшом количестве.

В результате наблюдений становится ясно, что принадлежащие к какой-либо группе созревания сорта и формы на всей территории созревают в срок согласно группе, к которой принадлежат, то есть скороспелый сорт везде созревает раньше других. Это доказывает, что срок созревания изученных сортообразцов в отличие от других особенностей является наиболее зависимым от генотипа. Исследуемые формы были сгруппированы по сроку созревания (раннеспелые (20.V-19.VI), среднеспелые (20.VI-28.VII), позднеспелые (29.VII-07.IX)). По генетическому составу выявлено, что 31,6% форм скороспелыми, 47,4% среднеспелыми и 21,6% позднеспелыми. На территории республики созревание и сбор плодов сортов и форм абрикоса начинается со второй декады мая и продолжается до первой декады сентября. В годы проводимых нами исследований наиболее раннее (20.V-22.V) созревание абрикоса наблюдалось у формы Кетам-2 и *Даста-4*.

За время исследования проведен сравнительный анализ помологических показателей 42 сортов и форм абрикосы. По цвету плодов преобладают формы абрикоса со светло-желтой окраской плодов (26,3%). Наибольший поперечный диаметр плодов у форм 28,8-39,2 мм. Из исследуемых сортов и форм наибольшим поперечным диаметром плодов отличалась форма Джуга-5 (39,2 мм). По сравнению с интродуцированными сортами, большим диаметром поперечного разреза характеризовались формы Джуга-5, *Даста-4* (38,5 мм), Ордубад-12 (37,4 мм). В целом, у 31,2% изученных форм диаметр самого большого поперечного разреза оказался больше, чем у сортов.

У исследуемых сортов и форм средняя масса плода колебалась от 36,0-58,4 г. У 42,1% сортов и форм средняя масса плодов колебалась в пределах от 46,0 до 53,5 г. Несмотря на то, что самый высокий показатель по средней массе- 58,0 г у сорта Шалах, скороспелая форма *Даста-4* отличается самым высоким показателем – 58,4 г. Среднеспелая форма Джуга-5 (53,5 г) и скороспелая форма *Даста-4* (56,2 г) по средней массе также превосходит другие сорта и формы.

Косточки легко отделяются у следующих форма – *Ордубад-6*, *Ордубад-12*, *Гянза-5*, *Андамидж-7*, *Гильанчай-3*, *Вананд-7*, *Вананд-10*, *Даста-4*, *Джуга-5*, *Шарур-5*, *Сиягут-6*, *Ханлыглар-3*, *Зейнадин-3*; Косточки трудно отделяются у форм – *Ханегах-2*, *Нахчыван-4*, *Кетам-2*, *Нюс-Нюс-3*, *Аза-4*, *Даста-9*.

При вычислении процентного содержания косточек оказалось, что у 31,8% этот показатель ниже 5,0%-ов, что оказывает положительное влияние на процент мякоти. Во время исследований выяснилось, что среди всех форм и сортов самый высокий процент мякоти наблюдается у формы *Даста-4* (95,8%). Среди скороспелых форм у *Даста-4*, *Даста-9* (95,6%), *Ордубад-6* (95,0%), *Ордубад-12* (95,2%), среди форм со средним сроком созревания у *Шарур-5* (95,5%), *Джуга-5* (95,3%), среди форм с поздним сроком созревания только у формы *Гильанчай-3* (95,0%) процент мякоти оказался выше, чем у сортов 65,2%.

Форма абрикоса Даста-4, Даста-9, Джуга-5, Ордубад-12, Шарур-5 отличаются высокими вкусовыми качествами, за что получил высокую экспертную оценку при дегустации – 5 баллов. В результате анализов выявлено, что у 68,4% форм дегустационная оценка оказалась выше 4,0 баллов. У исследуемых форм 31,6% получили более высокие баллы, чем сорта, к которым они принадлежат.

Выводы

1. Результаты исследований подтверждают, что генофонд выращиваемых в Нахчыванской Автономной Республике сортов и форм абрикоса должен охраняться и совершенствоваться методами селекции.

2. В результате исследований перспективными для использования признаны формы абрикоса Кетам-2, Ордубад-6, *Ордубад-12*, *Даста-4*, *Даста-9*, *Аза-4*, Джуга-5, Шарур-5.

3. Перспективные формы абрикоса с высокими хозяйственно ценными признаками необходимо использовать в селекционных исследованиях, а также могут быть рекомендованы для промышленного выращивания.

Библиографический список

1. Айтекин П.А., Огужан К. Урожайность и плодовые характеристики различных сортов абрикоса в условиях субтропического климата Средиземноморского региона Турции // Международный журнал агрономии. 2013. Т. 2013. С. 1–5.
2. Анатов Д.М., Османов Р.М., Асадулаев З.М., Газиев М.А. Экологические и исторические аспекты разнообразия форм абрикоса в Горном Дагестане // Вестник Дагестанского государственного университета. 2015. Т. 30. № 1. С. 73–81.
3. Багиров О.Р. Хозяйственно значимые косточковые фруктовые растения Нахчыванской Автономной Республики // Известия Нахчыванского Отделения Национальной Академии Наук Азербайджана. Серия естественных и технических наук. Нахчыван. 2015. № 4. С. 130–138.
4. Багиров О.Р. Перспективные формы абрикосов, выращиваемых в Ордубадском районе // Научные Труды Нахчыванского Отделения Национальной Академии Наук Азербайджана. Серия естественных и технических наук. Нахчыван, 2021. № 2. С. 102–106.
5. Бейдемман И.Н. Методика изучения фенологии растений и растительных сообществ. Новосибирск: Сибирское отделение изд-во «Наука», 1974. 155 с.
6. Гарагани А., Солджу С., Орагузи Н. Обзор генетических ресурсов миндаля и косточковых плодов (*Prunus spp.*) в Иране // Генетические ресурсы и эволюция сельскохозяйственных культур. 2017. № 64. С. 611–640 DOI: 10.1007/s10722-016-0485-x
7. Гасанов З.М., Алиев Д.М. Плодоводство. Баку: МБМ, 2011, 520 с.
8. Гасанов З.М. Плодоводство (лабораторный практикум). Баку: МБМ, 2010. 343 с.
9. Гусейнова Б.М., Даудова Т.И. Влияние сортовых особенностей и природных факторов зон выращивания абрикосов на биохимический комплекс их плодов // Вестник НГАУ. 2018. № 3. С. 7–16. DOI: 10.31677/2072-6724-2018-48-3-7-16.
10. Дежампур Ж. Абрикос. Новые подборки программы селекции в Сахандской исследовательской станции садоводства (SHRS). 2016, Т. 2, Вып. 2. С. 21–30.
11. Йылмаз К.У., Гуркан К. Генетическое разнообразие абрикоса // Генетическое разнообразие растений. ИнтехОткрытый, 2012. С. 249–270.

12. Каратас Н. Некоторые важные характеристики плодов сортов абрикоса (сорт Априкоз), выращенных в районе Кагизман в Турции // Журнал Института науки и технологий. 2021. Том. 11 (2). С. 1176–1182. DOI: 10.21597/jist.788892
13. Корзин В.В., Месяц Н.В. Особенности фенологии сортов абрикоса в связи с изменяющимся климатом // Plant Biology and Horticulture: theory, innovation. 2019. № 1(150). С. 59–66.
14. Методические рекомендации по производственному сортоиспытанию косточковых плодовых культур / сост. Косых С.А. Ялта: Государственный Никитский ботанический сад, 1984. 38 с.
15. Мустафа К., Кросс Д. Производство, помологические и нутрицевтические свойства абрикоса // Журнал пищевых наук и технологий. 2019. № 56. С. 12–23. DOI: 10.1007/s13197-018-3481-7
16. Помология. Т.3. Симиренко Л.П. Киев: Урожай, 1973. 422 с.
17. Программа и методика сортоизучения плодовых, ягодных и орехоплодных культур (Под общей редакцией академика РАСХН Е.Н.Седова и доктора сельскохозяйственных наук Т.П.Огольцовой). Орел: Изд-во Всероссийского научно-исследовательского института селекции плодовых культур, 1999. 608 с.
18. Раджабли А.Д. Плодовые культуры Азербайджана. Баку: Азернешр, 1966, 248 с.
19. Самигуллина Н.С. Практикум по селекции и сортоведению плодовых и ягодных культур: Учеб. Изд. Мичуринск: Мич ГАУ, 2006, 197 с.
20. Триведи А.К., Арья Р.Р., Неги К.С. Устьица и цветение как критерии отбора абрикосов. International Journal of Fruit Science. 2011. С. 299–308.
21. Государственный реестр разрешенных и защищенных селекционных достижений, используемых для производства для сельскохозяйственного производства на территории Азербайджанской Республики. Баку, 2020. 185 с.

ВЫХОД СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ СЕНПОЛИИ ГИБРИДНОЙ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

Белоногова А.Г., Шибанова Н.Л.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследований по микроклональному размножению *Saintpaulia hybrida* Wendl. Установлено, что при использовании в качестве основных стерилизующих агентов 96% этанола в течение 30 сек и 7% раствора гипохлорита натрия («Белизна») в течение 20 мин выход стерильной культуры составил 43%. Вся культура оказалась жизнеспособной при выращивании на варианте твердой питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Ключевые слова: стерильная культура, жизнеспособность, *Saintpaulia hybrida* Wendland

STERILE CULTURE YIELD AND VIABILITY OF SAINTPAULIA HYBRID EXPLANTS IN *IN VITRO* CULTURE

Belonogova A.G., Shibanova N.L.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The results of research on *Saintpaulia hybrida* Wendl. micropropagation are presented. It has been established that when using 96% ethanol for 30 sec and 7% sodium hypochlorite solution ("White") for 20 min as the main sterilizing agents, the yield of sterile culture was 43%. The entire culture turned out to be viable when grown on the Murashige and Skoog culture medium variant with addition of 0,5 mg/l NAA and 1 mg/l BAP.

Keywords: sterile culture, viability, *Saintpaulia hybrida* Wendland

Сенполия является одним из распространенных видов комнатных растений. Традиционные методы размножения сенполий, направленные на создание новых сортов и сохранение сортовых характеристик, к настоящему времени хорошо разработаны. Но несмотря на это, они требуют больших экономических и временных затрат [1].

Современная биотехнология предлагает селекционерам метод микроклонального размножения растений. Он позволяет получить большое количество генетически однородного безвирусного посадочного материала за короткий период времени [2].

Введение в культуру *in vitro* – важный этап микроклонального размножения. Его эффективность зависит от многих факторов: режим стерилизации и тип используемых стерилизующих агентов, видовые и сортовые особенности растений, возраст и качество используемых эксплантов [3].

Цель данной работы – определить выход стерильной культуры и жизнеспособность эксплантов *Saintpaulia hybrida* Wendland.

Исследования проводились в 2023 г. в лаборатории микрклонального размножения кафедры ботаники и генетики растений Пермского государственного национального исследовательского университета. В качестве первичного экспланта были использованы фрагменты листа размером 0,5 см × 0,5 см и 1 см × 1 см. Всего было высажено 390 эксплантов.

Стерилизацию проводили в три общепринятых этапа: престерилизация – раствор нейтрального детергента (стиральный порошок «Миф») 40 и 60 мин, промывка проточной водой 10 мин; стерилизация – 7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») 15 и 20 мин или 15% и 20% хлорамин Б 20 мин, 96% этанол 10 и 30 сек; постстерилизация – промывка стерилизованной дистиллированной водой в три смены по 5 мин в каждой. Всего было использовано 6 режимов стерилизации.

На этапе введения в культуру *in vitro* экспланты высаживались на питательную среду, имеющую минеральную основу по Т. Murashige и F. Skoog [4] с добавлением сахарозы 20 мг/л и агара 8 мг/л. В среду также вносились витамины: тиамин в концентрации 1 мг/л, пиридоксин и никотиновая кислота – по 0,5 мг/л и фитогормоны: индолилуксусная кислота (ИУК) в концентрациях 0,5 и 1 мг/л, нафтилуксусная кислота (НУК) – 0,5 и 1 мг/л, индолил-3-масляная кислота (ИМК) – 0,5 мг/л, бензиламинопури (БАП) – 1 мг/л и кинетин – 1 мг/л. В исследовании использовалось 7 вариантов среды, отличающихся соотношением фитогормонов.

Стерилизация питательной среды в пробирках проводилась в автоклаве при температуре 120°C, при давлении 1 атм. в течение 15 мин. Все этапы микроразмножения проводились в стерильных условиях в ламинар-боксе. Экспланты выращивались в климатической камере с периодом освещения 14/10, при температуре 20±2 °C.

Выход стерильной культуры определяли, как количество стерильных эксплантов к их общему числу. Жизнеспособность рассчитывалась как число 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 $p < 0,05$.

Определяющую роль на первом этапе микрклонального размножения играет выход стерильной культуры. Он представлен на рис. 1. Наиболее высокий процент выхода стерильной культуры получен при использовании в качестве основных стерилизующих агентов 96% этанола в течение 30 сек и 7% раствора гипохлорита натрия («Белизна») в течение 20 мин. Он составил 43%. Наименее эффективным является вариант с использованием 7% раствора гипохлорита натрия («Белизна») в течение 15 мин и 96% этанола в течение 10 сек. Процент выхода стерильной культуры составил 19.

При использовании в качестве стерилизующих агентов 20% хлорамина Б в течение 20 мин и 96% этанола в течение 30 сек вся культура оказалась не стерильной. Статистически значимые отличия отмечаются только с VI режимом стерилизации ($p = 0,01$, при $p < 0,05$).

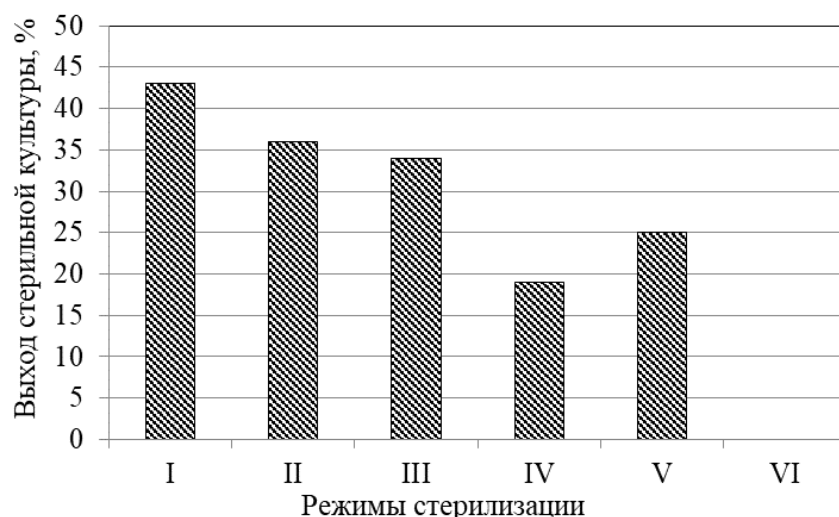


Рис. 1. Процент выхода стерильной культуры *Saintpaulia hybrida* Wendland: I режим – 96% этанол 30 сек, 7% раствор гипохлорита натрия ("Белизна") 20 мин, II режим – 7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») 20 мин, 96% этанол 30 сек, III режим – 15% хлорамин Б 20 мин, 96% этанол 30 сек, IV режим – 7% раствор гипохлорита натрия ("Белизна") 15 мин, 96% этанол 30 сек, V режим – 7% раствор гипохлорита натрия ("Белизна") 15 мин, 96% этанол 30 сек, VI режим – 20% хлорамин Б 20 мин, 96% этанол 30 сек.

В работе Н.Н. Ивановой [5] по микроклональному размножению сортов сенполии "Alocha Orchid" и "Margery's Melody" в качестве стерилизующих агентов использовали 70% раствор этилового спирта в течение 1 мин и раствор гипохлорита натрия в течение 5 и 10 мин. Выход стерильной культуры составил 35,2%, что согласуется с нашими данными.

Через 2 недели после посадки наблюдается дифференциация меристематических очагов, впоследствии из которых формируются микророзетки. Через 5 недель культивирования на вариантах питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 мг/л ИУК, 1 мг/л кинетина, и 0,5 мг/л НУК, 1 мг/л БАП на эксплантах образуются микророзетки. На варианте среды с добавлением 1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина образование микророзеток начинается через 9 недель (рис. 2).

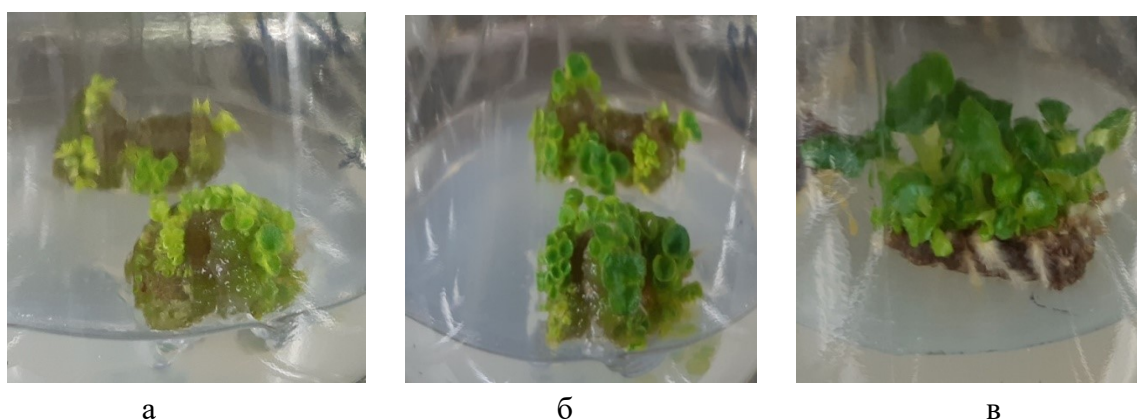


Рис. 2. Развитие эксплантов *Saintpaulia hybrida* Wendland на питательной среде Мурасиге и Скуга: а – через 1 месяц после посадки; б – через 2 месяца после посадки; в – через 3 месяца после посадки

Выход жизнеспособных эксплантов Сенполии гибридной представлен на рис. 3. Наиболее высокая жизнеспособность отмечается на варианте среды Мурасиге и Скуга с до-

бавлением 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП. Все экспланты имели признаки регенерации. Данный вариант среды можно рекомендовать для введения вида в культуру *in vitro* ($p = 0,00$, при $p < 0,05$). Наиболее низкая жизнеспособность отмечается на варианте среды с добавлением 1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина. Этот показатель составил 3%. На вариантах среды с добавлением 0,5 мг/л ИМК и 1 мг/л БАП, а также 0,5 мг/л ИМК и 1 мг/л кинетина вся культура оказалась нежизнеспособной.

В работе Н.Н. Ивановой [5] по микроклональному размножению некоторых сортов сенполии высокая степень регенерации была достигнута при добавлении в среду НУК и БАП. Показатель жизнеспособности варьирует от 86 до 89%. Согласно нашим результатам на варианте среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП вся культура оказалась жизнеспособной.

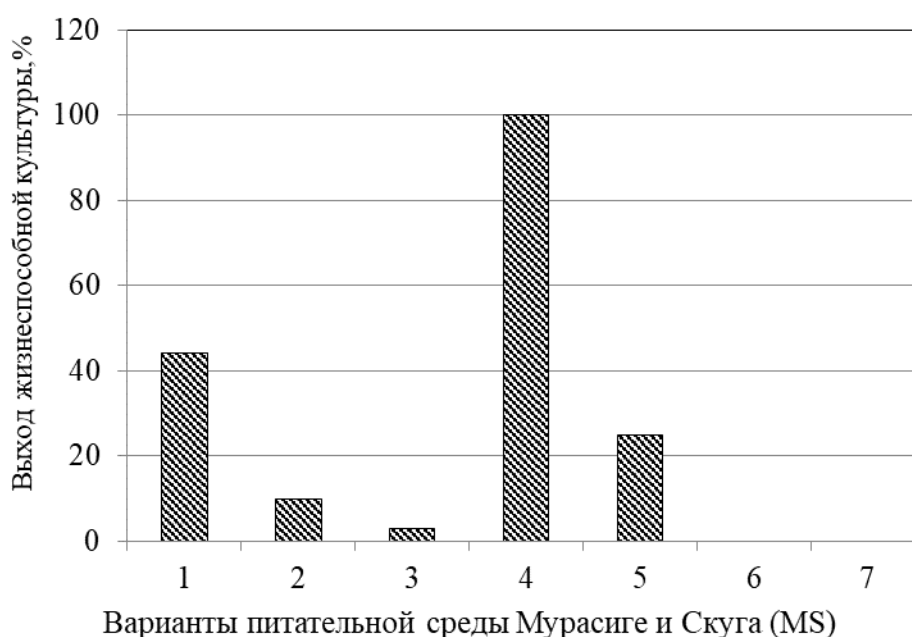


Рис. 3. Выход жизнеспособных эксплантов *Saintpaulia hybrida* Wendland: 1 – MS с добавлением 0,5 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП, 2 – MS с добавлением 0,5 мг/л ИУК и 1 мг/л кинетина, 3 – MS с добавлением 1 мг/л НУК и 1 мг/л кинетина, 4 – MS с добавлением 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП, 5 – MS с добавлением 1 мг/л ИУК и 1 мг/л БАП, 6 – MS с добавлением 0,5 мг/л ИМК и 1 мг/л БАП, 7 – MS с добавлением 0,5 мг/л ИМК и 1 мг/л кинетина.

Таким образом, для получения хорошо растущей стерильной культуры Сенполии гибридной рекомендуется использовать раствор нейтрального детергента в течение 40 мин, промывку проточной водой в течение 10 мин, 96% этанол в течение 30 сек и 7% раствор гипохлорита натрия («Белизна») в течение 20 мин. На этапе микроразмножения рекомендуется использовать вариант твердой питательной среды Мурасиге и Скуга с добавлением 0,5 мг/л НУК и 1 мг/л БАП.

Библиографический список

1. Архипенко Е.И., Шергина Н.Н. Адаптация сенполий, полученных путем микроклонального размножения, в горшечную культуру // Материалы III Всероссийского фестиваля науки: сборник докладов всероссийской конференции. – Сыктывкар. – 2014. – С. 3–11.
2. Основы биотехнологии растений: учебное пособие // Б.Р. Кулуев и др., под ред. Р.Г. Фархутдинова. – Уфа: РИЦ БашГУ. – 2017. – 244 с.
3. Никитина А.В. и др. Влияние способа стерилизации и срока введения в культуру *in vitro* на жизнеспособность эксплантов клонового подвоя яблони 54-118 // Вестник Удмуртского университета. – 2020. – Т. 30. – Вып. 4. – С. 411–415.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiol. Plant.* – 1962. – 15(3). – P. 490.
5. Иванова Н.Н. Особенности регенерации растений интродуцированных сортов фиалки узамбарской (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) в условиях *in vitro* // Труды Никитского ботанического сада. – 2007. – Т. 128. – С. 60–64.

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОРТУЛАКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО
(*PORTULACA GRANDIFLORA*), КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИМЕСЬ К ПОРТУЛАКУ
ОГОРОДНОМУ (*PORTULACA OLERACEA* L.)**

Дробышева А.А., Останина М.В.

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия

Аннотация. Портулак огородный (*Portulaca oleracea* L.) имеет в своем химическом составе широкий спектр биологически активных веществ, что делает возможным использования растения в качестве перспективного источника ценного вида ЛРС [1]. Также, согласно данным зарубежной научной литературы, были найдены активные метаболиты у портулака крупноцветкового [2,3], который может стать возможной примесью к портулаку огородному. Данная статья посвящена изучению макроскопических особенностей портулака крупноцветкового.

Ключевые слова: портулак крупноцветковый, портулак огородный, морфологический анализ

**MORPHOLOGICAL STUDY OF LARGE-FLOWERED PURSLANE
(*PORTULACA GRANDIFLORA*) AS A POSSIBLE ADMIXTURE
TO VEGETABLE PURSLANE (*PORTULACA OLERACEA* L.)**

Drobysheva A.A., Ostanina M.V.

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia

Abstract. Vegetable purslane (*Portulaca oleracea* L.) has a wide range of biologically active substances in its chemical composition, which makes it possible to use the plant as a promising source of a valuable species of LRS [1]. Also, according to foreign scientific literature, active metabolites have been found in large-flowered purslane [2, 3], which may become a possible admixture to vegetable purslane. This article is devoted to the study of macroscopic features of large-flowered purslane.

Keywords: *Portulaca grandiflora*, *Portulaca oleracea* L., morphological analysis

Портулак крупноцветковый (*Portulaca grandiflora*) суккулентное однолетнее растение семейства Портулаковые (Portulacaceae), подкласса Кариофиллиды (Caryophyllidae) (рис.). Культивируется как декоративное растение на юге европейской части России, на Кавказе и на Дальнем Востоке. А также во многих регионах земного шара, преимущественно с тёплым климатом. Родиной является Бразилия. Ареал контурно-штриховой, сплошной. Портулак крупноцветковый (*Portulaca grandiflora*), широко распространен в садах, на клумбах, используется для озеленения городских улиц, в связи с чем возможно распространение совместно портулаком огородным [3]. Период цветения с поздней весны по осень. Растение является эврихором.



Рис. Портулак крупноцветковый (*Portulaca grandiflora*). Общий вид растения

Цельная трава представляет собой облиственные ветвящиеся побеги, с цветами и плодами различной степени зрелости. От главного побега, отходят побеги второго и третьего порядка. Междоузлия укороченные, сближенные. Размер междоузлий колеблется от 0,5 см до 0,1 см, в среднем – 0,33 см. Все растение покрыто рассеянными, оттопыренными, мягко шелковистыми волосками.

Корневая система слаборазветвлённая, стержневая, главный корень округлый в сечении, корни волокнистые. Длина до 5 см, ширина от 3 мм до 1 мм. Поверхность продольно-ребристая, излом ровный. Цвет от бело-серого до светло-желтого. Запах травянистый, вкус кисловатый.

Стебель распростёртый или прямостоячий, гладкий, мясистый, с продольными бороздами, в сечении округлый; цвет в начале цветения – от светло-зеленого до светло-

коричневого; в период цветения и плодоношения варьируется от оранжево-красного до ярко-кирпичного.

Листья сидячие мясистые, простые, ланцетные, вальковатые. Листорасположение спиральное, верхушечные листья собраны в мутовки. Верхушка листовой пластинки заостренная. Основание округло-клиновидное. В листовых пазухах от нескольких до многочисленных беловатых, ворсистых волосков, которые обычно короче листовой пластинки. Край листа гладкий. Жилкование простое. На всей поверхности листа имеется восковой налет. Корреляция значений в размере различных особей, показала характерный оптимальный размер листовой пластинки от 0,9 мм до 2,5 см, в среднем 2 см; ширина в средней части от 0,1 см до 0,5 см, в среднем 0,25 см. Также возможны небольшие отклонения.

Цветки верхушечные, обоеполые, актиноморфные, околоцветник двойной, лепестков от 5 до 7 штук, 2,5–5 см в диаметре. Цвет венчика может быть разнообразен – белый, желтый, красный, оранжевый, белый и др. В зеве цветка имеется пятнышки или полосы, темнее по цвету чем лепестки венчика. Лепестки обратнойцевидной формы, с двумя лопастями на верху. Столбик с линейными рыльцами, глубоко разделён на 3-лопастей, тычинок много, от 15-40. Также встречаются махровые формы портулака крупноцветкового, придающие большую ценность, как декоративному растению. Прицветнички парные, обычно окружают завязь подобно чашечке, сросшиеся при основании с завязью, опадающие при плодах. Завязь полунижняя. Листосмыкание частей околоцветника скрученное. Растение короткого светового дня, к 11 часам дня бутон закрывается.

Плод ценокарпный, яйцевидная тупо-овальная коробочка, вскрывающаяся трещиной поперек крышечки, буро-зеленого цвета. Крышечка зеленая, длина от 0,9 мм до 3,1, средняя – 2,1 мм, ширина от 1 мм до 2,88 мм, средняя – 2 мм; с округлой верхушкой.

Семена мелкие, многочисленные, почковидной формы, бугристые, блестящие, размером в длину и ширину около 0,8 мм, от серо-стального цвета. Запах слабый, травянистый. Вкус слизистый, кисловатый.

Таким образом, был выявлен ряд морфологических особенностей портулака крупноцветкового (*Portulaca grandiflora*). Который можно считать возможной примесью к ЛРС портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.). В настоящее время, на базе кафедры фармакогнозии и ботаники Волгоградского государственного медицинского университета, под руководством заведующей кафедры Яницкой А.В., планируется изучение сравнительного анализа и полного химического состава портулака огородного и портулака крупноцветкового. Данная работа является частью морфологического исследования и химического анализа травы Портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.) [1,4,5].

Библиографический список

1. Дробышева А.А. Портулак огородный (*Portulaca oleracea* L.) Как ценный источник ЛРС для возможного создания ЛП и БАД / А.А. Дробышева, М.В. Останина // в сборнике: Биологические науки: традиции, достижения, инновации. Сборник материалов I Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященная 100-летию со дня рождения профессора К.А. Кузьминой. Редколлегия: Н.А. Дурнова, Н.В. Полуконова, М.А. Березуцкий, А.М. Мыльников, А.С. Федонников. Саратов. – 2023. – С. 81–83.

2. Budiawan A., et al. Wound healing activity and flavonoid contents of purslane (*Portulaca grandiflora*) of various varieties // RSC Adv. – 2023. – Т.13. – №15. – С. 7.
3. Jia S, et al. Genetic diversity and relatedness among ornamental purslane (*Portulaca* L.) accessions unraveled by SRAP markers // 3 Biotech. – 2017. – Т.7. – №4. – С. 8.
4. Дробышева А.А. макроскопическое исследование травы портулак огородный (*Portulaca oleracea* L.) // XIII международная конференция ученых-биологов «симбиоз-россия 2022»: Сборник статей, Пермь, 24-25 октября 2022 г. – Пермь: Пермский государственный национальный исследовательский университет, 2023. – С. 438–441.
5. Дробышева А.А. Макро- и микроскопическое исследования листьев травы портулака огородного (*Portulaca oleracea* L.) // XXVII региональная конференция молодых учёных и исследователей Волгоградской области: Сборник статей, Волгоград, 8 ноября 2022 года. – Волгоград: Волгоградский государственный медицинский университет, 2022. – С. 378–380.

СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ FRAGARIA L. НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Кокшарова А.Н., Данилова М.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В статье приведены сравнительные данные о потенциальной и фактической семенной продуктивности у двух видов: *Fragaria vesca* L. и *Fragaria viridis* L. Было собрано по две популяции каждого вида в городах Пермь и Кунгур. Для анализа потенциальной семенной продуктивности было посчитано количество завязей на одном цветке, а для фактической – число орешков на плод. Было зафиксировано минимальное и максимальное количество завязей и орешков в каждой популяции и посчитано среднее значение как для каждой популяции, так и для вида в целом. Для оценки статистической достоверности использовали метод расчета по Стьюденту. Для обоих видов достоверны отличия по семенной продуктивности между популяциями не выявлено.

Ключевые слова: *Fragaria vesca*, *Fragaria viridis*, семенная продуктивность, популяция

SEED PRODUCTIVITY OF FRAGARIA L. POPULATIONS ON THE TERRITORY OF PERM KRAI

Koksharova A.N., Danilova M.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The article presents comparative data on potential and actual seed productivity in two species: *Fragaria vesca* L. and *Fragaria viridis* L. Two populations of each species were collected in the cities of Perm and Kungur. To analyze the potential seed productivity, the number of ovaries per flower was calculated, and for the actual one – the number of nuts per fruit. The minimum and maximum number of ovaries and nuts in each population was recorded and the average value was calculated both for each population and for the species as a whole. To assess the statistical reliability, the Student calculation method was used. There were no significant differences in seed productivity between populations for both species.

Keywords: *Fragaria vesca*, *Fragaria viridis*, seed productivity, population

Введение. Род *Fragaria* L. из семейства Rosaceae – это многолетние травянистые растения. На территории Пермского края встречается два дикорастущих вида из этого рода – *F. vesca* и *F. viridis* [1].

Fragaria vesca, земляника лесная, растет в лесах, на лесных полянах и на опушках лесов. Это светолюбивый вид, произрастающий на умеренно плодородных и не слишком сухих почвах и встречающийся по всей территории страны. Гораздо реже встречается *Fragaria*

viridis, земляника зеленая. Она растет на сухих солнечных склонах и на приречных лугах. Период цветения обоих видов – с мая по июнь, а плодоношения – с июня по июль. [1]

Известно, что надземная часть представителей рода *Fragaria* L. включает два типа побегов, отличающихся по функциональному назначению: побеги обогащения и побеги вегетативного размножения. Функциональное значение побегов обогащения (цветоносов), заключается в увеличении семенной продуктивности растения. Побеги вегетативного размножения (усы) обеспечивают вегетативное размножение растений [2,3]. Можно ожидать, что может быть либо усиление вегетативной активности в ущерб урожайности, либо, наоборот, снижение усообразования и повышение образования ягод [4,5].

Для земляники характерны перекрёстное опыление насекомыми и самоопыление. Семена разносятся птицами. Новые популяции возникают за счёт семенного размножения, а их разрастание осуществляется вегетативно. Цветки у *F. vesca* могут размножаться как в результате самоопыления, так и перекрестного опыления. А для вида *F. viridis* характерно перекрестное самоопыление [6].

Определение потенциальной и реальной семенной продуктивности позволяет охарактеризовать репродуктивные возможности вида и способность к самовоспроизведению в природной популяции [7].

Цель работы – определение семенной продуктивности растений земляники лесной и земляники зеленой, произрастающих в Пермском крае.

Материалы и методы. Исследование проходило в 2023 году. Анализ был проведен между двумя видами земляники: *Fragaria vesca* и *Fragaria viridis*. Были выбраны популяции каждого вида в городах Пермь и Кунгур. Сбор материала для исследования осуществлялся на 10 пробных площадках 1x1 м., расположенных на расстоянии друг от друга в 5 метрах. С каждой популяции было собрано по 30 цветков и плодов. Собранные образцы помещались в 40%-ый раствор спирта для сохранения материала и последующего изучения.

В собранных цветках подсчитывалось количество пестиков, а на плодах – орешков. Проведен статистический анализ полученных данных, для каждой популяции. Показателем потенциальной семенной продуктивности было принято число зачатков (пестиков) на цветок, а фактической семенной продуктивности – число реально образовавшихся орешков на каждом плоде [8]. Статистическая обработка проводилась по стандартным формулам.

Результаты и их обсуждение. Массовое цветение земляники лесной началось только с 21.05.2023 и до 25.06.2023. А плодоношение в период с 03.06.2023-08.06.2023. Массовое цветение земляники зеленой началось раньше (08.05.2023 – 05.06.2023). А первые плоды появились в период с 18.05.2023 по 24.05.2023.

Результаты изучения семенной продуктивности двух популяций представлены в таблицах. Для оценки статистической достоверности отличия друг от друга популяций использовали метод расчета по Стьюденту. Значение t-критерий по Стьюденту у земляники лесной для потенциальной семенной продуктивности меньше критической ($0,0000439813 < 6,314$). Для фактической семенной продуктивности $0,00294259 < 6,314$. Это говорит о том, что различия между популяциями статистически не значимы. Семенная продуктивность оказалась сходной для обеих популяций. В популяции земляники зеленой значение t-критерий Стьюдента по потенциальной семенной продуктивности также меньше критического ($0,02105869 < 6,314$), а для фактической – $0,498303203 < 6,314$.

Таблица 1 – Потенциальная семенная продуктивность

Популяция	Число семязачатков в завязи (ПСП цветка), шт.			
	<i>F. vesca</i>		<i>F. viridis</i>	
	min–max	Сред. значение	min–max	Сред. значение
Кунгур	39–108	72 ± 3	36 -95	70 ± 3
Пермь	33–90	54 ± 2	40-106	61 ± 3
Общее	33–108	63±2	36-106	66±2

Примечание: ПСП – потенциальная семенная продуктивность.

Таблица 2 – Фактическая семенная продуктивность

Популяция	Число орешков на плоде (ФСП плода), шт.			
	<i>F. vesca</i>		<i>F. viridis</i>	
	min–max	Сред. значение	min–max	Сред. значение
Кунгур	38–131	83 ± 4	37-105	65 ± 3
Пермь	40–96	69 ± 3	39-84	63 ± 2
Общее	38–131	77±2	37-105	64±2

Примечание: ФСП – фактическая семенная продуктивность.

Наши результаты не противоречат данным статьи Д.С. Валуева, Н.Г. Романова [9] по среднему значению фактической семенной продуктивности у *Fragaria vesca* L. Проводился анализ завязываемости семян в зависимости от условий произрастания. Материал собирался с двух популяций в Кемеровской области. Исследование длилось в течение трех лет с разными погодными условиями. В среднем в разные годы число семян варьировало от $50,3 \pm 0,98$ до $67,7 \pm 1,80$.

Таким образом, по нашим данным и по данным других исследователей у видов *Fragaria vesca* L. и *Fragaria viridis* L. семенную продуктивность затрагивает слабо, но на образование орешков влияют внешние экологические факторы, такие как температура окружающей среды, наличие влаги [9].

Библиографический список

1. Овеснов С.А. Местная флора. Флора Пермского края и её анализ: учебное пособие по спецкурсу / Федер. агентство по образованию, Перм. гос. ун-т. Пермь: Изд-во Перм. ун-та, 2009. 215 с.
2. Серебряков И.Г. Морфология вегетативных органов высших растений / И.Г. Серебряков. – М.: Наука, 1952. – С. 391.
3. Коровкин О.А. Закономерности онтогенеза клонов столонообразующих растений / О.А. Коровкин. – М.: МСХА, 2005. – 354 с.
4. Волкова Т.И. Ремонтантная земляника / Т. И. Волкова. – М.: Наука, 2000. – 143 с.
5. Матала В. Выращивание земляники / В. Матала. – СПб.: Издательство Про Агрия, 2003. – 202 с.

6. Машкова А.А., Докучаева Ю.А., Избасарова С.С. О влиянии экологических факторов на генеративную активность *Fragaria viridis* (Duch) Weston степной зоны Оренбургского предуралья // Приволжский науч. вестник, 2012. – № 1 (5). – С. 3–6.
7. Вайнагий И.В. О методике изучения семенной продуктивности растений // Бот. журн. – 1974. –Т. 59. № 6. – С. 826–831.
8. Курдюкова О.Н., Конопля Н.И. Семенная продуктивность и семена сорных растений. Монография. – СПб.: Свое издательство, 2018. – 200 с.
9. Валеева Д.С. Число и завязываемость семян *Fragaria vesca* L. (Rosaceae) в зависимости от условий произрастания / Д.С. Валеева, Н.Г. Романова // Проблемы ботаники Южной Сибири и Монголии. – 2018. – № 17. – С. 184-186.

ИНВАЗИВНЫЕ ВИДЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ ПОКРОВЕ В ОКЕСТНОСТЯХ ДЕРЕВНИ ОСИПОВА

Кольчурина Д.Н.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В последнее время все более существенной становится проблема, связанная со вторжением в природные экосистемы чужеродных (инвазивных) видов. Нами была предпринята попытка изучения флоры малого населенного пункта, удаленного от крупных магистралей, как возможного источника инвазивных видов. Производится анализ биоразнообразия сосудистых растений и сбор гербария в окрестностях небольшой д. Осипова в летний сезон 2022 г. Весь гербарий был определен. Выявлено 259 видов сосудистых растений, из которых 5 видов являются инвазивными. В результате проделанной работы выяснилось, что малые населенные пункты являются серьезными источниками инвазивных видов.

Ключевые слова: инвазивные виды, Кудымкар, биоразнообразие растений

INVASIVE SPECIES IN THE VEGETATION COVER IN THE VICINITY OF THE VILLAGE OF OSIPOVA

Kolchurina D.N.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Recently, the problem associated with the invasion of alien (invasive) species into natural ecosystems has become more and more significant. We have attempted to study the flora of a small settlement remote from major highways as a possible source of invasive species. The analysis of the biodiversity of vascular plants and the collection of herbarium in the vicinity of a small village is carried out. Osipova in the summer season of 2022, the entire herbarium was determined. 259 species of vascular plants have been identified, of which 5 species are invasive. As a result of the work done, it turned out that small settlements are not serious sources of invasive species.

Keywords: invasive species, Osipova village, plant biodiversity

В сравнительно недавнее время остро встала проблема с адвентивными видами, которые начали вторгаться в природные экосистемы. Подобные виды называют инвазивными. В связи с этим, последние 30 лет существует практика составления Черных книг, которые содержат сведения об инвазивных видах того или иного региона [1]. Распространение инвазивных видов, по большей части, связано с асфальтированной дорогой, железнодорожными путями и населенными пунктами.

Нашей задачей была попытка изучить роль населенных пунктов в распространении инвазивных видов. Данным населенным пунктом была деревня Осипова, расположенная в Кудымкарском районе Пермского края, на северо-востоке от г. Кудымкара (рис.).

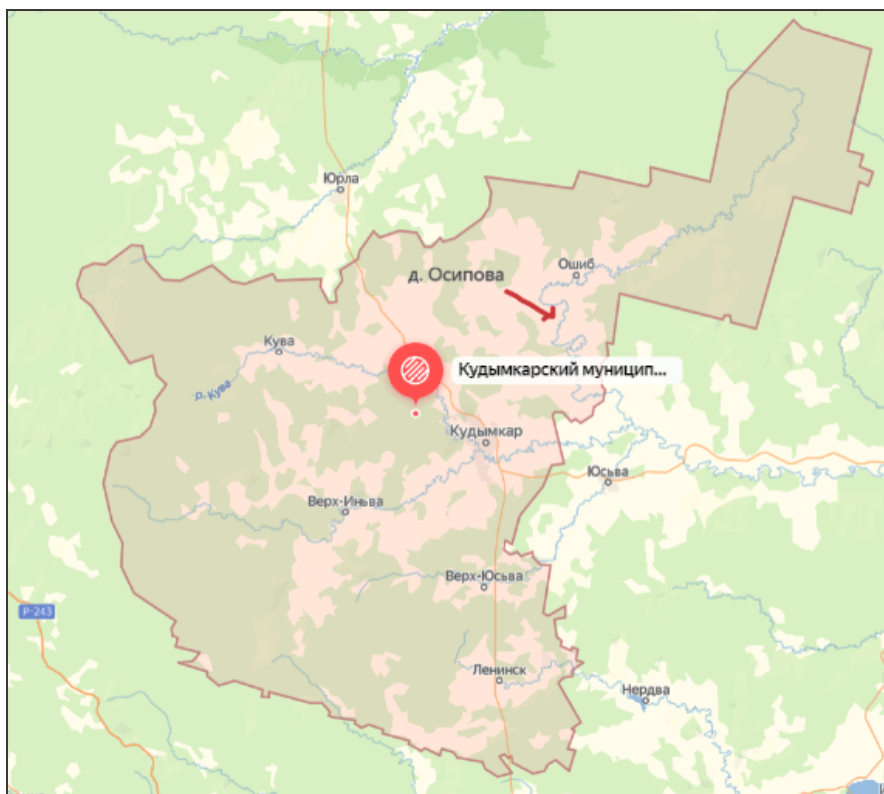


Рис. Местонахождение д. Осипова в Кудымкарском районе.

(https://yandex.ru/maps/geo/kudymkarskiy_munitsipalny_okrug/53000785/?ll=54.638033%2C59.069208&z=8.94).

На территории деревни насчитывается 22 жилых дома, 8 заброшенных домов, 6 дачных участков. В окрестностях деревни имеются 2 поля под зерно, большое количество лесных насаждений. К северу от деревни протекает река Велва. Через деревню протекает небольшая ключевая речка Сенькашор. По середине деревни проходит одна асфальтированная дорога, по которой проезжает небольшое количество машин.

В летний период 2022 года был исследован малый населенный пункт и его окрестности. В исследуемой местности деревни Осипова было выявлено 259 видов, относящихся к 175 родам и 56 семействам. Биоразнообразие сосудистых растений исследовалось с использованием методов гербаризации [4].

Во флоре исследуемой местности были обнаружены инвазивные виды, которые начинают расселяться по нарушенным местам. Вид *Amelanchier ovalis* Medik. достаточно часто входит в группу инвазивных, так как он не привередлив в почвах, и чувствует себя прекрасно как в глиняных, так и в песчаных почвах [2]. Встречается вблизи жилья, на полянах и опушках. Также в расселении данного вида участвуют птицы, которые питаются плодами многих ягодных деревьев и кустарников. Борьбы с *Amelanchier ovalis* Medik. нет, так как данный вид не вытесняет другие виды с ненарушенных мест обитания. Если сказать о *Malus baccata* (L.) Borkh., то был найден только один представитель в нетипичном для него месте в окрестностях деревни Осипова, что говорит о начале расселения данного вида из дачных участков и садов. В норме встречается на полях, вблизи жилья и дорог. Занимает лидирующую позицию по инвазивному расселению и захвату территорий – *Heracleum sosnowskyi* Manden.

Данный вид в начале 1950–х годов массово сеяли как кормовую базу для крупного рогатого скота, и началось все как раз с территории Коми–Пермяцкого автономного округа (на данный момент Кудымкарский район). В окрестностях деревни *Heraclium sosnowskyi* Manden. встречается достаточно часто, практически во всех ареалах обитания флоры. С *Heraclium sosnowskyi* Manden. по всему Пермскому краю усиливаются меры борьбы на законодательном уровне [5]. Близкий инвазивный вид по влиянию на окружающую флору *Galega orientalis* Lam. Кавказский интродуцированный вид, кормовая культура, характеризующаяся экологической пластичностью и адаптивностью, обладающая высоким потенциалом кормовой и семенной продуктивности [3]. Но данный вид достаточно быстро сбегает из культуры. Натурализировался на месте культуры, встречаясь на лугах, опушках, в огородах. Мер борьбы с *Galega orientalis* Lam. на законодательном уровне на данный момент нет. *Symphytum officinale* L. – вид, встречающийся чаще всего рядом с жильем, так как его используют как декоративное растение. Инвазивным его можно считать по той причине, что это вид начал расселяться от его привычного местообитания на небольшое расстояние. Встречается вблизи дорог и жилья.

В ходе сбора и анализа флоры было найдено 5 инвазивных видов (*Amelanchier ovalis* Medik., *Malus baccata* (L.) Borkh., *Heraclium sosnowskyi* Manden., *Galega orientalis* Lam., *Symphytum officinale* L.), которые начали уходить со своих привычных мест обитания и захватывать территории с последующим вытеснением других видов. В связи с этим, можно считать, что территории малых населенных пунктов являются источниками распространения инвазивных видов.

Библиографический список

1. Овеснов С.А. Местная флора. Флора Пермского края и ее анализ: учеб. пособие по спецкурсу / Перм. гос. ун–т. – Пермь, 2009. – 171 с.
2. Виноградова Ю.К., Майоров С.Р., Хорун Л.В. Черная книга флоры Средней России: чужеродные виды растений в экосистемах Средней России. – М.: ГЕОС, 2010. – 512 с.
3. Филатов В.И., Сагирова Р.А. Интродукция Галеги восточной (*Galega orientalis* Lam) в Восточной Сибири // Известия ТСХА. 2005. Вып. 3. 97 с.
4. Скворцов А.К. Гербарий. Пособие по технике. М., Наука, 1977, 199 с.
5. ЗК РФ Статья 13. Содержание охраны земель / Земельный кодекс Российской Федерации от 25.10.2001 № 136–ФЗ (ред. от 28.04.2023) URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_33773/56937c3e71a16317d6be39b0d52decf85830768a/

АЭРОПАЛИНОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СПОР МИКРОМИЦЕТОВ В ОТДЕЛЬНО ВЗЯТОМ РЕГИОНЕ

Павлюченко И.И.¹, Клименко Я.В.¹, Куликова И.А.¹, Рубан В.С.²

¹ Кубанский государственный медицинский университет, Краснодар, Россия

² Кубанский государственный технологический университет, Краснодар, Россия

Аннотация. В связи с повсеместным ростом заболеваемости, во всем мире активно изучаются процессы и явления, оказывающие влияние на состояние здоровья населения, в особенности факторы негативного воздействия окружающей среды на организм человека. В работе представлены результаты аэропалинологического мониторинга спор грибов рода *Cladosporium* и *Alternaria* в г. Краснодаре с июня по август в динамике 6-ти лет (2018-2023 гг.). Выявлено, концентрация спор в атмосфере воздуха г. Краснодара по-прежнему остается высокой, что требует дальнейшего постоянного мониторинга окружающей среды.

Ключевые слова: аэропалинология, *Cladosporium*, *Alternaria*, поллиноз, Краснодар

AEROPALINOLOGICAL MONITORING OF MICROMYCETE SPORES IN A PARTICULAR REGION

Pavlyuchenko I.I.¹, Klimenko Ya.V.¹, Kulikova I.A.¹, Ruban V.S.²

¹ Kuban State Medical University, Krasnodar, Russia

² Kuban State Technological University, Krasnodar, Russia

Abstract. Due to the widespread increase in morbidity, processes and phenomena that affect the health of the population, especially the factors of the negative impact of the environment on the human body, are being actively studied all over the world. The paper presents the results of aeropalino-logical monitoring of fungal spores of the genus *Cladosporium* and *Alternaria* in Krasnodar from June to August in the dynamics of 6 years (2018-2023). It was revealed that the concentration of spores in the air atmosphere of Krasnodar is still high, which requires further constant monitoring of the environment.

Keywords: aeropalinology, *Cladosporium*, *Alternaria*, pollinosis, Krasnodar

В связи с повсеместным ростом заболеваемости, во всем мире активно изучаются процессы и явления, оказывающие влияние на состояние здоровья населения, в особенности факторы негативного воздействия окружающей среды на организм человека [1].

Немаловажными факторами загрязнения окружающей среды, приводящими к росту экологически обусловленных заболеваний, являются аэрополлютанты [2]. Пыльца аллергенных растений и споры микромицетов, являясь фоновым компонентом природного аэрозоля, приводят к развитию такого распространенного аллергического заболевания, как поллиноз [1].

По данным эпидемиологических исследований заболеваемость поллинозом в развитых странах составляет 10-30%, а в отдельных регионах достигает 60% (так, например, заболеваемость поллинозом в Краснодарском крае составляет более 45%) [3, 4]. При этом наблюдается тенденция прогрессивного роста заболеваемости респираторной аллергией [4]. В связи с этим, актуальным становится проведение различных эколого-биологических исследований, направленных на выявление факторов развития респираторной аллергии, включая изучение качественного и количественного состава биоаэрозоля, чем и занимается такая область биологии, как аэропалинология. Так, при постоянном повсеместном аэропалинологическом мониторинге становится возможным заблаговременно оповещать население и специалистов в области здравоохранения об изменяющейся аллергенной обстановке, что способствует заблаговременному проведению лечебно-профилактических мероприятий и является основой снижения заболеваемости.

В настоящий момент, согласно интерактивной карте мира станций мониторинга, аэропалинологическое исследование осуществляется лишь в 9 регионах России. Так, например, в Европе функционирует более 500 станций аэропалинологического мониторинга [5]. Это обуславливает необходимость развития аэропалинологической сети по стране.

Одна из 9 станций аэропалинологического мониторинга, зарегистрированных в интерактивной карте мира, расположена на Юге России – в г. Краснодаре [5]. Важно отметить, что Краснодарский край, в силу природно-климатических особенностей, имеет широкое произрастание и распространение аэроаллергенов, которые за счет явления дальнего транспорта способны распространяться на значительные расстояния, вызывая нехарактерные для регионов поллинозы. Это формирует актуальность проведения аэропалинологических исследований в данном регионе [4].

Споры микроскопических плесневых грибов также широко распространены на данной территории и за счет своих морфофизиологических особенностей способны повсеместно распространяться и вызывать у населения сенсibilизацию, по симптоматике схожую с поллинозом [6]. Заболеваемость респираторной аллергией, фактором развития которой являются споры микромицетов, прогрессирует, и, в настоящее время, насчитывает до 64% у лиц с аллергопатологиями [7]. К числу наиболее часто встречающихся микромицетов, обладающих существенной аллергенностью, относят грибы родов *Alternaria* и *Cladosporium*. За счет своих малых размеров (от 3 до 30 мкм), споры данных грибов могут свободно проникать в дыхательные пути человека, вызывая клинические симптомы респираторных аллергозов [7].

Цель исследования – анализ состояния окружающей среды на присутствие и концентрацию спор микромицетов рода *Alternaria* и *Cladosporium* в г. Краснодаре в период максимального спороношения в динамике 6 лет (2018-2023).

Аэропалинологическое исследование осуществлялось в г. Краснодаре в период с июня по август 2018–2023 гг. Споры микромицетов улавливали при помощи волюметрического пылеуловителя VPPS 2000 «Lanzoni», установленного в центральной части города на высоте 12,5 м от уровня земли, в соответствии с инструктивными данными [8]. Идентификация спор проводилась при помощи светового биологического микроскопа Meiji Techno серии MT5300L и комплекса аппаратно-программной визуализации «VISION BIO ANALISE» с фото- и видео-фиксацией. Было изготовлено и проведено исследование 552 фиксированных микропрепаратов 12 непрерывными транссектами, расположенными вертикально, с расстоянием в 4 мм.

Расчет абсолютного содержания спор проводился в соответствии с рекомендациями Мейер-Меликян [9]. Результаты ежедневного анализа спор микромицетов рода *Alternaria* и

Cladosporium в атмосфере воздуха регистрировались в сводных таблицах. Для подсчета, анализа полученных результатов, построения графиков использовали программы «Microsoft Excel 2010» и AeRobiology (v. 2.0.1).

Согласно проанализированным данным за 2023 г. были выявлены следующие особенности (рис. 1 и 2):

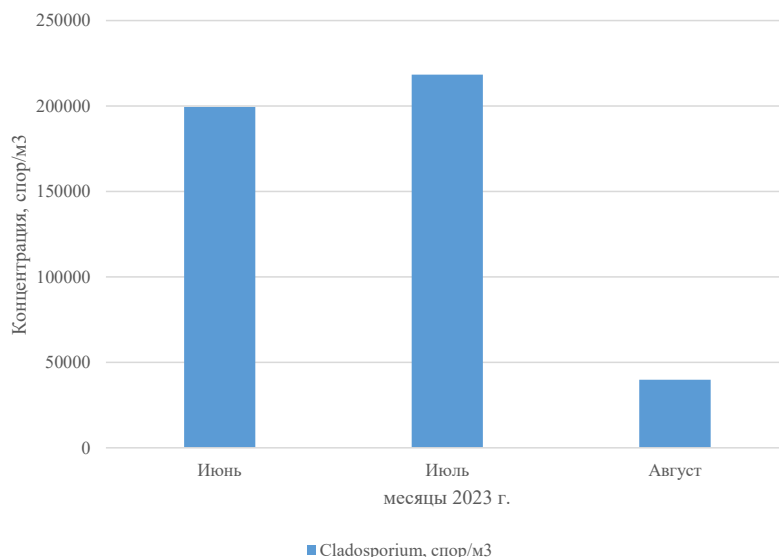


Рис. 1. Концентрация спор грибов рода *Cladosporium* в г. Краснодаре в летний период 2023 г.

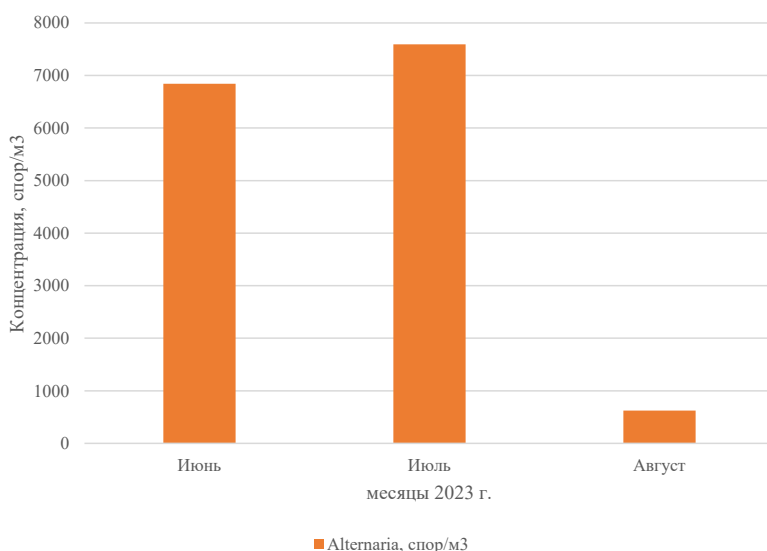


Рис. 2. Концентрация спор грибов рода *Alternaria* в г. Краснодаре в летний период 2023 г.

В данный период исследования фиксировался очень высокий уровень спороношения грибов рода *Alternaria* (более 100 спор/м³ в сутки) и *Cladosporium* (более 3000 спор/м³ в сутки). Максимальная суммарная концентрация грибов рода *Alternaria* и *Cladosporium* отмечалась в июле месяце 2023 г. При этом пик спороношения у рода *Cladosporium* наблюдался 10.07.2023 и составил 25002 спор/м³, а рода *Alternaria* – 06.07.2023, составил 894 спор/м³.

Полученные результаты исследования спороношения в 2023 г. сопоставлялись с данными проводимого ранее 5-летнего аэропалеонтологического мониторинга (2018–2022 гг.) (рис. 3) [10]:

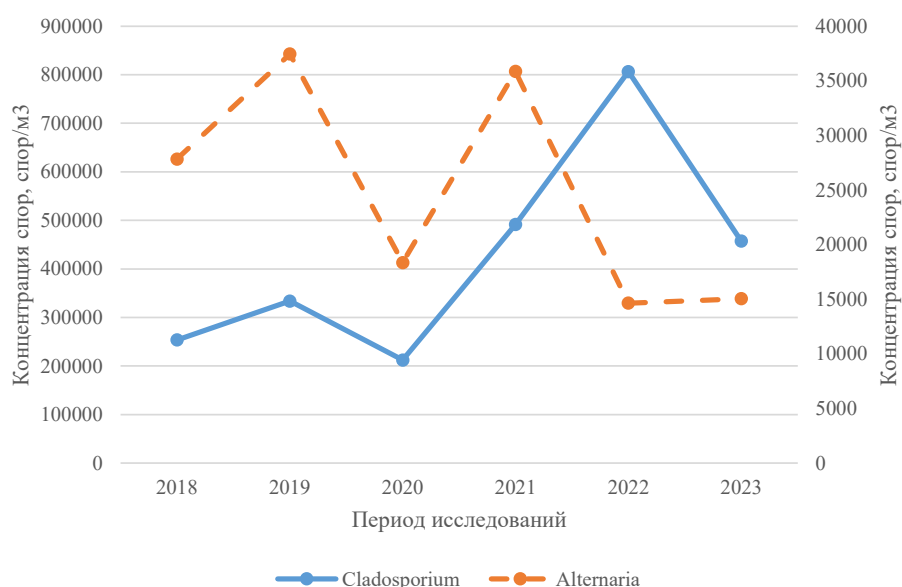


Рис. 3. Концентрация спор грибов рода *Alternaria* и *Cladosporium* в г. Краснодаре в летний период 2018-2023 гг.

Отмечается, что показатели суммарной сезонной концентрации спор мицелиальных грибов снижаются относительно 2022 г., однако, концентрация спор в атмосфере воздуха городской среды по-прежнему остается высокой, превышая данные за 2018-2020 гг. и практически совпадая с показателями 2021 г. При этом максимум пыления в период 6-летнего мониторинга отмечался летом, кроме 2022 г., что, возможно, связано с погодными особенностями в данный период. Показатели пика спороношения рода *Cladosporium* наблюдались самое ранее – 24.06.2018, позднее – 12.08.2021. Для спор микромицетов рода *Alternaria* самый ранний пик спороношения был зафиксирован 21.06.2020, поздний – 19.09.2022 [10].

Таким образом, можно сказать, что содержание спор микромицетов рода *Alternaria* и *Cladosporium* в атмосфере воздуха, как факторов загрязнения окружающей среды и развития респираторных аллергозов в исследуемом регионе, имеется в повышенных концентрациях, что требует продолжения мониторинга на постоянной основе. Важно отметить, что ключевую роль в формировании аллергоспектра играют погодные условия и это требует дальнейшего проведения аэропалинологических исследований с учетом абиотических и антропогенных факторов.

Исследование осуществлено за счет средств гранта, предоставляемого Кубанским научным фондом (договор № НИП-10/22 от 19.12.2022).

Библиографический список

1. Ширяева Д.М., Минаева Н.В., Новоселова Л.В. Ширяева, Д.М. Экологические аспекты поллинозов. Обзор литературы // Экология человека. – 2016. – № 12. – С. 3–10. – DOI 10.33396/1728-0869-2016-12-3-10
2. Моисеева О.А., Глебов В.В. Экология и аллергические отклонения в России Федерации // Успехи современного естествознания. – 2013. – № 8. – С. 54–54.
3. Jarvis D, Burney P. ABC of allergies. The epidemiology of allergic disease //BMJ. – 1998. – Vol. 316, № 7131. – P. 607–610.

4. Павлюченко И.И., Клименко Я.В., Федотова Н.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н., Сторожук А.П., Цымбалов О.В. Аэропалинологический мониторинг состояния окружающей среды в отдельно взятом регионе как фактор профилактики поллиноза // Инновационная медицина Кубани. – 2023. – Т. 8, № 3. – С. 62–70. – DOI 10.35401/2541-9897-2023-26-3-62-70
5. Павлюченко И.И., Клименко Я.В., Мороз А.Н. Особенности динамики аэропалинологического спектра г. Краснодар в осенне-летний период 2021 г. // Бюл. МОИП. Отд. биол. – 2022. – Т. 127. – Вып. 5. – С. 66–77.
6. Клименко Я.В., Павлюченко И.И., Мороз А.Н., Голубцова Г.А., Прозоровская Ю.И., Костюшок Н.Я. Аэропалиномониторинг спор грибов рода *Cladosporium* и *Alternaria* в г. Краснодаре в динамике 4х лет (2018-2021 гг) // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2022. – Т. 8. – № 1. – С. 117–124.
7. Козлова Я.И. Современный взгляд на проблему микогенной аллергии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://alkorbiogroup.ru/statyi/sovremennyj_vzglyad_na_problemu_mikogennoj_allergii, свободный. – (дата обращения: 21.08.2002).
8. Galan C., Smith M., Thibaudon M. et al. EAS QC Working Group. Pollen monitoring: minimum requirements and reproducibility of analysis // *Aerobiologia*. – 2014. – Vol. 30. – P. 385–395.
9. Принципы и методы аэропалинологических исследований / под ред. Н.Р. Мейер-Меликян, Е.Э. Северова, Г.П. Гапочка и др. Москва, 1998. – 48 с.
10. Клименко Я.В. Аэропалинологическое исследование г. Краснодара в динамике 5 лет (2018–2022 гг.) // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2023». 2023. URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2023/data (дата обращения: 17.09.2023)

ЗАРАЖЕННОСТЬ ВИРУСОМ ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ СОРТОВ ОЗИМОЙ РЖИ (*SECALE CEREALE* L.), ВЫРАЩИВАЕМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ И СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Наговицына В.О., Шестиперстова А.С., Печенкина В.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Рожь является стратегически важной культурой в России. Она предъявляет самые низкие требования к плодородию почвы, условиям минерального питания и защиты растений. Мониторинг фитосанитарного состояния озимых сортов ржи является необходимой мерой для ее стабильной урожайности. Четыре сорта *Secale cereale* L. (Ника, Викрас, Паром и Чусовая), выращиваемые в Пермском крае и Свердловской области, изучены на зараженность вирусом Желтой карликовости ячменя (Barley yellow dwarf virus). Все наименования являются сортами отечественной селекции. В ходе ПЦР в реальном времени в листьях озимой ржи, собранных на территории Пермского края, вирус полосатой мозаики пшеницы был обнаружен в 18 пробах из 40. В материале из Свердловской области в 6 пробах из 40.

Ключевые слова: вирус желтой карликовости ячменя, *Secale cereale* L., ПЦР-РВ, Пермский край, Свердловская область

INFECTION WITH YELLOW DWARFISM VIRUS OF BARLEY VARIETIES OF WINTER RYE (*SECALE CEREALE* L.) GROWN IN PERM KRAI AND SVERDLOVSK REGION

Nagovicina V.O., Shestiperstova A.S., Pechenkina V.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Rye is a strategically important crop in Russia. It imposes the lowest requirements on soil fertility, conditions of mineral nutrition and plant protection. Monitoring of the phytosanitary condition of winter rye varieties is a necessary measure for its stable yield. Four varieties of *Secale cereale* L. (Nika, Vikras, Parom and Chusovaya), grown in the Perm Region and the Sverdlovsk region, were studied for infection with the barley yellow dwarfism virus (Barley yellow dwarf virus). All names are varieties of domestic selection. During real-time PCR in winter rye leaves collected on the territory of the Perm Region, the striped mosaic virus of wheat was detected in 18 samples out of 40. In the material from the Sverdlovsk region in 6 samples out of 40.

Keywords: Barley yellow dwarf virus, *Secale cereale* L, PCR real-time, Perm krai, Sverdlovsk region.

Введение. Рожь посевная (*Secale cereale* L.) является важной зерновой культурой в мировом земледелии. Ее уникальность заключается в высокой адаптивности к нестабильным метеорологическим условиям на территориях возделывания, зимостойкости и способности

давать урожай на низкоплодородных почвах, что позволяет стабилизировать валовый сбор зерна, необходимого как для населения, так и для кормопроизводства [1, 2].

Однако в последние годы в России сохраняется тенденция к сокращению посевных площадей ржи. В период с 2010 по 2021 г. площади сократились практически наполовину: в 2010 году посевные площади ржи составляли 1757 тыс. га., а уже в 2021 – 892 тыс. га. [3]. Данному явлению способствует множество факторов, в том числе и ухудшение фитосанитарной обстановки [4].

Многие сельскохозяйственные растения поражаются различными патогенными бактериями, грибами, а также вирусами. Нередко вирусные болезни приводят к гибели отдельных сортов сельскохозяйственных посевов. Всего известно более 600 фитопатогенных вирусов, в мире 90 из них поражают злаковые культуры, в том числе и рожь [5]. Основную опасность для выращивания озимой ржи представляют вирусы, переносимые тлями, цикадками и клещами. Одним из наиболее распространенных вирусов злаковых является желтая карликовость ячменя (BYDV) [6].

Характерный признак желтой карликовости – появление на пораженных листьях интенсивной окраски от золотисто-желтой до оранжевой, которая распространяется от верхушки вниз, чаще по краям листовой пластинки. Со временем листья становятся жесткими, мозаичность и крапчатость отсутствуют. При поражении молодых растений наблюдается интенсивное кущение и карликовость; они едва достигают половины нормальной высоты, корневая система развита слабо. Колосья часто не образуются, или они короткие и дают незначительный урожай. Если заражение происходит после кущения, молодые листья желтеют, значительной задержки роста не происходит [7]. Вирус передается не менее 23 видами тлей и сохраняется в зимующих растениях [8;9]. При раннем севе озимых, когда велика популяция инфицированных вирусами тлей или цикадок, а также при мягкой и длинной осени, когда обеспечивается длительный период лета переносчиков, вирус может вызывать потери урожая до 70% и более [6].

Поскольку озимая рожь является стратегически важной культурой, необходимо сократить потери урожая от вирусных заболеваний. Для проверки исследуемого материала был использован метод ПЦР в реальном времени, поскольку он позволяет быстро и эффективно оценить растительный материал на наличие вирусной инфекции.

Материал и методы исследования. На зараженность вирусом желтой карликовости ячменя было исследовано 4 сорта *Secale cereale* L., выращиваемых в Пермском крае и Свердловской области. В исследовании были использованы сорта отечественной селекции: Ника, Викрас, Паром и Чусовая. Генетический материал был выделен из листьев *S. cereale*, собранных во время генеративного периода. Сбор производился на опытном поле Пермского НИИСХ и на опытном поле Уральского НИИСХ. Выделение ДНК осуществляли в соответствии с методом СТАВ [10,11]. ДНК выделяли из 20 мг гербаризированного растительного материала (листьев *S. cereale*) каждого образца. Концентрацию и качество ДНК определяли стандартным методом [12]. Методом обратной транскрипции РНК вирусов перевели в кДНК в процессе полимеразной цепной реакции в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ), которая была проведена на термоциклере CFX96 (BioRad) с использованием реактивов производства ООО «НПФ Синтол». Набор реактивов состоял из: реакционной смеси; положительного контрольного образца (ПКО); содержащего фрагменты кДНК; ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы (syntaq+RT); отрицательного контрольного образца (ОКО). Набор реагентов позволяет выявлять специфичные фрагменты вируса Желтой карликовости ячменя. По каналу флуоресценции FAM (зеленый), качественно определяется наличие в пробе РНК вируса.

Второй канал флуоресценции HEX (синий) необходим для внутреннего положительного контроля [13]. Каждая проба была проанализирована индивидуально. ПЦР-РВ проведена при условиях, предусмотренных в инструкции производителя ООО «НПФ Синтол». Интерпретация результатов ОТ-ПЦР-РВ была проведена в программе Bio-Rad CFX Manager по инструкции компании ООО «НПФ Синтол».

Результаты и обсуждение. Для диагностики скрытой вирусной инфекции был применен метод ОТ-ПЦР-РВ. В ходе лабораторных исследований удалось обнаружить наличие вирусной инфекции в некоторых образцах (рис. 1–2). В ходе ПЦР в реальном времени вирус желтой карликовости ячменя был обнаружен в 24 пробах из 80 во всех 4 изучаемых сортах ржи (табл.).

Рост по каналу флуоресценции FAM свидетельствуют о присутствии РНК вируса ВЖКЯ (BYDV) в образце (рис. 1–2). Результаты подлежат учету только в случае, когда положительный контрольный образец (ПКО) имеет положительный результат по каналу FAM, а отрицательный контрольный образец (ОКО) имеет отрицательный результат по каналу FAM. Положительный контрольный образец необходим для определения специфичности набора реагентов к вирусу желтой карликовости. Отрицательный контрольный образец необходим для подтверждения отсутствия в реакционной смеси контаминации и ингибирования.

Из изученных сортов ржи, произрастающих в Пермском крае у 18 (22,5% всего исследованных проб) выявлен листовой вирус желтой карликовости ячменя. Все 4 сорта оказались инфицированы. Кроме этого, 50% растений инфицированы у 2 сортов (это 25% от исследованных проб сортов Пермского края), 60% – у 1 сорта (15%) и 20% так же у 1 сорта (5%).

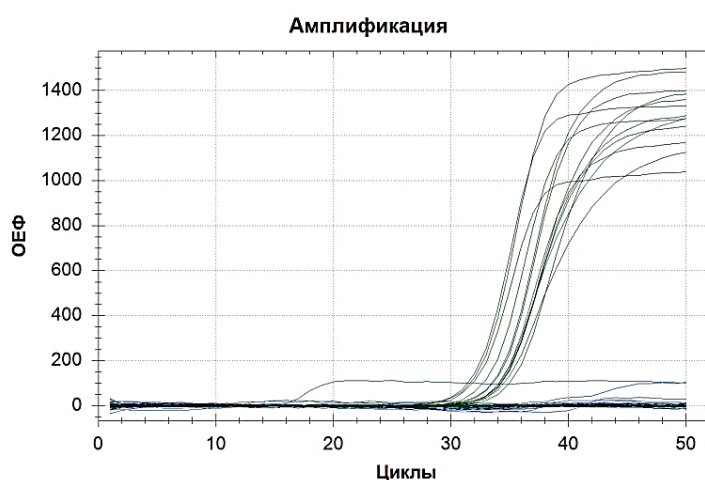


Рис. 1. Кинетические кривые флуоресценции, полученные для образцов РНК из листьев, собранных на территории Пермского края, на приборе для ПЦР CFX96 (Bio-Rad); цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: FAM (BYDV) – зеленый, HEX (внутренний положительный контроль) – синий; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции, циклы – циклы амплификации.

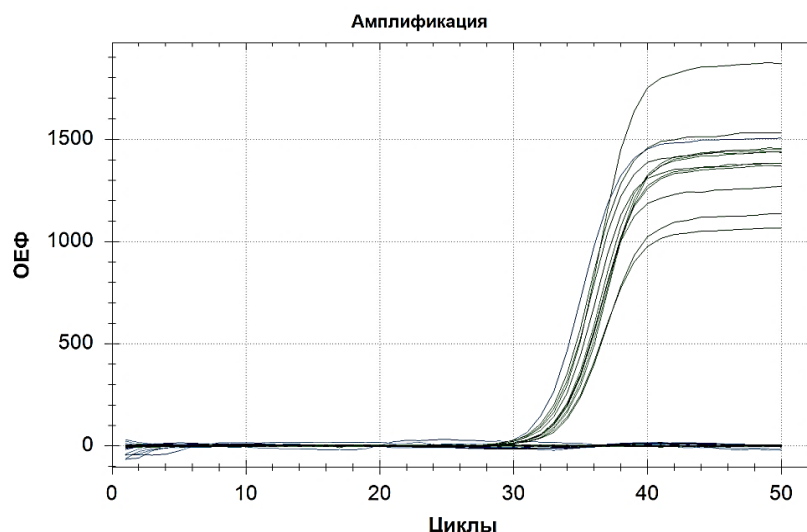


Рис. 2. Кинетические кривые флуоресценции, полученные для образцов РНК из листьев, собранных на территории Свердловской области, на приборе для ПЦР CFX96 (Bio-Rad); цвета, соответствующие каналам детекции флуоресценции: FAM (BYDV) – зеленый, HEX (внутренний положительный контроль) – синий; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции, циклы – циклы амплификации.

У сортов, собранных в Свердловской области, в пробах 1 сорта (Чусовая) не обнаружена РНК ВЖКЯ (25% исследованных проб сортов Свердловской области). Выявлено, что 20% проб инфицированы у сортов Ника, Викрас и Паром. Пробы трех сортов Свердловской области инфицированы вирусом на 15%.

Таблица – Зараженность вирусом желтой карликовости ячменя листьев 4 сортов озимой ржи

Место сбора	Сорт	Наличие вирусной инфекции, в %
Опытное поле Пермского НИИСХ (Пермский край)	Ника	50
	Паром	60
	Викрас	20
	Чусовая	50
Опытное поле Уральского НИИСХ (Свердловская область)	Ника	20
	Паром	20
	Викрас	20
	Чусовая	–

Итак, изученные сорта, собранные на территории Свердловской области заражены вирусом желтой карликовости ячменя в меньшей степени (7,5%) по сравнению с изученными сортами с территории Пермского края (22,5%). Пробы листьев ржи с территории Пермского края инфицированы ВЖКЯ, что составляет 45% от всех исследованных проб с опытного поля Пермского НИИСХ. В 6 пробах, собранных на территории опытного поля Уральского НИИСХ, обнаружена РНК ВЖКЯ, что составило 15% от исследованных проб ржи сортов Свердловской области. Согласно исследованию, зараженность сортов озимой ржи вирусом желтой карликовости ячменя в Пермском крае в 3 раза выше, чем в Свердловской области.

По результатам мониторинга встречаемости вируса было обнаружено, что вирусом желтой карликовости ячменя заражены 30% исследованных образцов.

Библиографический список

1. Пономарева М.Л., Пономарев С.Н., Маннапова Г.С. и др. Результаты селекции озимой ржи на устойчивость к болезням и продуктивность в НИИСХ Северо-Востока. // Вестник КрасГАУ. 2015. № 6. С. 1–9.
2. Щеклеина Л.М. Мониторинг болезней озимой ржи в Кировской области и возможные направления селекции на иммунитет // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2020. Т. 21. № 2. С. 124–132.
3. Эффективность экономики России: Федеральная служба государственной статистики. URL: <http://rosstat.gov.ru> (дата обращения: 19.09.2023).
4. Кузнецов В.В. Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / В.В. Кузнецов, В.В. Кузнецов, Г.А. Романов; под ред. В.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 487 с.
5. Глинушкин А.П., Белошапкина О.О., Виноградова С.В., Николаев Н.А. Диагностика вирусных симптомов у сортообразцов озимой пшеницы из коллекции ВНИИР // Достижения науки и техники АПК. 2013. № 2. С. 24–26.
6. Можаяева К.А. Современные проблемы иммунитета растений к вредным организмам // Желтая карликовость ячменя: материалы III Всероссийской и Междунар. конф. Санкт-Петербург, 2012. С. 32–34.
7. Дорофеева Л.Л., Шкаликов В.А. Болезни зерновых культур. М.: Печатный город, 2007. 96 с.
8. Какарека Н.Н., Волков Ю.Г., Гапека А.В. Желтая карликовость ячменя и ее переносчики в Приморском крае // Защита и карантин растений. 2015. № 8. С. 49–50.
9. Можаяева К.А. Итоги изучения желтой карликовости ячменя // Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. 2011. № 1. С. 24–33.
10. Оптимизация методики выделения ДНК некоторых хвойных видов растений Пермского края / Ю.С. Нечаева [и др.] // Синтез знаний в естественных науках. Родник будущего: проекты, технологии, оборудование: материалы Междунар. конф. Пермь, 2011. С. 278–282.
11. 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. No. 19. P. 69–76.
12. Шакирова А.Р. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редких видов растений *Pulsatilla flavescens* (ZUCC.) JUZ. и *Pulsatilla patens* (L.) MILL // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. конгресс молодых ученых-биологов с междунар. участием, Пермь, 13–15 мая 2019 г., Перм. гос. нац. исслед. ун-т. Пермь, 2019. 287 с.
13. Артемьева Т.А., Карпухин М.Ю. Сравнение методов ИФА и ПЦР анализа при определении вирусной патологии у растений картофеля // Молодежь и наука. 2019. № 7–8. С. 35–35.

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КУЛЬТУРНЫХ СЛОЁВ ГЛЯДЕНОВСКОГО ГОРОДИЩА

Орлова Е.М.¹, Шумиловских Л.С.^{2, 3 46}

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

² *Гёттингенский университет им. Георга Августа, Гёттинген, Германия*

³ *Томский государственный университет, Томск, Россия*

Аннотация. В статье представлены результаты палинологических исследований, проведённых на Гляденовском городище. Проанализировано 7 образцов из культурных слоёв поселения, выделенных при помощи метода Фаегри – Иверсена. Палинологические данные, полученные в ходе изучения, являются предварительными.

Ключевые слова: Приуралье, ранний железный век, Гляденовское городище, палинология, палеоэкология, непыльцевые палиноморфы

PRELIMINARY DATA OF PALYNOLOGICAL ANALYSIS OF CULTURAL LAYERS OF THE GLYADENOVSKOYE HILLFORT

Orlova E.M.¹, Shumilovskikh L.S.^{2, 3}

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia*

² *University of Göttingen Georg August, Göttingen, Germany*

³ *Tomsk State University, Tomsk, Russia*

Abstract. The article presents the results of palynological studies conducted at the Glyadenovsky settlement. Seven samples from the cultural layers of the settlement, isolated using the Faegri-Iversen method were analyzed. The palynological data obtained during the study are preliminary.

Keywords: Cis-Urals, early Iron Age, Glyadenovskoye hillfort, palynology, paleoecology, non-pollen palynomorphs

В последнее время изучение мест обитания древних людей происходит в комплексе методов археолого-палеоэкологического подхода для воссоздания взаимоотношений прошлых народов с ландшафтами, которые они населяли. Памятники раннего железного века не исключение – для реконструкции растительности и взаимодействий древнего населения Гляденовского городища с окружающей средой мы провели спорово-пыльцевой анализ.

Гляденовское городище (костище) расположено вблизи с. Большое Савино, на мысе коренного берега р. Нижняя Мулянка, впадающая в р. Каму в 3,5 км южнее городища. Городище состоит из трёх площадок, где средняя ограничена вторым валом и небольшим рвом с запада от третьей (нижней) площадки городища [1].

Гляденовское городище появляется в позднеананьинское время в конце VI в. до н.э. и функционирует до IV в. до н.э. [2] На нижнем уровне поселения были выявлены постройки жилищного и хозяйственного назначения, датирующиеся V – IV вв. до н.э. [3]

В 2019 году из культурных слоёв на месте расположения жилого сооружения было отобрано 8 почвенных образцов с 10 см от поверхности через каждые 5 см. Формирование нижнего слоя (глубина 22 – 50 см, чёрно-коричневый суглинок) происходило в период функционирования нижней площадки, а слой коричневого суглинка с обожженной глиной (глубина 11 – 22 см) скорее всего относится к более позднему периоду, так как в нём присутствует керамика гляденовской эпохи (III/II вв до н.э. – III вв.) [1]. Химическая обработка проб проводилась методом Фаегри – Иверсена в Гёттингенском университете (Германия). Определение пыльцы проводилось с использованием коллекции.

Из 7 отобранных образцов 6 оказались репрезентативными, в них подсчеты проведены до минимума в 100 пылевых зерен. В палиноспектрах (рис.) преобладает пыльца древесных растений (60-80%), преимущественно *Picea* и *Pinus*, в небольшом количестве *Betula*, *Ulmus*, *Tilia* и *Abies*. Из кустарников были идентифицированы только пылевые зёрна *Sambucus nigra*-type в процентном соотношении меньше 1. Пыльца травянистых сообществ достигает 20-40%, где доминирующими являются *Poaceae* (до 25%), *Cichorioideae* (до 25%) и *Cyperaceae* (3%). *Astraceae*, *Chenopodiaceae*, *Artemisia*, *Potentilla*-type, *Plantago major/media*, *Ranunculus acris*-type встречаются регулярно.

На основе стратиграфии культурных слоёв и характеристик палиноспектров можно выделить 3 условные пылевые зоны. В первой зоне (LPZ-1: 50 – 25 см, культурный слой V – IV вв до н.э.) преобладает *Picea* с небольшой долей *Betula*, *Tilia*, *Abies*. Их количественные изменения соотносятся с колебаниями представителей недревесной пыльцы – *Cichorioideae*, *Poaceae*, *Potentilla*-type, *Plantago major/media*, *Astraceae*, *Chenopodiaceae*, *Ranunculus acris*-type и *Ariaceae*. Среди непылевых палиноморф [5] выделяются грибы *Gelasinaspora tetrasperma*, *Sporormiella*, *Sordaria*-type, *Glomus*-type, *Urocystis*, показатели которых также колеблются.

Во второй (LPZ-2, 20-15 см, поздний культурный слой) *Picea*, *Betula*, *Ulmus*, *Tilia* постепенно увеличиваются, появляется *Sambucus nigra*-type, уменьшается доля *Poaceae*, *Cichorioideae*, *Astraceae*. Из микрофоссилий присутствуют в небольшом количестве и *Sporormiella*, возрастает количество спор папоротниковых.

В последней зоне (LPZ-3, 10 см, гумусовый слой) снижается доля пыльцы *Picea*, показатели остальных древесных видов наоборот увеличиваются. Возрастает количество рудеральных трав, встречаются *Gelasinaspora tetrasperma*, *Sporormiella* и *Glomus*-type.

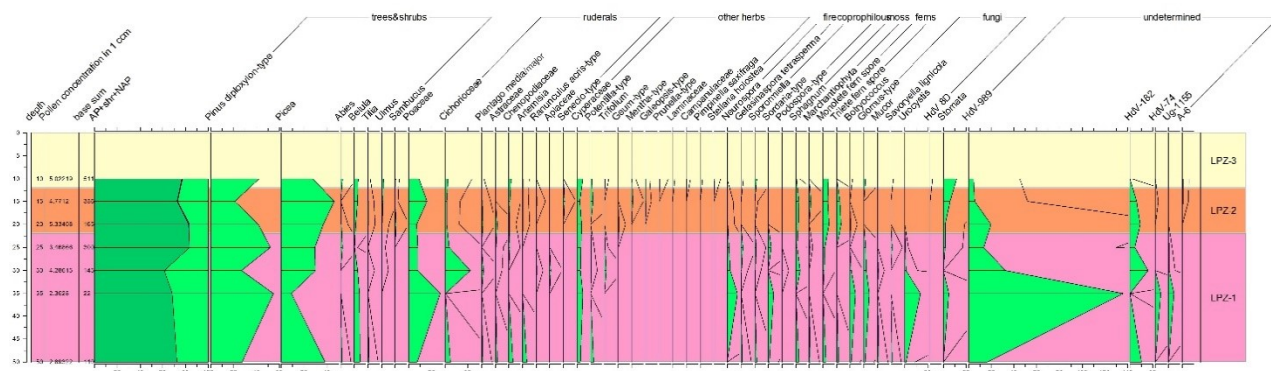


Рис. Пыльцевая диаграмма колонки из культурных слоёв Гляденовского городища

На основе спорово-пыльцевого анализа можно предположить, что в период функционирования комплекса на нижней площадке существовали южнотаёжные еловые леса с участием берёзы, липы и пихты. Небольшое количество пыльцы рудеральных трав и присутствие остатков *Neurospora* и *Gelasinasporea tetrasperma* указывают на наличие очага рядом. Сооружение на первом этапе скорее всего выполняло роль жилища [4]. Далее функционал постройки меняется – её используют, возможно, как стойло, о чем свидетельствует снижение пыльцы древесных видов, увеличение трав и наличие копротрофных грибов – *Sporormiella*, *Sordaria*-type, *Podospora decipiens*-type и спор головневового гриба *Urocystis*, который мог попасть вместе с сеном. *Savoryella lignicola* и *Botryococcus* указывают на использование воды из небольших зарастающих водоемов. Растительный ландшафт на данном этапе была более открытым. В более поздний период существования костища (III/II вв до н.э. – III вв) антропогенный фактор сохраняется, но при этом идёт процесс зарастания – увеличивается пыльца деревьев, появляются мхи (Marchantiophyta, *Sphagnum*) и папоротниковые (Monolete fern spore, Trilete fern spore), комплекс построек на нижней площадке поселения забрасывается. Результаты спорово-пыльцевых спектров подтверждают данные, полученные из тех же слоёв при археоботаническом анализе, где были найдены хвоя *Picea*, костянки *Fragaria vesca* и семена *Chenopodium album* [3].

Спорово-пыльцевые данные, найденные на Гляденовском городище, дают общее представление о растительности, которая произрастала в округе поселения в период его функционирования, где в период V–IV вв. до н.э. произрастали южнотаёжные леса. Это хорошо соотносится с результатами пыльцевой колонки с Пальтинского болота, отражающего доминирование южной тайги или подтайги на территории средней Камы [6]. Предположения о функционале изученной ранее постройки были дополнены – превращение её из жилой зоны в хозяйственную (стойло). Сорные растения в спектрах являются маркерами высокой антропогенной деятельности в период функционирования городища. Полученные результаты являются предварительными для Гляденовского городища. Для более детального анализа и реконструкций планируются дальнейшие исследования палиноспектров из культурных слоёв городища и увеличение количества данных по пыльце.

Библиографический список

1. Васильева А.В. Отчёт о раскопках Гляденовского городища (костища) в 2019 г. Архив КАЭ ПГНИУ. Рукопись. Пермь, 2020. 301 с.
2. Васильева А.В., Коренюк С.Н., Перескоков М.Л. Основные итоги 120-летнего изучения Гляденовского городища-костища // Гляденовское городище-костище в контексте культур раннего железного века и эпохи великого переселения народов лесной полосы Евразии: сборник научных статей / отв. редакторы С.Н. Коренюк, М.Л. Перескоков; Пермский государственный национальный исследовательский университет. Пермь. 2021. С. 8–57.
3. Орлова Е.М. Археоботанические исследования Гляденовского городища // LIV УПАСК: Астрахань. АГУ. 2022. С. 164–165.
4. Орлова Е.М. Постройка из раскопа II 2005/2019 на нижней площадке Гляденовского городища // LI УПАСК: материалы Всерос. конф. Пермь. ПГНИУ, 2020. С. 200–202.

5. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020621543 Российская Федерация. База данных по непыльцевым палиноморфам: № 2020621419: заявл. 19.08.2020: опубл. 26.08.2020 / Е.С. Шумиловских, Л.С. Шумиловских; заявитель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Томский государственный университет». – EDN OZPXRT.
6. Postglacial history of East European boreal forests in the mid-Kama region, pre-Urals, Russia / L.S. Shumilovskikh, M. Schmidt, M. Pereskokov, P. Sannikov // *Boreas*. – 2020. – Vol. 49, No. 3. – P. 526–543. – DOI 10.1111/bor.12436. – EDN GXNYSX.

БИОРАЗНООБРАЗИЕ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ ООПТ «ВЕРХНЕКУРЬИНСКИЙ»

Пронина М.Д.¹, Злоказов К.И.¹, Селиванов А.Е.¹, Печенкина К.О.^{1,2}

¹ *Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия*

² *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

Аннотация. В статье представлены итоги изучения растительности и флористического состава особо охраняемой природной территории «Верхнекурьюинский». Приводится характеристика основных типов растительности, проведен таксономический, экологический и биоморфологический анализ флоры.

Ключевые слова: растительность, флора, «Верхнекурьюинский»

BIODIVERSITY OF VASCULAR PLANTS OF THE PROTECTED AREA «VERKHNEKURYINSKY»

Pronina M.D.¹, Zlokazov K.I.¹, Selivanov A.E.¹, Pechenkina K.O.^{1,2}

¹ *Perm State Humanitarian Pedagogical University, Perm, Russia*

² *Perm State National Research University, Perm, Russia*

Abstract. The article presents the results of a study of the vegetation and flora of the Verkhnekuryinsky protected natural area. The main types of vegetation are characterized, taxonomic, ecological and biomorphological analyzes of the flora are carried out.

Keywords: vegetation, flora, «Verkhnekuryinsky»

Охраняемый ландшафт «Верхнекурьюинский» расположен на правом берегу реки Кама города Перми в Ленинском и Дзержинском административных районах. Западная граница ООПТ проходит вдоль улицы Красноборская, южная – ул. Докучаева, восточная – ул. Профессора Дедюкина. Его общая площадь составляет 857 гектаров. Рельеф территории пологий с уклоном в сторону р. Кама, почвы преимущественно тяжелосуглинистые. Охраняемый ландшафт образован решением исполнительного комитета Пермского областного Совета народных депутатов от 12 декабря 1991 г. № 285 [1]. С момента образования предпринимались попытки изучения различных составляющих данного природного комплекса, в частности, агарикоидных базидиомицетов [5] и жесткокрылых [3]. Целенаправленного изучения сосудистых растений не проводилось, что определило цель нашей работы – изучение биоразнообразия сосудистых растений ООПТ «Верхнекурьюинский».

Проведенную в ходе исследования работу можно разделить на два этапа. Первый этап, полевой, включал сбор образцов сосудистых растений маршрутным методом в течение вегетационных сезонов 2022–2023 годов. При сборе использовали общепринятую методику гербаризации. Всего было собрано 206 образцов.

Второй этап – камеральный, заключался в обработке собранного материала, проходившей в исследовательской лаборатории биоразнообразия и экологии растений и лишайнизированных грибов ПГГПУ. Для определения собранного материала использовался «Иллюстрированный определитель растений Пермского края» [2] и определитель-справочник «Деревья и кустарники Прикамья» [6], а также бинокулярный микроскоп МСП-1. Информация об образцах внесена в базу данных гербария ПГГПУ. Идентифицированные образцы хранятся в гербарии кафедры биологии и географии ПГГПУ (РПУ).

Растительный покров представлен преимущественно сосновыми лесами: сосняками-брусничниками, сосняками-черничниками со значительным участием ели сибирской в подросте, что говорит о восстановительной стадии сукцессии. Редким является сосняк сфагновый и лишайниковый. В северной части отмечен старовозрастный ельник-зеленомошник, в центральной части имеются участки смешанных лесов, древесный ярус которых сформирован *Pinus sylvestris* L., *Betula pendula* Roth, *Picea obovata* Ledeb., *Abies sibirica* Ledeb., *Populus tremula* L. и *Tilia cordata* Mill. В разреженном подлеске встречается *Sorbus aucuparia* L. и *Padus avium* Mill. Кустарниковый ярус слабо выражен и представлен в основном *Rubus idaeus* L., *Viburnum opulus* L., *Lonicera xylosteum* L., *Sambucus sibirica* Nakai. В травяно-моховом ярусе преобладают: *Linnaea borealis* L., *Vaccinium myrtillus* L., *Vaccinium vitis-idaea* L., *Trientalis europaea* L., *Calamagrostis arundinacea* (L.) Roth, *Oxalis acetosella* L.

В северо-восточной части ООПТ, где находится периодически пересыхающий водоем, обнаружены виды растений влажных и сырых местообитаний: *Ranunculus repens* L., *Caltha palustris* L., *Typha latifolia* L., *Alisma plantago-aquatica* L., *Calla palustris* L.

В границах ООПТ представлены сорно-рудеральные виды растений, произрастающие вдоль дорог и тропинок, на опушках лесов. Среди них наиболее часто встречающиеся – *Plantago major* L., *Taraxacum officinale* F.H. Wigg., *Arctium tomentosum* Mill., *Cirsium setosum* (Willd.) Besser, *Artemisia vulgaris* L., *A. absinthium* L., *Lactuca tatarica* (L.) C.A. Mey. Местами растительный покров разрушен, что обусловлено вытаптыванием территории, замусориванием, наличием костровищ. Интересной особенностью является присутствие культурных декоративных видов вдали от жилых домов: *Petunia×hybrida* (Hook.) Vilm., *Narcissus* sp.

На территории ООПТ обнаружен 171 вид сосудистых растений, относящихся к 125 родам и 48 семействам.

Основу флоры охраняемой территории составляет отдел покрытосеменные (*Magnoliophyta*) – 164 вида, среди них преобладают представители класса двудольные. Обнаружены редкие растения, занесенные в приложение Красной книги Пермского края [4], *Platanthera bifolia* (L.) Rich., *Pulsatilla patens* (L.) Mill., *Sparganium glomeratum* (Laest.) Neuman, *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv.

Доля десяти ведущих семейств составляет 56,7% от общего количества видов во флоре ООПТ. Среди них доминирующими являются семейства: *Asteraceae* (26 видов), *Poaceae* (16 видов), *Fabaceae* (11 видов), *Ranunculaceae* (9 видов), *Rosaceae* (8 видов).

Доминирующей экологической группой являются мезофиты – 150 видов (87,7%), незначительную долю составляют гигрофиты (1%).

В ходе биоморфологического анализа было отмечено преобладание гемикриптофитов – 97 видов (56,7% от общего количества видов), что характеризует данную флору как умеренно-холодную голарктическую.

На территории охраняемого ландшафта в 2015 г. Пермским городским лесничеством обустроена экологическая тропа «Пролетарская». На ней расположены 8 аншлагов (1 – карта маршрута и 7 стендов с информацией о птицах и редких растениях). На тропе установлены

указатели, оборудованы места для отдыха, однако присутствуют несанкционированные свалки мусора.

Таким образом, выделение ООПТ является не только необходимым условием для сохранения биоразнообразия, но и инструментом экологического просвещения. Данная территория представляет большой научный интерес, так как призвана сохранять эталонный реликтовый сосняк. Так же следует отметить, что исследования, проведенные нами, являются предварительными, а территория охраняемого ландшафта нуждается в дальнейшем изучении и регулировании антропогенной нагрузки.

Библиографический список

1. Атлас особо охраняемых природных территорий Пермского края / под ред. С.А. Бузмакова. – Пермь: Астер, 2017. – 512 с.
2. Иллюстрированный определитель растений Пермского края / С.А. Овеснов, Е.Г. Ефимик, Т.В. Козьминых и др.; под ред. С.А. Овеснова. – Пермь: Кн. мир, 2007. – 743 с.
3. Козьминых В.О. Жесткокрылые (*Insecta, Coleoptera*) охраняемого природного ландшафта «Верхнекурьинский» (Пермь) // Приволжский научный вестник. – 2014. – №3-1 (31). – С. 5–10.
4. Красная книга Пермского края / под общ. ред. М.А. Бакланова. – Пермь: Алдари, 2018. – 232 с.
5. Шилкова Т.А., Переведенцева Л.Г. Агарикоидные базидиомицеты Верхнекурьинского природного ландшафта местного значения (г. Пермь) // Вестник Удмуртского ун-та. Сер. 6. Биология. Науки о Земле. – 2012. – № 4. – С. 47–51.
6. Шкараба Е.М. Деревья и кустарники Прикамья: определитель-справочник. – Пермь: Кн. мир, 2003. – 184 с.

ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОЗИМЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ

Сырвачева Д.Н., Данилова М.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack ex A. Camus) обладает широким спектром применения как в пищевой, так и в сельскохозяйственной промышленности. Для изучения полиморфизма использован ISSR-метод выявления эффективных ISSR-праймеров (Inter Simple Sequence Repeats). Данный метод поможет лучше изучить геном тритикале. По результатам исследования пять самых эффективных праймеров: M1 (AC)8CG, M2 (AC)8CC, ISSR-8 (GAG)6C, ISSR-10 (ATG)7C, X10 (AGC)6C. Результаты исследования будут использованы для оценки разнообразия форм данной культуры.

Ключевые слова: маркеры; тритикале; ISSR-праймеры; ПЦР

IDENTIFICATION OF EFFECTIVE PRIMERS FOR WINTER TRITICALE VARIETIES

Syrvacheva D.N., Danilova M.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Triticale ($\times$ *Triticosecale* Wittm ex A. Camus) has a wide range of applications in both the food and agricultural industries. To study polymorphism, the ISSR method is used to identify effective ISSR primers (Inter Simple Sequence Repeats). This method will help to better study the triticale genome. According to the results of the study, the five most effective primers are: M1 (AC)8CG, M2 (AC)8CC, ISR-8 (GAG)6C, ISC-10 (AT)7C, X10 (AGC)6C. The results of the study will be used to assess the diversity of forms of this culture.

Keywords: markers; triticale; ISSR primers; PCR

Введение. Тритикале ($\times$ *Triticosecale* Wittmack ex A. Camus), вид злаков, выведенный путем скрещивания пшеницы (*Triticum aestivum* L.) и ржи (*Secale cereale* L.), был впервые описан в 19 веке. Выращивание зерна в широких масштабах в разных странах началось в 1950-х годах. В 1960-х годах были введены в культивирование первые коммерческие сорта [1]. Эта культура хорошо адаптирована к неблагоприятным условиям окружающей среды. Урожайность достигает до 10 т/га и выше, однако в целом по РФ средняя урожайность остается в пределах 2,5–2,7 т/га. Это свидетельствует о том, что генетический потенциал, заложенный в сорте, используется лишь на 25–30% [2].

В настоящее время эта культура широко используется в качестве альтернативы другим зерновым культурам, в основном пшенице, в качестве ценного источника кормов для скота. В последние годы интерес к производству тритикале возрос из-за его потенциала стать промышленной энергетической культурой. Экономическое значение тритикале подтверждается значительными посевными площадями в Европе, на долю которых приходится 90% мирового производства. Также характеризуется низкой генетической изменчивостью и высокой устойчивостью к грибковым заболеваниям, например, таким как листовая ржавчина (*Puccinia triticina* Eriks.). Это объясняется гибридным происхождением тритикале. Именно тритикале дает возможность другим зерновым культурам иммунитет к этим заболеваниям. Генетические методы защиты являются самыми экономически выгодными методами снижения потерь урожая из-за листовой ржавчины [3].

Тритикале обладает важными свойствами, отличающими его от пшеницы и ржи. Он объединяет в себе лучшие признаки и свойства обоих родительских родов: высокую продуктивность, устойчивость к вирусным и грибковым заболеваниям, повышенное содержание белка и лизина в зерне и зеленой массе, пониженную требовательность к плодородию почвы [4]. Зерно тритикале является источником ценных биологически активных компонентов. Он содержит фенольные кислоты (PAs) и липиды резорцина, компоненты с антиоксидантными и антибактериальными свойствами, которые повышают полезные свойства продуктов, приготовленных из этого злака [5].

Тритикале является источником пищи для человека, а также является кормом для домашнего скота. Например, из него получают выпасаемый или хранимый фураж, силос и зеленый корм. Эта культура в основном используется на фермах в качестве корма для свиней, домашней птицы и жвачных животных. Тритикале используется в различных пропорциях в рецептурах кормов для животных и может заменить кукурузу в кормах для свиней, кур, крупного рогатого скота и овец [6].

Потребление человеком незначительно, поскольку мука демонстрирует относительно низкую пригодность для приготовления хлеба из-за низкого содержания клейковины и высокой активности альфа-амилазы слабые хлебопекарные свойства препятствуют использованию этой культуры. Тем не менее, тритикале можно использовать для приготовления тортов, печенья и лапши или в пивоваренной промышленности. Недавно тритикале интенсивно исследовалось как потенциальная энергетическая культура [7].

Цель данной работы – подбор эффективных ISSR-праймеров для выявления генетического разнообразия сортов *× Triticosecale* для дальнейшего проведения молекулярно-генетических исследований.

Методы исследований. В июле 2023 года были собраны листья 3 зерновых сортов тритикале (Цикад 90, Форте, Сибард). У каждого сорта были выбраны по 3 делянки. Сбор был произведен на опытном поле Пермского НИИСХ. Для каждого сорта собрано по 60 подфлаговых листьев, по 20 с каждой делянки, с растений генеративного возраста. Сорт Цикад 90 отобран с делянок под номерами 11, 35, 59. Листья Сибард с 24, 48, 72. И, соответственно, Форте с делянок 13, 37 и 61. Для праймеров было использовано 10 проб ДНК. Всего было проанализировано 9 ISSR-праймеров. Олигонуклеотидные праймеры являются крайне важной составляющей ПЦР, потому что именно от них зависит специфичность и эффектив-

ность реакции, да и сама возможность протекания реакции при наличии всех остальных ингредиентов [8].

Выделение ДНК производили из сухих листьев методом СТАВ. Концентрацию и качество ДНК определяли стандартным методом в спектрофотометре NanoDrop 2000 («Thermo Scientific», USA) [9]. ПЦР проводили в термоциклере MJ Mini-Cycler (Bio-Rad, USA). Для каждого праймера опытным путем подбирали оптимальную температуру отжига. Она находится в диапазоне от 52 до 64 °С.

Амплификат разделяли при помощи электрофореза в горизонтальной камере Sub-Cell GT Horizontal Electrophoresis System (Bio-Rad, США) с добавлением бромистого этидия для подкрашивания продуктов [10]. Фотография агарозного геля производилась в ультрафиолетовом свете в системе гельдокументации Gel Doc XR (Bio-Rad, USA). Для определения длин использовалась программа Quantity One («Bio-Rad», USA). Руководствуясь выявлением максимального числа фрагментов, в том числе и полиморфных, отбирались самые эффективные праймеры.

Результаты исследований. Эффективность праймеров определялась в соответствии со шкалой, составленной С.В. Боронниковой и Р.Н. Календарем в 2007 г [11]. Пять баллов соответствуют высокой эффективности ISSR-праймеров. Этим требованиям отвечают из изученных 9 праймеров лишь три. Два праймера подходят под оценку «4». Они показали среднюю эффективность. Остальные ISSR-праймеры, получившие балл от 3 и ниже, являются непригодными из-за низкой эффективности. Результаты представлены в таблице.

Таблица – Праймеры, использованные для ISSR-анализа и их эффективность

Праймеры	Последовательность праймера	Эффективность праймера
X9	(ACC) ₆ G	1
X10	(AGC) ₆ C	5
X11	(AGC) ₆ G	3
ISSR-1	(AC) ₈ T	1
ISSR-8	(GAG) ₆ C	5
ISSR-10	(ATG) ₇ C	4
M1	(AC) ₈ CG	5
M2	(AC) ₈ CC	4
M27	(GA) ₈ C	2

В результате амплификации анализируемых праймеров были получены фрагменты ДНК молекулярной массой от 200 до 1300 п.н. Высокую эффективность (5) для изучаемых сортов зерновых × *Triticosecale* выявлены у праймеров: X10 (AGC)₆C, ISSR-8 (GAG)₆C, M1 (AC)₈CG. Они показали наибольшее число ярко выраженных амплифицированных фрагментов ДНК.

Ниже показатель эффективности, равный 4 баллам, был определен у праймеров ISSR-10 (ATG)₇C, M2 (AC)₈CC. Остальным, получившим 3 и ниже, оказались X9 (ACC)₆G, X11 (AGC)₆G, ISSR-1 (AC)₈T, M27 (GA)₈C – эти праймеры показали невысокую или низкую эффективность.

Таким образом, для молекулярно-генетических исследований изученных зерновых сортов $\times$ *Triticosecale* были выявлены 5 самых эффективных ISSR-праймеров: X10 (AGC)₆C, ISSR-8 (GAG)₆C, M1 (AC)₈CG, ISSR-10 (ATG)₇C, M2 (AC)₈CC.

При сравнении полученных данных с результатами исследования Ажимовой, Масленниковой и др. пришли к выводу, что лишь некоторые из тех праймеров, получившие высший (5) или средний (4) балл, совпали [12]. Таковыми оказались ISSR-10 (ATG)₇C, ISSR-8 (GAG)₆C. Такие результаты могут связаны с тем, что использованы не только зерновые сорта, но и кормовые. Также оценена эффективность лишь части праймеров. Из 22 праймеров, представленных в статье Ажимовой и др., исследованы лишь 9.

Заключение. Исходя из вышесказанного, определение высокоэффективных ISSR-праймеров для определения полиморфизма у зерновых сортов $\times$ *Triticosecale* является важным вкладом в изучение генетического разнообразия.

При проверке 9 праймеров – 5 доказали свою эффективность (X10 (AGC)₆C, ISSR-8 (GAG)₆C, M1 (AC)₈CG, ISSR-10 (ATG)₇C, M2 (AC)₈CC). Они пригодны для дальнейшего исследования.

Библиографический список

1. Możdżeń K, Barabasz-Krasny B, Zandi P. Effect of Long-Term of He-Ne Laser Light Irradiation on Selected Physiological Processes of Triticale. Plants (Basel, Switzerland). 2020.
2. Пономарев С.Н., Пономарева М.Л. Экологическая пластичность новых сортов тритикале в республике Татарстан // Тритикале Селекция, генетика, агротехника и технологии переработки сырья. Ростов-на-Дону. 2021. С. 77.
3. Skowrońska R, Mariańska M, Ulaszewski W, et al. Development of Triticale $\times$ Wheat Pre-breeding Germplasm With Loci for Slow-Rusting Resistance. Frontiers in Plant Science. 2020.
4. Муратов А.А. Продуктивность ярового тритикале в зависимости от фона минерального питания в условиях южной зоны Амурской области / А.А. Муратов // Агропромышленный комплекс: проблемы и перспективы развития: Материалы всероссийской научно-практической конференции. В 2 частях, Благовещенск, 21 апреля 2021 года / отв. редактор А.А. Муратов. Том Часть I. – Благовещенск: Дальневосточный государственный аграрный университет, 2021. – С. 88-92.
5. Kaszuba J, Kapusta I, Posadzka Z. Content of Phenolic Acids in the Grain of Selected Polish Triticale Cultivars and Its Products. Molecules (Basel, Switzerland). 2021.
6. Mohammadi Alagoz S, Hadi H, Toorchi M, et al. Morpho-physiological responses and growth indices of triticale to drought and salt stresses. Scientific Reports. 2023.
7. Moullet O., Díaz Bermúdez G, Fossati D, et al. Pyramiding wheat pre-harvest sprouting resistance genes in triticale breeding. Molecular Breeding: new Strategies in Plant Improvement. 2022.
8. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных). Уфа. 2016. С. 216.

9. Печенкина В.А., Вшивкова А.И., Тарбеев И.А., Вяткина Р.И., Марон К.А. Выявление эффективных праймеров для сортов озимой ржи *Secale cereale* L. // Аграрный научный журнал. 2023. № 6. С. 46–50.
10. Боне К.Д., Бочаркина Ю.В., Карлов Г.И., Разумова О.В. Использование межмикросателлитных маркеров для анализа полиморфизма облепихи крушиновидной (*Hippophaë rhamnoides* L.) Различного происхождения. Москва. 2020. С. 43–48.
11. 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.
12. Ажимова В.А., Масленникова А.П., Боронникова С.В., Данилова М.А., Майсак Г.П. Подбор эффективных ISSR-праймеров для озимых сортов тритикале // Симбиоз – Россия 2022. Сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов. Пермь. 2022. С. 405–408.

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ЭКОЛОГИЯ ПОЧВ

НЕКОТОРЫЕ ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ *AVENA SATIVA* L. ПРИ РАЗДЕЛЬНОМ И КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ NACL-ЗАСОЛЕНИЯ И pH-УРОВНЯ ПОЧВЫ

Жуланова Н.С., Бражкина Э.И., Четина О.А.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты исследований по содержанию пероксида и пролина в листьях *Avena sativa* L. при различном сочетании факторов засоления и pH почвы. Максимальное проявление окислительного стресса отмечено в вариантах опыта при pH почвы 7,3 с засолением и при pH 5,2 с засолением и без него. Увеличение уровня пролина зафиксировано на кислой и щелочной почве с засолением. Это, по-видимому, является проявлением адаптивной реакции в связи с осмопротекторной функцией пролина.

Ключевые слова: засоление, адаптация, пероксид, пролин

SOME RESPONSES OF *AVENA SATIVA* L. WITH SEPARATE AND COMBINED EFFECTS OF NACL-SALINIZATION AND PH-LEVEL OF THE SOIL

Zhulanova N.S., Brazhkina E.I., Chetina O.A.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The results of studies on the content of peroxide and proline in the leaves of *Avena sativa* L. are presented with a different combination of salinization factors and soil pH. The maximum manifestation of oxidative stress was observed in variants with salinization at soil pH 7.3 and at pH 5.2 with and without salinization. An increase in the level of proline was recorded on acidic and alkaline soil with salinization. This, apparently, is a manifestation of an adaptive reaction in connection with the osmoprotective function of proline.

Keywords: salinization, adaptation, peroxide, proline

Введение. Засоление почв является одним из важных абиотических факторов окружающей среды, который ограничивает рост и продуктивность растений, а также оно занимает одно из первых мест среди стрессовых факторов, ограничивающих мировое производство продуктов питания. Накопление солей в почвах часто сопровождается изменением pH почв в щелочную сторону, тогда как для большинства сельскохозяйственных культур, в особенности для молодых растений, требуется благоприятная среда близкая к 6,5 единицам. Техногенное засоление может сопровождаться кислой реакцией почвы, что обусловлено наличием свободных ионов водорода и алюминия [1].

Адаптация растений к засолению состоит не только в регуляции механизмов поддержания ионного и осмотического гомеостаза, но в сохранении определенного безопасного уровня АФК. Устойчивость растений в условиях солевого стресса связана с накоплением низкомолекулярных соединений, в том числе пролина, который обладает полифункциональным биологическим эффектом и проявляется в осморегуляторной, антиоксидантной, энергетической и других функциях, обеспечивающих поддержание клеточного гомеостаза и его переход в новое адаптивное состояние [2].

Таким образом, актуальность изучения механизмов адаптации растений к совместному воздействию засоления и кислотности / щелочности корневой среды, в том числе, с участием универсального осмопротектора – пролина, обусловлена тем, что эти факторы сочетаются в природных и техногенных почвах.

Объекты и методы. В качестве объекта исследования использовали овес посевной *Avena sativa* L., сорт Стайер. Растения выращивались в условиях модельного опыта в контейнерах с дерново-подзолистой почвой в различных сочетаниях pH-уровня и засоления. Исходная реакция почвы – 5,2 pH. Нейтральная среда (pH 7,3) создавалась добавлением CaCO_3 (доза извести рассчитана по результатам гидролитической кислотности), щелочная (pH 8,8) – добавлением Na_2CO_3 . Засоление NaCl 0,5% создавалось в %-ом отношении к сухому весу почвы. Контролем являлся вариант без засоления с pH 7,3.

Варианты опыта:

без засоления	с засолением
pH 5,2	pH 5,2+0,5% NaCl
pH 7,3	pH 7,3+0,5% NaCl
pH 8,8	pH 8,8+0,5% NaCl

Через 4 и 8 дней после появления всходов снимали растительный материал, который использовали для определения содержания перекиси и пролина. Общее содержание перекиси в листьях растений определяли по ферротииоцианатному методу [3], пролин – методом Бейтса [4].

Опыты проводили в трёхкратной биологической повторности, аналитическая повторность определения – трёхкратная. Полученные данные статистически обработаны с применением методов описательной статистики, критериев сдвига/положения для определения достоверности различий между вариантами. Значимыми считали различия между сравниваемыми величинами с доверительной вероятностью 95% и выше ($P \leq 0.05$).

Результаты и обсуждение. В условиях кислой реакции почвенной среды без засоления нами зафиксировано увеличение уровня перекиси в листьях овса на 33% через 4 суток и на 67% через 8 суток по сравнению с контролем (рис.1). На щелочном фоне через 4 дня значимых отличий с контролем не обнаружено, а через 8 дней отмечено снижение на 33%. В условиях засоления при разных уровнях pH достоверные различия с контролем по содержанию перекиси были обнаружены только во второй срок наблюдения: при pH 7,3 выше на 57%, при pH 5,2 выше на 60%, при pH 8,8 ниже на 50%.

На фоне кислой реакции среды с засолением через 4 суток содержание перекиси было ниже на 38%, чем в варианте pH 5,2 без засоления, а через 8 – не имело достоверных различий. В варианте опыта 8,8 pH + NaCl в первый срок наблюдений не отмечено достоверных

различий по сравнению с тем же вариантом рН, но без засоления, а через 8 суток количество перекиси снизилось на 25%.

По современным представлениям сверхпродукция активных форм кислорода (АФК), к которым относят и пероксид, не только отражает окислительный стресс, но может иметь сигнальное значение. С количеством пероксида водорода функционально связана активность антиоксидантов. При сочетании солевого и кислотного, а также солевого и щелочного стресса в растениях не наблюдали увеличения содержания перекиси относительно незасоленных вариантов с соответствующей рН. Вероятно, в этих сложных условиях усилена антиоксидантная защита растений, что препятствует повышению содержания перекиси [5–9].

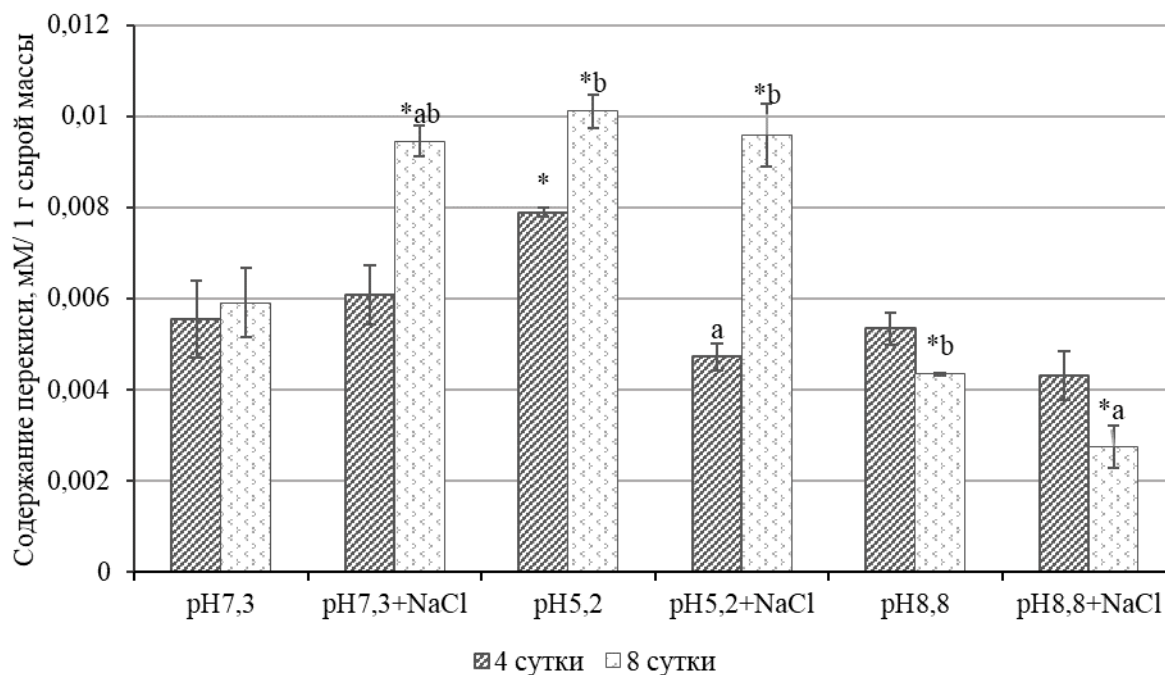


Рис. 1. Содержание перекиси в листьях овса посевного в условиях засоления и разного уровня рН почвы. Звездочкой отмечены значимые различия с контролем (рН 7,3) в каждый временной промежуток, а – значимые различия между засоленным и незасоленным вариантами при каждой рН в каждый временной промежуток, б – значимые различия между 4 и 8 сутками эксперимента в каждом варианте опыта.

Содержание пролина в варианте опыта рН 5,2 без засоления было меньше на 35% в сравнении с контролем в первый срок наблюдений и на 42% – во второй (рис. 2). На щелочном фоне без засоления уровень пролина был ниже на 43% через 4 дня после появления всходов и на 24% через 8 дней.

Засоление на нейтральной среде вызывало снижение количества пролина на 15% в первый срок наблюдений и увеличение на 6% – во второй. Содержание пролина на кислой почве с засолением увеличилось относительно варианта рН 5,2 без засоления на 23 и 65% в первый и второй сроки соответственно. Аналогичная картина наблюдалась на щелочном фоне: уровень пролина при засолении возрастал на 35% (4 день) и 64% (8 день) относительно незасоленной почвы с рН 8,8.

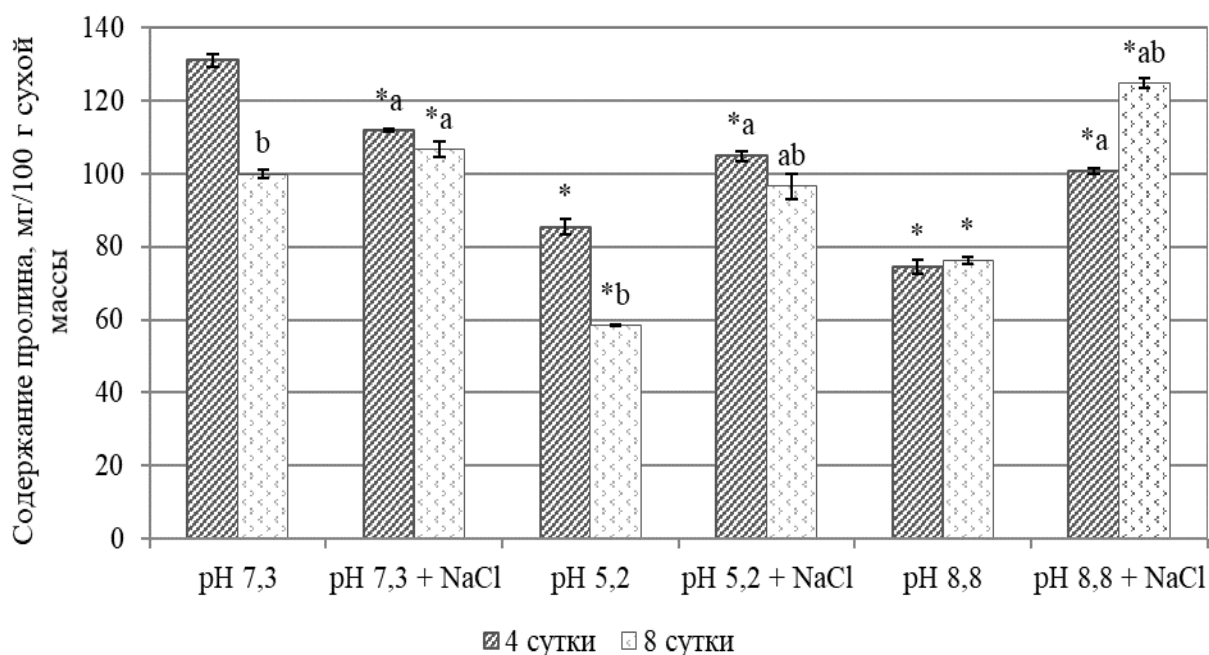


Рис. 2. Общее содержание пролина в надземной части овса посевного в условиях засоления и разного уровня pH почвы. Звездочкой отмечены значимые различия с контролем (pH 7,3) в каждый временной промежуток, а – значимые различия между засоленным и незасоленным вариантами при каждой pH в каждый временной промежуток, b – значимые различия между 4 и 8 сутками эксперимента в каждом варианте опыта.

Уровень пролина считается одним из признанных маркеров устойчивости растений. Аккумуляция пролина индуцируется в условиях стресса за счет, как увеличения синтеза, так и восстановления окисленной аминокислоты. Большая часть накопленного пролина в условиях стресса является результатом увеличения его синтеза из глутамата. При стрессе часто происходит уменьшение окисления пролина, что приводит к увеличению его уровня [10]. Снижение уровня пролина может указывать на повышенное его потребление [11]. Накопление пролина в листьях растений на кислой и щелочной почвах с засолением может быть направлено на поддержание осмотического потенциала и кислотно-щелочного баланса в клетках, на усиление антиоксидантной активности [12].

Заключение. Таким образом, засоление на нейтральной и кислой почве, а также реакция почвенной среды 5,2 без засоления вызывали увеличение уровня пероксида в листьях овса. На щелочном фоне, как с засолением, так и без него, уровень перекиси был ниже контрольного, что, вероятно, связано с эффективной работой антиоксидантной системы.

Засоление на кислой и щелочной среде сопровождалось накоплением пролина относительно тех же вариантов pH почвы без засоления. Скорее всего, данная реакция имеет адаптивный характер, т.к. аккумуляция пролина связана с осмопротекторными функциями этой аминокислоты.

При выращивании овса на кислой и щелочной почве наблюдалось снижение количества пролина относительно варианта с нейтральной средой; следовательно, значение этого многофункционального протектора в адаптации овса посевного к отдельному действию неблагоприятной почвенной pH не прослежено.

Библиографический список

1. 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.
2. 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. Серия: Биология. 2019. № 3. С. 345–352.
3. Sagisaka S. The occurrence of peroxide in a perennial plant *Populus gelrica* // Plant Physiol. 1976. Vol. 57. P. 308.
4. Bates L. S., Waidren R. P., Tear J. D. Rapid determination of free proline for water stress studies // Plant and soil. 1973. Vol. 39, № 1. P. 205.
5. Demidchik V. // Environ. Exp. Bot. 2015. Vol. 109. P. 212–228.
6. Noctor G., Lelarge-Trouverie C., Mhamdi A. // Phytochemistry. 2015. Vol. 112. P. 33–53.
7. Guo R., Yang Z., Li F., Yan C., Zhong X., Liu Q., Xia X., Li H., Zhao L. // BMC Plant Biol. 2015. P. 170–175.
8. Прадедова Е.В., Нимаева О.Д., Саляев Р.К. // Физиология растений. 2017. Т. 64. №6. С. 433–445.
9. Четина О.А., Боталова К.И., Мошева В.А., Лучникова К.И. Изменение активности каталазы и пероксидаз в листьях овса посевного под влиянием отдельного и комбинированного воздействия засоления и pH-уровня корневой среды // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2018. № 4. С. 423–429.
10. Радюкина Н.Л. Функционирование компонентов антиоксидантной системы дикорастущих видов растений при кратковременном действии стрессоров: автореф. дис. док. био. наук. Москва, 2015. 48 с.
11. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И., Тищенко Е.Н. Содержание свободного пролина как показатель жизнедеятельности клеточной культуры *Nicotiana tabacum* L. при стрессе // Биотехнология. 2011. Т. 4. №4. С. 87–94.
12. Четина О.А., Еремченко О.З., Пахоруков И.В. Накопление низкомолекулярных соединений как ответная реакция растений на техногенное засоление // Экология. 2023. № 2. С. 94–102.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПОДВИЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА В СОВРЕМЕННЫХ И ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВАХ Г. ПЕРМИ ПО МЕТОДАМ ЧИРИКОВА И МАЧИГИНА

Заякина А.Э., Коробейников И.А., Лыкасова Ю.П., Москвина Н.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Значительное варьирование содержания карбонатов и реакции среды в профилях городских почв, особенно сформированных на разновозрастных культурных слоях, вызывает затруднение при выборе метода определения содержания подвижного фосфора. Определение содержания подвижных фосфатов в вытяжках по Чирикову и Мачигину показало, что современные и погребенные городские почвы имеют высокую и очень высокую степень обеспеченности подвижным фосфором. Для анализа предпочтительнее использовать метод Мачигина.

Ключевые слова: городские почвы, подвижные фосфаты, культурный слой, погребенные почвы

DETERMINATION OF THE CONTENT OF MOBILE PHOSPHORUS COMPOUNDS IN MODERN AND BURIED SOILS OF PERM BY THE METHODS OF CHIRIKOV AND MACHIGIN

Zayakina A.E., Korobeinikov I.A., Lykasova Y.P., Moskvina N.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Significant variations in the content of carbonates and water pH in urban soil profiles, especially those formed on cultural layers of different ages, cause difficulty in choosing a method for determining the content of available phosphorus. Determination of the content of mobile phosphates in extracts according to Chirikov and Machigin showed that modern and buried urban soils have a high and very high degree of availability of mobile phosphorus. For analysis, it is preferable to use the Machigin method.

Keywords: urban soils, mobile phosphates, cultural layer, buried soils

Фосфор – типичный и важнейший органоген, с которым связаны энергетические процессы в организмах. Органические соединения фосфора представлены нуклеиновыми кислотами, фосфатидами и фитином, минеральные соединения – фосфорсодержащими минералами (фосфорит и апатит) и различными фосфатами (фосфаты полуторных окислов, кальция, магния, калия, натрия). В нейтральных и щелочных почвах преобладают фосфаты кальция, в кислых – фосфаты алюминия и железа.

Большая часть органических и минеральных соединений фосфора, находящихся в почве, нерастворима в воде и недоступна для растений; содержание воднорастворимых со-

единений фосфора в почве очень невелико, они быстро потребляются растениями и микроорганизмами [1].

Эффективное плодородие почв в отношении фосфатов определяется запасом подвижных форм фосфора. К этой группе относятся различные формы почвенных фосфатов, находящихся в динамическом равновесии «твердая фаза почвы – раствор». Переход фосфатов в почвенный раствор из твердой фазы почвы зависит от ряда факторов: запаса всех форм природных фосфатов в соединениях разной прочности; физико-химических и химических свойств данного типа почвы, ее биологической активности; условий, влияющих на процесс трансформации фосфатов (влажность, степень кислотности, катионный состав ППК и т.д) [2].

Для определения подвижных форм фосфора в почвах существуют различные методы, которые различаются, прежде всего, выбором реактива для получения вытяжки.

Для кислых почв Нечерноземной зоны стандартным считается метод Кирсанова, основанный на извлечении подвижных фосфатов из почвы 0,2 н раствором соляной кислоты. В вытяжку переходят преимущественно фосфаты кальция и магния, а также некоторая часть фосфатов полуторных окислов [1, 3].

Для серых лесных почв и некарбонатных черноземов принят стандартным метод Чирикова, основанный на извлечении подвижного фосфора 0,5 н раствором уксусной кислоты. В вытяжку переходят легкорастворимые фосфаты кальция, часть $AlPO_4$ и часть органических соединений фосфора [1, 4].

Для карбонатных черноземов, каштановых, бурых, коричневых почв и сероземов фосфаты определяют в вытяжке по Мачигину. Фосфаты извлекают из почвы 1%-м раствором углекислого аммония. В вытяжку переходят моно- и дифосфаты кальция, в небольшом количестве органические соединения фосфора и малорастворимого трифосфата кальция [1, 5].

Повышенное содержание подвижного фосфора – 100–200 мг/кг – является одним из диагностических признаков горизонта урбик (UR) городских почв. Превышение содержания обычно связано со скоплением специфических материалов культурного слоя, например, навоза или фекалий [6].

Проблема выбора метода определения содержания подвижных фосфатов в городских почвах связана с тем, что в пределах одного профиля может сильно варьировать реакция среды и содержание карбонатов. Например, в разрезе Горького КВ-21 содержание карбонатов составило от 0,1 до 1%, а pH изменяется от 5,91 до 6,75. Таким образом, для разных слоев в этом разрезе теоретически подходят методы Чирикова и Мачигина. В партии почвенных образцов для анализа встречаются как почвы, в которых лучше определять содержание фосфатов методом Чирикова, так и почвы, где больше подходит метод Мачигина. Возникает вопрос – сравнимы ли будут результаты, определенные разными методами?

Целью наших исследований было определение содержания подвижных форм фосфора в современных и погребенных почвах г. Перми в вытяжках по Чирикову и Мачигину.

Объектом исследования послужили пробы современных и погребенных почв г. Перми, взятые в центральной исторической части города. Содержание карбонатов в этих почвах варьировало в широких пределах – от 0,1 до 8,4%, коэффициент вариации – 115%. Реакция среды pH вод. была в пределах от 5,9 до 8,9, коэффициент вариации 9%.

В 34 пробах из 10 разрезов погребенных почв определили содержание подвижных фосфатов методами Чирикова и Мачигина. Также определили содержание подвижных фосфатов в 15 пробах из поверхностных слоев разных типов современных городских почв в вытяжке по Мачигину.

Содержание фосфора в погребенных почвах, определенное в вытяжке по Мачигину, составило от 12,6 до 41 мг/100 г (в среднем $26,9 \pm 1,32$ мг/100 г). Почвы имеют очень высокую степень обеспеченности доступными фосфатами [2]. В профилях изученных разрезов наиболее высоким содержанием подвижных фосфатов отличаются постагрогенные горизонты.

Содержание подвижных фосфатов в поверхностных слоях современных городских почв, определенное в вытяжке по Мачигину, варьировало в пределах от 5,7 до 15,4 мг/100 г, в среднем составило $7,84 \pm 1,19$ мг/100 г, однако эти значения достоверно ниже (критерий Крускала-Уоллеса), чем в погребенных почвах. Обеспеченность подвижными фосфатами поверхностных слоев современных городских почв была преимущественно высокой и очень высокой [2]. В свежих торфяных слоях квазиземов отмечено самое низкое содержание подвижных фосфатов – от 0,5 до 5,7 мг/100 г, что в среднем соответствует повышенной степени обеспеченности почвы фосфатами [2].

Содержание подвижных фосфатов в погребенных почвах, определенное в вытяжке по Чирикову, составило от 0,93 до 208,5 мг/100 г (в среднем $38,17 \pm 7,18$ мг/100 г) с коэффициентом вариации 111%. Это в основном соответствует высокому и очень высокому уровню обеспеченности фосфором [2]. Максимальные значения (более 100 мг/100 г) были отмечены в постагрогенных горизонтах и слоях, где присутствовал навоз. Если исключить эти слои из общей выборки, то содержание фосфатов варьировало от 0,93 до 95,6 мг/100 г и составило в среднем $28,1 \pm 4,17$ мг/100 г. Очень низкое (0,93 мг/100 г) содержание фосфора было определено только в одном образце – из горизонта ВТ погребенной почвы, взятого с глубины 110–120 см и не имеющего признаков антропогенного воздействия.

В целом, между результатами определения содержания подвижных фосфатов в вытяжках по Чирикову и Мачигину нет существенных различий по критерию Крускала-Уоллеса ($p=0,69$). Обнаружена сильная прямая корреляция ($R=0,78$) между содержанием подвижных фосфатов в одном образце, но определенных в разных вытяжках. Обнаружена сильная прямая корреляция между содержанием карбонатов и содержанием фосфатов в вытяжке по Мачигину ($R=0,83$). Связь между pH, содержанием карбонатов и содержанием фосфатов в вытяжке по Чирикову оказалась слабой и недостоверной. Распределение данных было нормальным в вытяжке по Мачигину и с левой асимметрией – в вытяжке по Чирикову (рис.).

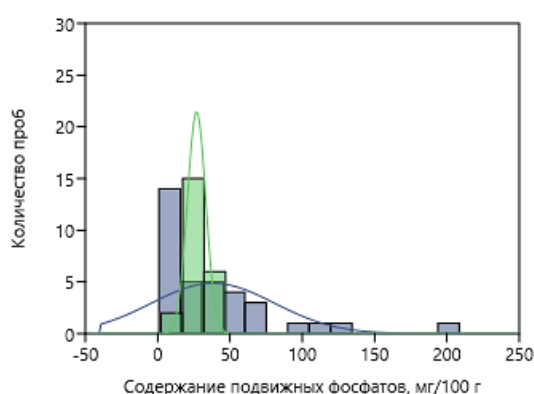


Рис. Гистограмма нормальности распределения данных по содержанию подвижного фосфора: зеленый цвет – в вытяжке по Мачигину, синий – по Чирикову

Тест на согласие распределений показал значимые различия между распределениями по критерию хи-квадрат.

В целом можно отметить, что определять содержание подвижных форм фосфора в профиле с карбонатными/некарбонатными слоями либо в партии образцов с разной реакцией среды и содержанием карбонатов можно и в вытяжке по Чирикову, и в вытяжке по Мачигину. Наши исследования показали, что нет достоверных различий в результатах определения подвижных фосфатов в этих вытяжках из одного образца почвы и есть прямая сильная корреляция. Однако все же предпочтительнее использовать вытяжку по Мачигину, т.к. большинство образцов городских почв содержат карбонаты, и часть кислоты в уксуснокислой вытяжке по Чирикову и солянокислой – по Кирсанову, может расходоваться на их нейтрализацию.

Сравнение между собой результатов определения фосфатов в вытяжках по Мачигину и Чирикову будет некорректным, поскольку они, по-видимому, извлекают разные формы фосфатов и результаты имеют разные диапазоны варьирования.

Оба метода позволили установить, что погребенные и современные городские почвы имеют высокую и очень высокую степень обеспеченности подвижными фосфатами.

Библиографический список

1. Аринушкина Е.В. Руководство по химическому анализу почв. Учебное пособие / Е.В. Аринушкина и др. // 2-е изд., испр. и доп. М., 1970. 487 с.
2. Минеев В.Г. Практикум по агрохимии: Учебное пособие / Под ред. академика РАСХН В.Г. Минеева // 2-е изд., перераб. и доп. М.: Изд-во МГУ, 2001. 689 с.
3. ГОСТ Р 54650-2011. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Кирсанова в модификации ЦИНАО.
4. ГОСТ 26204-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Чирикова в модификации ЦИНАО.
5. ГОСТ 26205-91. Почвы. Определение подвижных соединений фосфора и калия по методу Мачигина в модификации ЦИНАО.
6. Введение почв и почвоподобных образований городских территорий в классификацию почв России / Т.В. Прокофьева, М.И. Герасимова, О.С. Безуглова, К.А. Бахматова, А.А. Гольева, С.Н. Горбов, Е.А. Жарикова, Н.Н. Матинян, Е.Н. Наквасина, Н.Е. Сивцева // Почвоведение. – 2014. – № 10. – С. 1155–1164.

РАЗНООБРАЗИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ПОЧВ РАЙОНОВ МНОГОЭТАЖНОЙ ЗАСТРОЙКИ Г. ЧАЙКОВСКИЙ

Коровина Е.А., Мальцева А.Д.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Городские почвы – это изменённые или нарушенные человеком почвы, выполняющие важнейшие экологические функции. Установлено, что в районах многоэтажной застройки г. Чайковский на поверхности залегают органоминеральные или минеральные субстраты, выполняющие функции почв. Они характеризуются преимущественно легким гранулометрическим составом, нейтральной реакцией среды, содержанием органического углерода в пределах 1-3%.

Ключевые слова: городские почвы, классификация, свойства

DIVERSITY AND SOME PROPERTIES OF SOILS IN THE MULTI-STOREY DEVELOPMENT AREA OF TCHAIKOVSKY

Korovina E.A., Maltseva A.D.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. Urban soils are soils that have been altered or disturbed by humans and perform critical ecological functions. It was found that in areas of high-rise residential development in the city of Tchaikovsky, organomineral or mineral understratums that perform the functions of soils lie on the surface. They are characterized mainly by a light granulometric composition, a neutral reaction of the environment, and an organic carbon content in the range of 1-3%.

Keywords: urban soils, composition and properties

Городские почвы – это изменённые или нарушенные человеком почвы, выполняющие важнейшие экологические функции по формированию городской среды обитания. Современные города представляют собой сложные экосистемы, где ряд факторов, таких как антропогенное воздействие, транспортное движение, загрязнение окружающей среды и другие, существенно влияют на качество почв. Изучение городских почв является актуальной и важной задачей, поскольку здоровье людей, живущих в городах, напрямую зависит от качества городской среды, в том числе, от состояния почвенного покрова [1,2,3].

Город Чайковский находится на юго-западе Пермского края и построен в 1962 году вблизи Воткинской гидроэлектростанции. Город существует уже более полувека, однако остаются не исследованными биогеохимические составляющие среды обитания жителей, в том числе, городские почвы.

Цель данной работы – описать морфологическое разнообразие и основные свойства (гранулометрический состав, рН, органический углерод, присутствие карбонатов) почв районов многоэтажной застройки г. Чайковский.

В 2023 г. на 30 участках многоэтажной застройки г. Чайковский были описаны городские почвы и отобраны пробы по глубинам 0–15 см. В почвенных пробах определили содержание органического углерода по методу Тюрина, водородный показатель – потенциометрическим методом, гранулометрический состав – органолептическим методом, присутствие карбонатов – методом вскипания от соляной кислоты. На основе морфологического строения почв определили их положение в современных классификациях почв.

В районах многоэтажной застройки города преобладали урбанозёмы (рис.1, А). Эти почвы характеризуются отсутствием генетических горизонтов до глубины 0,5 м, обычно представлены культурными отложениями, состоящими из своеобразного пылевато-гумусного субстрата разной мощности и качества с примесью городского мусора [2].

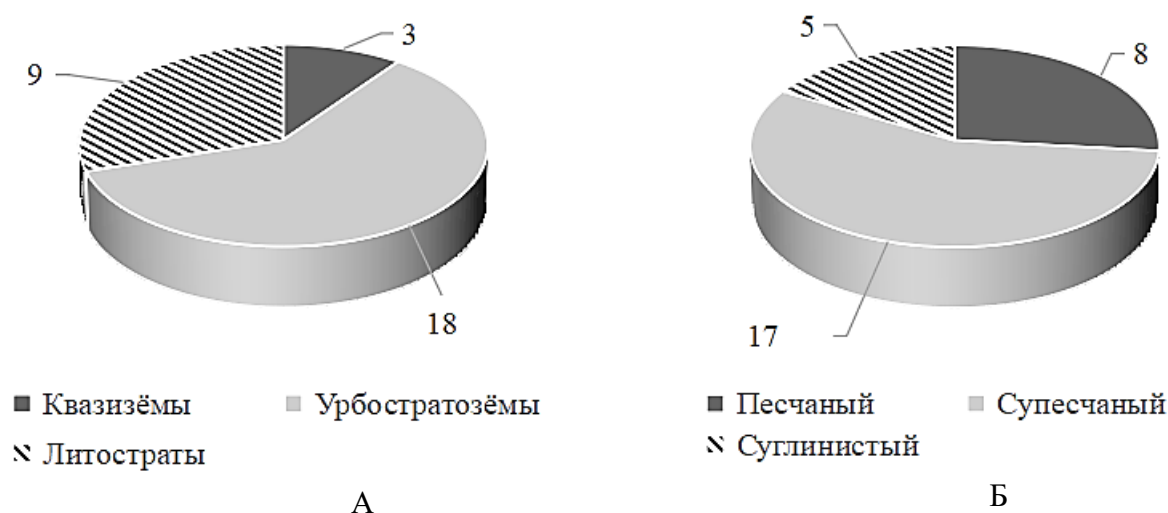


Рис. 1. Разнообразие почв (А) и их гранулометрический состав (Б) в районах многоэтажной застройки г. Чайковский

В меньшей степени распространены насыпные минеральные грунты на выравненных грунтовых площадках, созданных при строительстве зданий, сооружений, дорог. В соответствии с классификацией почвоподобных образований они относятся к литостратам [4]. Участие квазизёмов в почвенном покрове – наименьшее; эти почвоподобные гумусированные грунты сформированы путем отсыпки на поверхность торфокомпоста [2,3]. Органо–минеральный слой квазизёмов мощностью в несколько см подстилался негумусированным или менее гумусированным минеральным субстратом.

В районах многоэтажной застройки г. Чайковский преобладали почвы с супесчаным гранулометрическим составом (рис. 2). Значительно реже встречались почвы с суглинистым и песчаным гранулометрическим составом. Песчаные и супесчаные почвы обладают высокой водо- и воздухопроницаемостью, быстро оттаивают и прогреваются весной. Они бесструктурные, бедны гумусом и элементами минерального питания. Преобладание почв с легким гранулометрическим составом обусловлено расположением г. Чайковский на древне-аллювиальных песчаных отложениях террасы р. Камы [3]. Суглинистый гранулометрический

состав обеспечивает более благоприятный тепловой режим, а повышенная водопроницаемость суглинистых почв обеспечивает удаление избытка влаги из корнеобитаемого слоя [5]. Суглинистый состав почв г. Чайковский обусловлен, по-видимому, выносом на поверхность подстилающих пород.

Среди исследованных почв преобладали почвы с нейтральной реакцией среды (6,5–7,5 рН), благоприятной для развития растений. Отмечено присутствие почв с слабокислой (6,0–6,4 рН) и слабощелочной (7,5–8,2 рН) реакцией среды.

Большинство почв не содержали карбонаты. В некоторых почвах отмечено слабое вскипание от соляной кислоты; наблюдали и сильное вскипание почвенных проб, что указывает на значительное содержание карбонатов. Появление карбонатов в городских почвах связывают с карбонатностью строительных материалов и отсыпкой карбонатной щебенки на поверхности почвогрунтов [3].

В большей части верхних слоев почв содержание органического углерода варьирует в пределах 1–3%. Повышенное содержание органического углерода (>3%) обусловлено окультуриванием почв путем внесения торфокомпоста [2,3]. В наименьшей части почв содержание органического углерода было менее 1%, по-видимому, это литостраты выровненных строительных площадок.

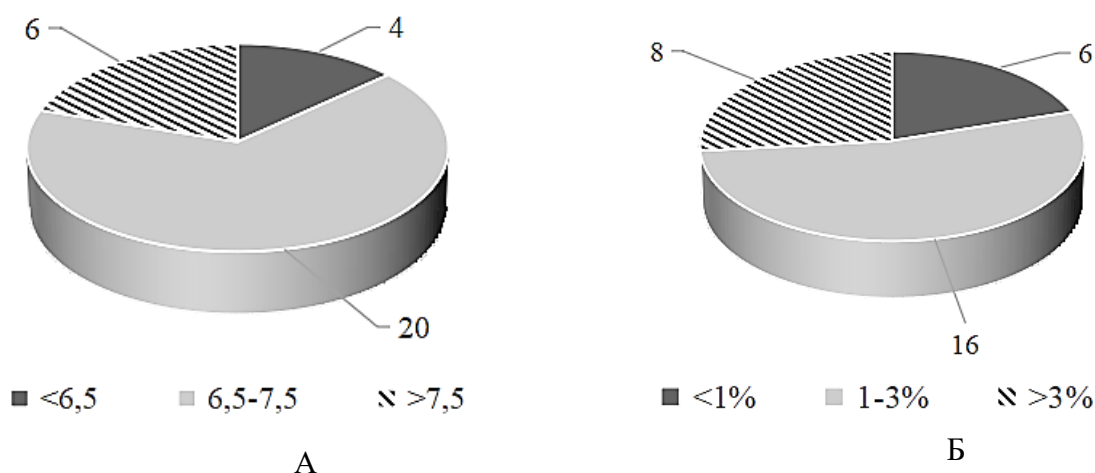


Рис. 2. Величина рН (А) и содержание органического углерода (Б) в почвах районов многоэтажной застройки г. Чайковский

На основании проведенных исследований можно утверждать, что в районах многоэтажной застройки г. Чайковский на поверхности залегают органо–минеральные и минеральные субстраты. По современным классификациям они относятся к урбостратозёмам, квазизёмам и литостратам. Они в основном некарбонатные или слабо карбонатные, характеризуются преимущественно легким гранулометрическим составом. Реакция почвенной среды варьирует в пределах 6,0–8,2 рН, чаще всего она близка к нейтральным значениям. Содержание органического углерода в органоминеральных слоях составляло преимущественно 1–3%, но встречались и минеральные почвы почти без органического вещества (менее 1%).

Библиографический список

1. Ковалева Г.В. и др. Почвы и техногенные поверхностные образования в городских ландшафтах. – Владивосток. – 2012. – 168 с.
2. Прокофьева Т.В. и др. Введение почв и почвоподобных образований в классификацию почв России // Почвоведение. – № 10. – 2014. – С. 1155–1164.
3. Еремченко О.З., Шестаков И.Е, Москвина Н.В. Почвы и техногенные поверхностные образования урбанизированных территорий Пермского Прикамья. – Пермь. – 2016. – С. 252.
4. Классификация и диагностика почв России. – Смоленск: Ойкумена. – 2004. – 342 с.
5. Агрофизические и агрохимические методы исследования почв: учебно-методическое пособие. – Краснодар. – 2016. – 65 с.

СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА В ФИТОМАССЕ ДЕНДРОФЛОРЫ В УСЛОВИЯХ АЭРОЗАГРЯЗНЕНИЯ Г. БРЯНСКА

Крохина В.А.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского, Брянск, Россия

Аннотация. Анализ результатов исследований показал, что содержание общего азота в листьях некоторых древесных растений в условиях загрязнения атмосферного воздуха г. Брянска достоверно выше контроля в 1,17–1,28 раза ($t_{\text{факт}} > t_{\text{табл}}$, $P=99\%$).

Ключевые слова: фитомасса, дендрофлора, аэрозагрязнение, биомониторинг

CONTENT OF TOTAL NITROGEN IN THE PHYTOMASS OF DENDROFLORA UNDER CONDITIONS OF AERO POLLUTION OF BRYANSK

Krokhina V.A.

Bryansk State University named after academician I.G. Petrovsky, Bryansk, Russia

Abstract. Analysis of the research results showed that the content of total nitrogen in the leaves of some woody plants under conditions of atmospheric air pollution in Bryansk was significantly higher than the control by 1.17–1.28 times ($t_{\text{fact}} > t_{\text{table}}$, $P=99\%$).

Keywords: phytomass, dendroflora, air pollution, biomonitoring

В рамках нацпроекта «Экология» подпрограмма «Чистый воздух» ставит одну из задач перед исследователями – разработка и внедрение экологически эффективных технологий ранней диагностики загрязнения ОС, чтобы оптимально обеспечить экологическую безопасность населения в условиях городской среды [6]. Многие исследователи указывают, что содержание общего азота в листьях разных видов растений адекватный биопараметр в оценке загрязнения атмосферного воздуха [1, 3, 4].

Цель НИР – проанализировать содержание общего азота в фитомассе дендрофлоры в условиях аэрозагрязнения г. Брянска в 2023 г. В работе использовали стандартные методики определения общего азота в листьях растений и все результаты исследований обработаны статистическими методами [2,5]. В таблице отражены результаты исследований по среднему значению содержания (СЗС) общего азота в фоліопробе пяти разных растений в условиях г. Брянска.

СЗС общего азота в фитомассе древесных растений на примере Советского района и контроля приведено на рис. 1. По степени уменьшения СЗС общего азота в фитомассе (на примере Советского района) составлен ряд чувствительности дендрофлоры к аэрозагрязнению: ель колючая < береза повислая < клен остролистный < липа сердцелистная < клен американский. Аналогичные закономерности отмечены для растений, произрастающих в других районах города (Володарском, Бежицком, Фокинском).

Таблица – СЗС общего азота в пробе фитомассы дендрофлоры в г. Брянске, 2023 г.

Название вида	СЗС азота (мг% /сыр. массу)		ДКУ
	контроль (пгт. Клетня)	опыт	
Советский район			
ель колючая	2,99±0,02	4,13±0,03	1,38
береза повислая	2,42±0,01	3,27±0,02	1,35
клен остролистный	2,16±0,03	2,85±0,02	1,32
липа сердцелистная	1,99±0,01	2,54±0,02	1,28
клен американский	1,85±0,01	2,29±0,01	1,24
Бежицкий район			
ель колючая	2,99±0,02	4,07±0,03	1,36
береза повислая	2,42±0,01	3,17±0,02	1,34
клен остролистный	2,16±0,03	2,79±0,02	1,29
липа сердцелистная	1,99±0,01	2,53±0,02	1,27
клен американский	1,85±0,01	2,28±0,01	1,23
Фокинский район			
ель колючая	2,99±0,02	3,98±0,03	1,39
береза повислая	2,42±0,01	3,14±0,02	1,30
клен остролистный	2,16±0,03	2,76±0,02	1,28
липа сердцелистная	1,99±0,01	2,49±0,01	1,25
клен американский	1,85±0,01	2,26±0,01	1,22
Володарский район			
ель колючая	2,99±0,02	3,89±0,03	1,31
береза повислая	2,42±0,01	3,10±0,02	1,28
клен остролистный	2,16±0,03	2,70±0,02	1,25
липа сердцелистная	1,99±0,01	2,53±0,02	1,27
клен американский	1,85±0,01	2,22±0,01	1,20

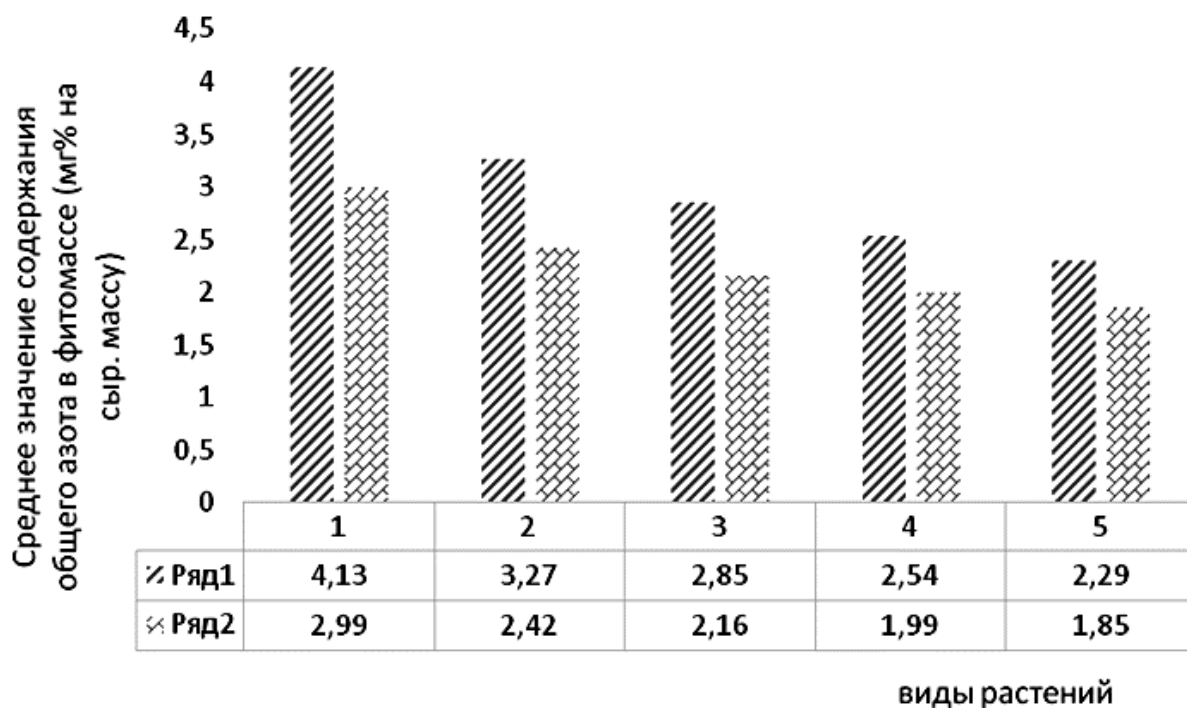


Рис. 1. СЗС общего азота в фитомассе растений в условиях Советского района

Примечание: **Ряд 1** (Советский район): 1. ель колючая; 2. береза повислая; 3. клён остролистный; 4. липа сердцелистная; 5. клен американский. **Ряд 2 (контроль- пгт. Клетня)**: 1. ель колючая; 2. береза повислая; 3. клён остролистный; 4. липа сердцелистная; 5. клен американский

Вероятно, первыми страдают от аэрозагрязнения хвойные растения, так как у них обнаружено самое высокое содержание общего азота в сравнении с контролем. Предполагаем, что это связано с тем что хвойные растения – это вечнозеленые растения и хвоя сменяется через 2–4 года. Однако каких-либо морфологических видимых нарушений не фиксировали, только превышение биохимических показателей.

Возможно, такое превышение без морфологических изменений объясняется тем, что на первых этапах загрязнения концентрация общего азота в листьях настолько мала, что не вызывает серьезных изменений в метаболических процессах клетки, и выражается лишь увеличением содержания данного вещества. В дальнейшем, в течение всего вегетационного периода растений концентрация общего азота будет усиливаться из-за эффекта аккумуляирования, физиологических особенностей растений, и в клетке возможно начнутся необратимые процессы разрушительного характера, что отразится на их морфологических показателях.

В условиях городской среды ряд исследователей неоднократно указывали на подобные эффекты в отношении многих загрязнителей атмосферного воздуха, поступающих в клетки разных растений [1, 3, 4].

В этой связи, данный показатель хорошо себя проявляет в начале вегетационного периода фитомассы.

ДКУ по СЗС общего азота дендрофлоры, произрастающей в 4 районах города приведены на рис. 2.

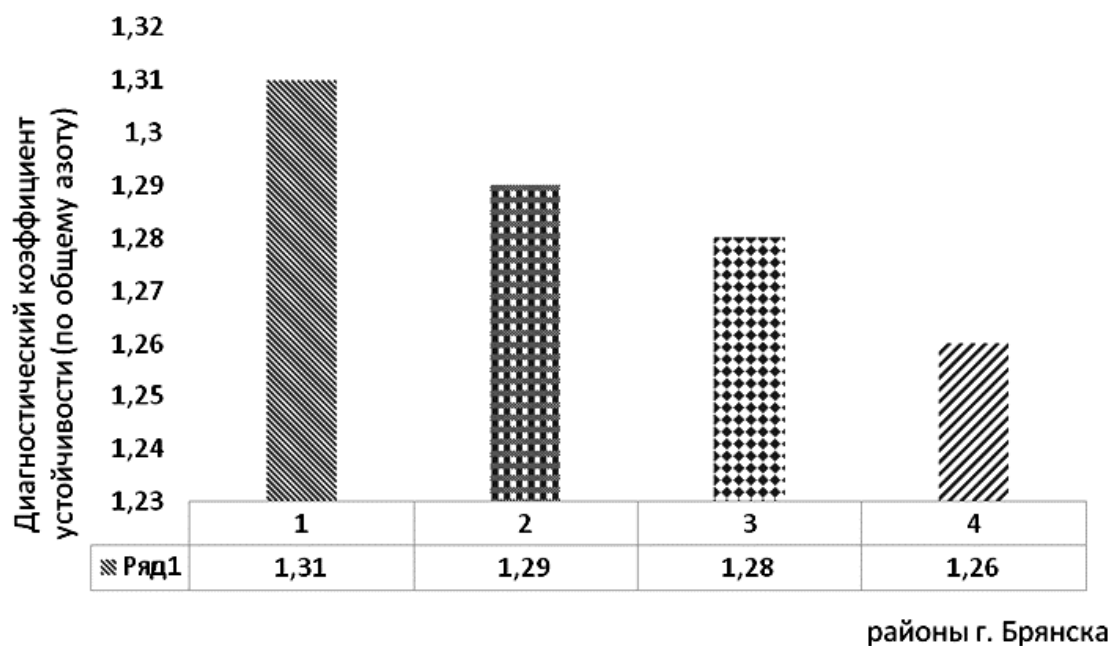


Рис. 2. СЗ ДКУ (общий азот) фитомассы растений в условиях г. Брянск.
Примечание: 1 – Советский, 2 – Бежицкий, 3 – Фокинский, 4- Володарский районы

По степени уменьшения ДКУ по СЗС общего азота в древесных растениях составлен ряд: Советский > Бежицкий > Фокинский > Володарский районы.

Полиномиальная регрессионная зависимость ДКУ растений (по общему азоту) и ИЗА в 4-х р-нах г. Брянска отмечена на рис. 3.

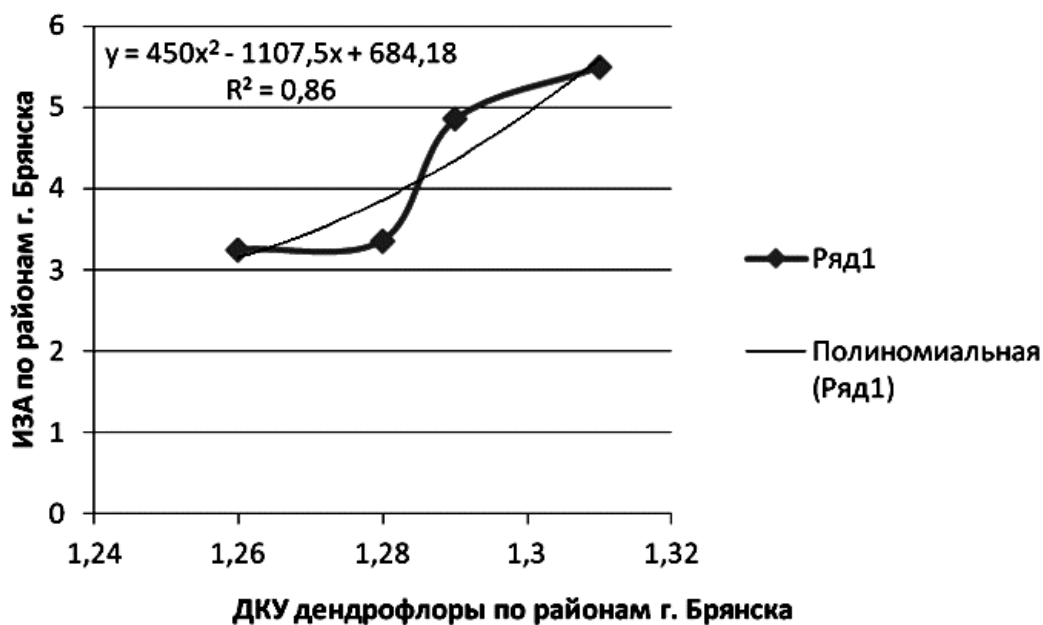


Рис. 3. Полиномиальная регрессионная зависимость ДКУ дендрофлоры (по общему азоту) и ИЗА в 4 р-нах г. Брянска

Между двумя этими параметрами выявлена положительная корреляционная связь ($r=+0.983$). Составлено уравнение регрессии: $y=450x^2-1107,5x+684,18$. Коэффициент аппроксимации ($R^2=0,86$) свидетельствует о достоверности, выявленной зависимости.

Анализ результатов исследований показал, что содержание общего азота в листьях некоторых древесных растений в 4-х районах г. Брянска достоверно выше контроля в 1,17-1,28 раза ($t_{\text{факт}} > t_{\text{табл}}$, $P=99\%$).

Данные исследования показывают, что ИЗА хорошо коррелирует с показателем содержание общего азота в листьях. Однако необходимо продолжить исследования в рамках НИР, чтобы подтвердить выявленные закономерности.

Библиографический список

1. Квеситадзе Г.И. Метаболизм антропогенных токсикантов в высших растениях / Г.И. Квеситадзе Г.А. Хатисашвили, Т.А. Садуншвили, З.Г. Евстигнеева. – М.: Наука, 2005. – 199с.
2. Методы биохимического исследования растений /под ред. А. И. Ермаков, В.В. Арасимович, М.И. Смирнова-Иконникова, И.К. Мурри. – М.: Из-во с/х литературы, 1952. – С. 55.
3. Неверова О.А. Древесные растения и урбанизированная среда / О.А. Неверова, Е.Ю. Колмогорова. //Экологические и биотехнологические аспекты. – Новосибирск: Наука, 2003. – С. 20–22.
4. Николаевский В.С. Биологические основы газоустойчивости растений /В.С. Николаевский. – Новосибирск: Наука, 1979. – 275 с.
5. Никифоренко Ю.Ю. Статистические методы в экологии и природопользовании: учебное пособие / Ю.Ю. Никифоренко. – Краснодар: КубГАУ, 2019. – 88 с.
6. Электрон. текст. дан. Режим доступа: <http://min.prirodyair.tilda.ws/> свободный

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ *TRITICOSECALE WITTM. & A.CAMUS*

Пестренин В.В., Боталова К.И.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Актуальность проблемы устойчивости растений к щелочной реакции корневой среды связана с распространенным последствие агрогенной и техногенной деятельности человека. Изучены ответные реакции *Triticosecale* на щелочной стресс, вызванный изменением pH корневой среды, изменение активности пероксидаз и каталазы.

Ключевые слова: пероксидаза, каталаза, антиоксиданты, щелочной стресс

DYNAMICS OF PEROXIDASE AND CATALASE ACTIVITY IN LEAVES *TRITICOSECALE WITTM. & A.CAMUS*

Pestrenin V.V., Botalova K.I.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The problem of plant resistance to the alkaline reaction of the root environment is associated with a widespread consequence of agrogenic and technogenic human activities. The responses of *Triticosecale* to alkaline stress caused by changes in the pH of the root environment and changes in the activity of peroxidases and catalase were studied.

Keywords: peroxidase, catalase, antioxidants, alkaline stress

Введение. Обилие стрессов окружающей среды приводит к образованию активных форм кислорода (АФК) и ограничивает продуктивность растений. Щелочная почвенная среда – неблагоприятный фактор для роста и развития растений. Щелочные почвы характерны для регионов с низким уровнем осадков и занимают около 30% земель. [1]. Актуальность проблемы устойчивости растений к щелочной реакции корневой среды связана с распространенным последствие агрогенной и техногенной деятельности человека.

В ходе метаболизма в клетках и тканях растений образуются активные формы кислорода, защита от которых осуществляется высокоактивной антиоксидантной системой. Избыточное производство АФК вызывает окислительное повреждение нуклеиновых кислот (ДНК и РНК), белков и липидов, тогда как при низкой концентрации АФК не являются вредными и оказывают положительное влияние, действуя в качестве вторичного посредника на пути передачи сигналов в клетках растений [2]. Возникшие в ходе эволюции антиоксиданты и ферменты антиоксидантной ингибируют зарождение цепей окисления путем нейтрализации супероксидного радикала и перекисных продуктов и ограничивают дальнейшее развитие цепных реакций, уменьшают цитотоксические эффекты АФК в клетках [3]. Одним из ключевых

ферментов антиоксидантной системы растений является пероксидаза, представляющая собой сложный белок-гликопротеид, содержащий в качестве простетической группы протопем [4]. Кроме того, данный фермент участвует в регуляции роста и развития растительных организмов, поскольку катализирует защитные реакции от повреждений различного типа, а также участвует в формировании клеточной стенки растений [5]. Каталаза катализирует образование H_2O при разрушении H_2O_2 и $ROOH$.

Цель нашей работы – изучить изменение активности пероксидаз и каталазы в листьях *Triticosecale* Wittm. & A. camus в ответ на действие щелочного стресса, вызванного изменением pH корневой среды. В задачи исследований входило изучить морфометрические показатели, определить динамику уровня пероксидазной и каталазной активности, а также содержание пероксида водорода в течении 48ч после внесения щелочного раствора в корневую среду (pH=9,8).

Объекты и методы. В качестве объекта исследования использовали тритикале (*Triticosecale* Wittm. & A. Camus) сорта Цикад 90. Растения выращивали на вермикулите в течение 7-ми дней, затем поливали боратным буфером (pH=9,8), изменяя pH корневой среды.

Высоту и массу растений измеряли в 30-кратной повторности; значимость различий между вариантами оценивали с помощью критерия Стьюдента ($P < 0,05$).

Активность каталазы, пероксидаз и пероксида измеряли через 0,5, 1, 2, 3, 4, 24 и 48 ч после воздействия стресс-фактора. Содержание пероксида определили ферротииоцианатным методом на фотоэлектроколориметре (“КФК-3”, Россия). Активность пероксидаз – по методу А.Н. Бояркина, который основан на определении скорости окисления бензидина до образования синего продукта окисления определенной концентрации, заранее устанавливаемой на фотоэлектроколориметре. Каталазную активность определили методом титрования [6]. Метод основан на определении количества пероксида водорода, расщепленного в процессе инкубации с ферментом. Количество H_2O_2 в реакционной смеси определяют титрованием в кислой среде раствором перманганата калия.

Результаты и обсуждение. Во все сроки измерения, после внесения щелочного буфера в корневую среду длина листьев тритикале снижалась, относительно длины растений в контрольном варианте (рис. 1).

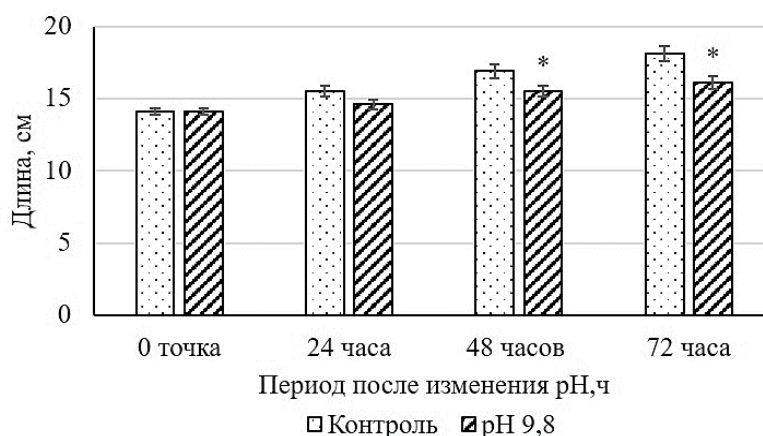


Рис. 1. Изменение длины надземной части тритикале при щелочном воздействии на корневую среду, * – значимые различия с растениями на нейтральной корневой среде, выявленные с помощью критерия Стьюдента при уровне $P < 0.05$

Также отмечено уменьшение массы после изменения pH корневой среды во все сроки измерения (рис. 2).

Данные изменения показателей высоты и массы при щелочном воздействии могут быть связаны с нарушением функции поглощения воды. Таким образом, результаты исследования показали, что в условиях щелочного стресса тритикале испытывает угнетение, которое выражается в уменьшении показателей длины и массы рассматриваемого объекта.



Рис. 2. Изменение массы надземной части тритикале при щелочном воздействии на корневую среду, * – значимые различия с растениями нейтральной корневой среды, выявленные с помощью критерия Стьюдента при уровне $P < 0.05$

В первые 30 минут наблюдений после внесения стрессового раствора в корневую среду, в листьях тритикале было отмечено снижение концентрации пероксида относительно контрольного варианта (рис. 3), что скорее всего является следствием активации защитных антиоксидантных механизмов, включающих в себя ферменты и низкомолекулярные антиоксиданты.

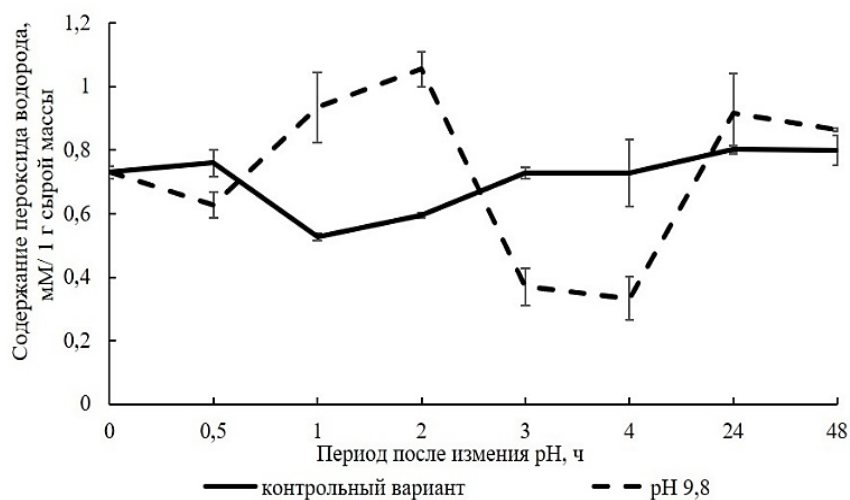


Рис. 3. Динамика содержания пероксида водорода в листьях тритикале при изменении pH корневой среды, мМ/г сырой массы

Спустя 1, 2, 24 и 48 ч после воздействия стрессора содержание пероксида водорода в условиях щелочной корневой среды было выше контрольного уровня. Вероятно, это обуславливается тем, что пероксид водорода несет также сигнальную функцию при окислительном стрессе, тем самым запуская каскад дополнительных защитных реакций для дальнейшей адаптации организма. При действии стрессоров АФК могут рассматриваться как вторичные посредники, вовлеченные в трансдукцию стрессового сигнала в геном клетки.

Повышение пероксидазной активности отмечается через 30 мин и 24 ч после щелочного воздействия на корневую среду (рис. 4). В первый срок измерения это, вероятно связано с тем, что ферментативная активность – это первая линия защитных механизмов. Усиление пероксидазной активности связывают с наличием запасного пула ферментов в мембранах и клеточных стенках листьев растений. При воздействии стрессовых факторов пероксидазы клеточной стенки могут легко отделяться и участвовать в редокс-регуляции. [7]. В последующие сроки активность пероксидазы в опытном варианте ниже контрольного. Понижение пероксидазной активности возможно является индикатором снижения уровня «стрессовости» условий жизни [8].

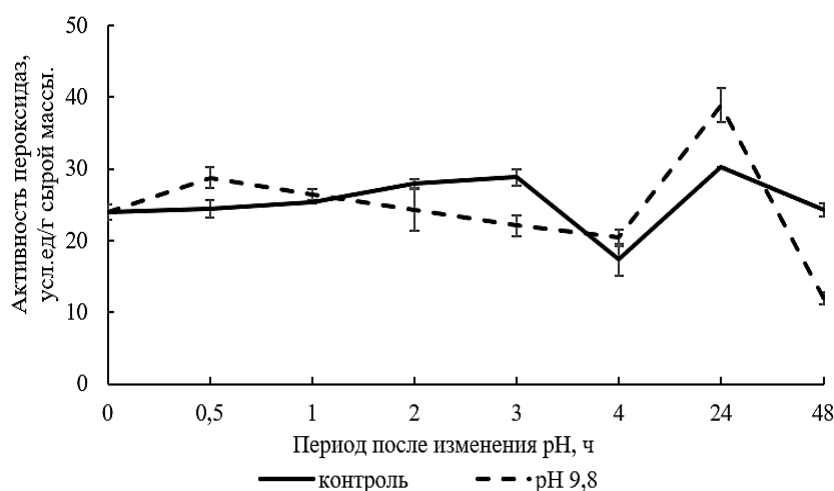


Рис. 4. Динамика активности пероксидаз в листьях тритикале при изменении pH корневой среды, условные единицы в сырой массе.

Ключевыми антиоксидантными ферментами, играющими первостепенную роль в защите клеток от избытка АФК, являются каталаза и супероксиддисмутаза, находящиеся в пероксисомах. Каталаза – маркерный фермент всех типов пероксисом [9]. Получены данные, что пероксисомные каталазы являются главными “уборщиками” H_2O_2 , контролирующими гомеостаз АФК у растений. Сообщалось [9], что она может играть важную роль в защите других ферментов и их продуктов от окислительного повреждения. Нами отмечен наибольший уровень активности каталазы спустя 30 минут после внесения щелочного раствора в качестве ответной реакции на окислительный стресс в листьях (Рис. 5), вызванный изменением pH корневой среды. В остальные же сроки наблюдения активность каталазы ниже, чем в контрольном варианте, вероятно т.к. в эти периоды времени значительная роль принадлежала другим антиоксидантам.

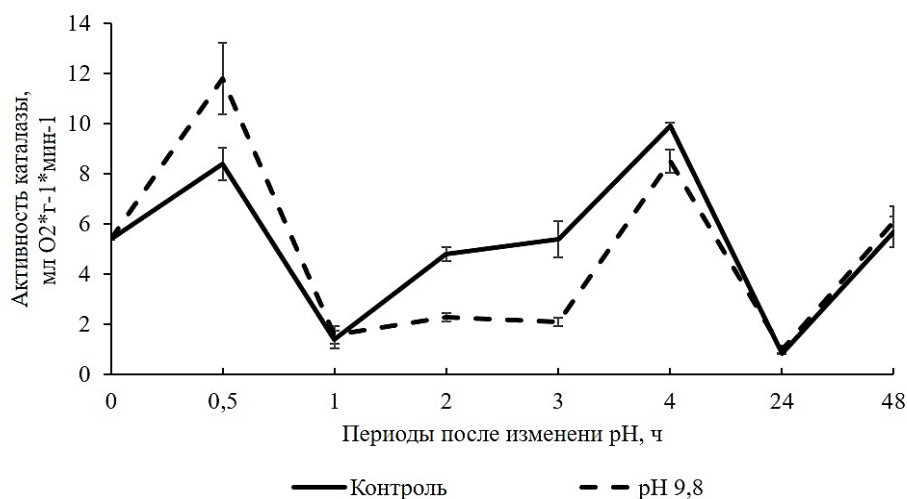


Рис. 5. Динамика активности каталазы в листьях тритикале при изменении pH корневой среды, условные единицы в сырой массе.

Закключение. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об угнетении *Triticosecale* под влиянием щелочного стресса, что проявлялось в снижении массы и длины надземных органов. При изменении pH корневой среды на щелочные растения испытывали окислительный стресс, концентрация пероксида водорода достоверно снижалась спустя 30 минут, 3, 4 часа после внесения буферного раствора, в остальные сроки было отмечено увеличение концентрации относительно контрольных значений. Активность пероксидаз и каталазы усиливалась спустя 30 минут после внесения щелочного раствора в корневую среду, в остальные сроки наблюдалось снижение активности данных ферментов.

Библиографический список

1. Merry R.H. Acidity and alkalinity of soils // In Environmental and Ecological Chemistry. - 2009. - V. 2. - P. 115–131.
2. Halliwell B., Gutteridge J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. Free Radical Biology and Medicine // – 2007. – Vol. 73(4). – P. 30–79.
3. Загоскина Н.В., Назаренко Л.В. Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений // Вестник МГПУ. Сер. Естественные науки. – 2016. – № 22. – С. 9–23.
4. Андреева В.А. Фермент пероксидаза. Участие в защитном механизме растений. М.: Наука, 1988. 129 с.
5. Рубин Б.А. Физиология и биохимия дыхания растений: учебное пособие. Москва: Мос. ун-т, 1974. 512 с.
6. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
7. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. // Физиология растений. – 2003. Т. 50. – № 3. – С. 459–464.
8. Рыктор И.А., Зубкова Ю.Н., Бутюгин А.В. Влияние буроугольных гуминовых удобрений на снижение стрессовой реакции у растений *festuca pratensis huds.* // Вестник Донецкого национального университета. – 2011. – №1. – С. 118.
9. Реунов А.В. Пероксисомы растений: роль в метаболизме активных форм кислорода и опосредованных ими процессах // Успехи современной биологии. – 2014. – С. 48–60.

ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В ТЕМНОГУМУСОВОЙ ПОЧВЕ

Сапцын Р.В., Лебедева Е.П.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В темногумусовой почве, рекультивируемой после нефтезагрязнения, изучили активность почвенных ферментов. Установлено, что содержание остаточных нефтепродуктов в почве положительно влияет на активность каталазы и уреазы. Одновременно между содержанием нефтепродуктов и активностью инвертазы проявилась отрицательная регрессионная зависимость, что указывает на подавление биохимической активности почвы под влиянием остаточных нефтепродуктов.

Ключевые слова: нефтезагрязнение почвы, активность ферментов

INFLUENCE OF OIL POLLUTION ON ENZYME ACTIVITY IN UMBRISOLS

Saptsyn R.V., Lebedeva E.P.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. In Umbrisols, reclaimed after oil pollution, the activity of soil enzymes was studied. It has been established that the content of residual petroleum products in the soil has a positive effect on the activity of catalase and urease. At the same time, a negative regression relationship appeared between the content of petroleum products and the activity of invertase, which indicates the suppression of the biochemical activity of the soil under the influence of residual petroleum products.

Keywords: oil pollution of soil, enzyme activity

Загрязнение нефтью влияет на экосистемы, изменяет растительность, животный мир и состояние почвы [1]. Активность почвенных ферментов используют как индикаторный показатель при оценке уровня плодородия, влияния эрозии, загрязнения почв пестицидами и нефтью, а также в оценке эффективности рекультивации нефтезагрязненных почв [2, 3, 4, 5]. Влияние нефти и нефтепродуктов на почвенные ферменты многостороннее: прямое – ингибирование, разрушение или активация ферментов, и косвенное – изменение ферментативного пула почвы в результате ингибирования роста почвенной мезофауны и растений [5, 6].

Цель данной работы – определить активность ферментов (каталазы, уреазы, инвертазы) в темногумусовой почве, рекультивируемой после нефтезагрязнения.

Объектом исследований была темногумусовая (дерново-карбонатная) почва, загрязненная нефтепродуктами в 2020 г., в результате аварии, вызванной несанкционированной врезкой в нефтепровод. На загрязненном участке с темногумусовой почвой удален поверхностный загрязненный слой; почва с остаточной нефтью была оставлена для «самоочищения» при периодическом рыхлении в течение вегетационных периодов 2021–2022 гг. Летом

2022 г. на рекультивированном участке отобраны почвенные пробы для определения остаточного содержания нефтепродуктов и изучения активности ферментов.

Содержание нефтепродуктов определяли по ПНД Ф 16.1:2.2.:2.3:3.64-10. Активность ферментов определили по Ф.Х. Хазиеву [7]. Влияние нефтезагрязнения на ферментативную активность почвы установили методом регрессионного анализа при уровне значимости $P < 0,05$.

Содержание остаточной нефти в почве колебалось в пределах 4–8 г/кг почвы и в несколько раз превышало норматив допустимого остаточного содержания нефтепродуктов для дерново-карбонатных почв Пермского края, который составляет 2,5 г/кг почвы [8].

Роль каталазы в почве заключается в том, что она разрушает ядовитый для растений пероксид водорода [7]. Предлагают использовать активность каталазы как показатель общей биологической активности почв с различной степенью загрязнения нефтепродуктами, так как она хорошо коррелирует с общей численностью микроорганизмов [9, 10]. В наших исследованиях установлена прямая зависимость между содержанием остаточных нефтепродуктов и активностью каталазы в почве (рис.1, А).

Уреаза катализирует гидролиз мочевины, относится в группе ферментов, участвующих в трансформации белков, аминокислот и других азотсодержащих органических соединений в почве [5, 7]. В темнугумусовой почве активность уреазы колебалась в пределах 0,4–1,1 мг N-NH₄ на 1 г почвы за 24 ч, что по шкале Д.Г. Звягинцева характеризует ее как бедную этим ферментом [11]. Одновременно прослежена прямая зависимость между содержанием остаточных нефтепродуктов и активностью уреазы (рис. 1, Б). В обзорной работе [4] указывают на разное влияние нефтяных углеводов на активность уреазы. В некоторых почвах на фоне среднего и иногда значительного нефтезагрязнения отмечали повышение активности уреазы.

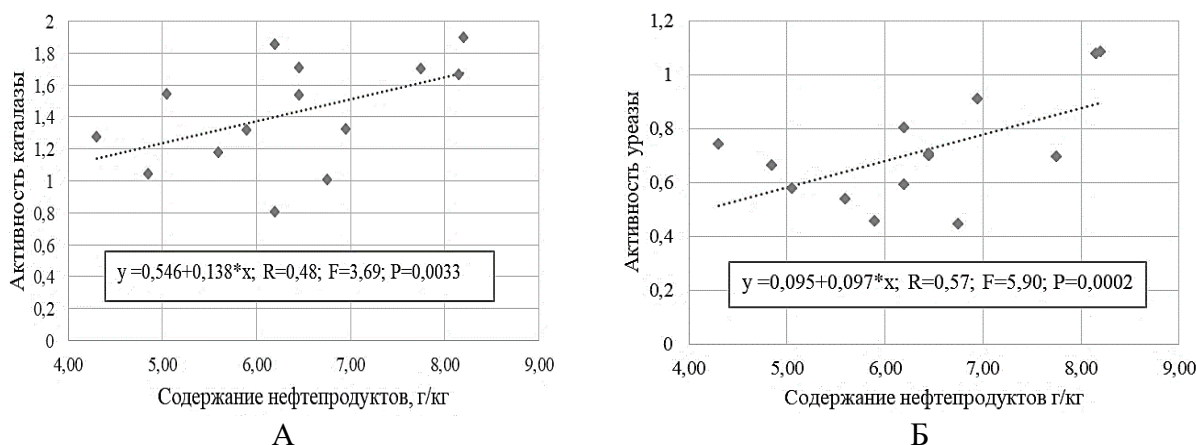


Рис. 1. Зависимость между активностью ферментов и содержанием в почве остаточных нефтепродуктов (г/кг): А – каталаза (мл 0,1 КМnO₄ на 10 г почвы за 20 мин), Б – уреазы (мг N-NH₄ на 1 г почвы за 24 ч)

Инвертазы относятся к обширной группе ферментов – гидролаз, участвующих в реакциях гидролитического распада высокомолекулярных органических соединений, обогащающих почвы питательными веществами [5, 7].

Активность фермента колебалась в пределах 3–13 мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч (рис. 2). По шкале Д.Г. Звягинцева [11] темнугумусовая почва бедна этим ферментом. По-

ступление нефти в почву, как правило, снижает активность гидролитических ферментов [4]. В темногомусовой почве остаточные нефтепродукты отрицательно повлияли на активность инвертазы, на что указывает обратная регрессионная зависимость между их содержанием и активностью фермента (рис. 2).

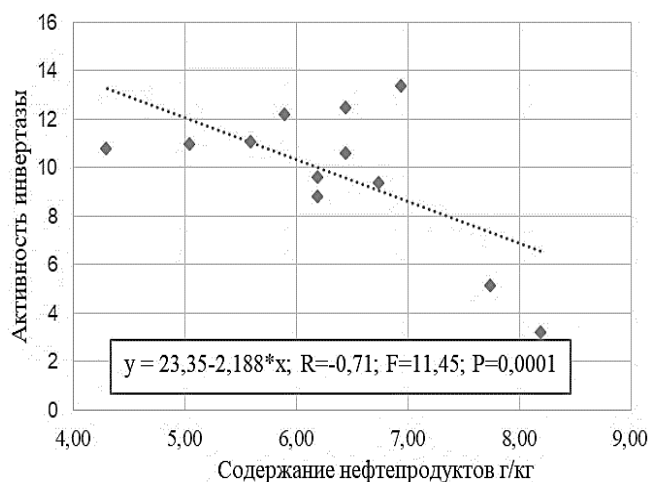


Рис. 2. Зависимость между активностью инвертазы (мг глюкозы на 1 г почвы за 24 ч) и содержанием в почве остаточных нефтепродуктов (г/кг)

Таким образом, результаты проведенных исследований указывают на то, что содержание остаточных нефтепродуктов в темногомусовой почве способствует повышению активности каталазы и уреазы. Одновременно нефтепродукты отрицательно влияли на активность инвертазы – фермента, гидролизующего сахарозу, рафинозу, генцианозу и стахиозу, а также катализирующего фруктотрансферазные реакции. Следовательно, остаточное нефтезагрязнение продолжает отрицательно воздействовать на биохимическую активность темногомусовой почвы, что нарушает процессы трансформации органического вещества.

Библиографический список

1. Polyak Y.M., Bakina L.G., Chugunova M.V., Mayachkina N.V., Gerasimov A.O., Bure V.M. Effect of remediation strategies on biological activity of oil-contaminated soil-A field study // *International Biodeterioration & Biodegradation*. – 2018. – № 126. – P. 57–68.
2. Шарапова И.Э., Гарабаджиу А.В. Оценка эффективности способов биоремедиации почв от нефтяных загрязнений // *Инженерная экология*. – 2015. – № 2. – С. 32-42.
3. Silva-Castro G.A., Uad I., Rodríguez-Calvo A., González-López J., Calvo C. Response of autochthonous microbiota of diesel polluted soils to land-farming treatments // *Environmental Research*. – 2015. – № 37. – P. 49–58.
4. Новоселова Е.И., Киреева Н.А. Ферментативная активность почв в условиях нефтяного загрязнения и её биодиагностическое значение // *Теоретические проблемы экологии*. – 2009. – №2. – С. 4–12.
5. Хазиев Ф.Х. Экологические связи ферментативной активности почв // *Экобиотех*. – 2018. – Т. 1. – № 2. – С. 80–92.
6. Исмаилов Н.М. Микробиология и ферментативная активность нефтезагрязнённых почв // *Восстановление нефтезагрязнённых почвенных экосистем*. – М.: Наука, 1988. – С. 42–57.
7. Хазиев Ф.Х. Методы почвенной энзимологии. – М.: Наука, 2005. – 252 с.

8. 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».
9. Алиев С.А., Гаджиев Д.А. Влияние загрязнения нефтяным органическим веществом на активность биологических процессов почв // Изв. АН АзССР. Сер. Биол. наук. – 1977. – № 2. – С. 46–49.
10. Щербакова Т.А. Ферментативная активность почв и трансформация органического вещества (в естественных и искусственных фитоценозах). – М.: Наука и техника, 1983. – 222 с.
11. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. – М.: МГУ, 1987. – 132 с.

ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ КРЕСС-САЛАТА НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ НЕФТЕПРОДУКТАМИ

Сапцын Р.В.¹, Смирнова А.А.²

¹ *Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия*

² *ПГНИУ, Лицей с углубленным изучением отдельных предметов, Пермь, Россия*

Аннотация. Загрязнение нефтью отрицательно влияет на способность почв выполнять экосистемные функции. При оценке почвенных загрязнений часто используют метод фитотестирования. Исследование посвящено изучению ответной реакции кресс-салата на загрязнение почвы сырой нефтью. При выращивании на нефтезагрязненной почве наблюдалось уменьшение высоты и длины надземной части кресс-салата, а также усиление редокс-активности.

Ключевые слова: фитотестирование, нефтезагрязнение, кресс-салат

RESPONSE OF CRESS TO SOIL POLLUTION BY PETROLEUM PRODUCTS

Saptsyn R.V.¹, Smirnova. A.A.²

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia*

² *Perm State University Lyceum with in-depth study of individual subjects, Perm, Russia*

Abstract. Oil pollution negatively affects the ability of soils to perform ecosystem functions. When assessing soil pollution, the phytotesting method is often used. The study examines the response of watercress to soil contamination by crude oil. When grown on oil-contaminated soil, a decrease in the height and length of the above-ground part of watercress was observed, as well as an increase in redox activity.

Keywords: phytotesting, oil pollution, watercress

Одной из острых глобальных экологических проблем стало загрязнение почв нефтью; разливы нефти на суше влияют на целые экосистемы, изменяя растительность, животный мир и общее эколого-биологическое состояние почвы [1.]. 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 [2.].

В условиях нефтезагрязнения растения являются чувствительными индикаторами уровня токсичности почвы [3.] [4.]. Считаем перспективным использование данного растения для оценки экологического состояния почв Пермского края при нефтезагрязнении.

Цель наших исследований – изучение ответных реакций кресс-салата на загрязнение почв нефтепродуктами.

Для эксперимента использовали пробы из верхней части дерново-подзолистой почвы мощностью около 15 см, которые загрязняли сырой нефтью. Известкование провели по величине гидролитической кислотности почвы. В почву вносили биопрепараты согласно инструкции производителя. Биопрепарат 1 – это комплексный препарат, обладающий свойствами регулятора роста, фунгицида, удобрения, рекомендован для ремедиации нефтезагрязненных почв. Биопрепарат 2 – микробиологический препарат, содержащий активные штаммы углеводородокисляющих бактерий.

Схема эксперимента: 1) контроль, 2) загрязнение нефтью в дозе 1% отвеса почвы, 3) загрязнение нефтью 3%, 4) известкованная почва + загрязнение нефтью 1%, 5) известкованная почва + загрязнение нефтью 3%, 6) загрязнение нефтью 1% + биопрепарат 1, 7) загрязнение нефтью 3% + биопрепарат 1, 8) загрязнение нефтью 1% + биопрепарат 2, 9) загрязнение нефтью 3% + биопрепарат 2. Варианты опыта заложены в двух-кратной повторности.

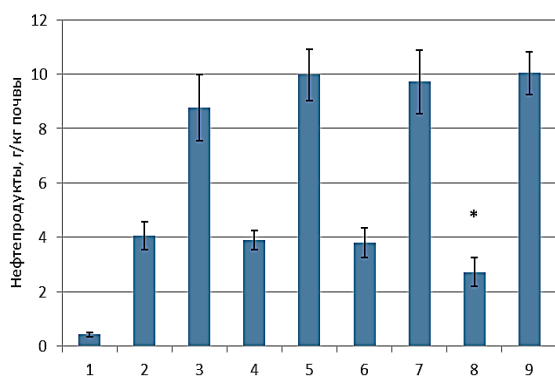
Образцы почвы весом 5 кг перемешали с известью, нефтью и биопрепаратами, поместили в сосуды с отверстиями для оттока избыточного количества дождевой воды. Сосуды с почвой прикопали на открытом воздухе. В течение летних месяцев почву несколько раз рыхлили. В начале сентября из каждого сосуда извлекли половину почвы, вторую половину оставили для последующих наблюдений.

Оценка фитотоксичности почвы проводилась по реакции кресс-салата, замеры длины и сырой массы надземной части растений проведены в 25-кратной повторности. Редокс-активность растительных вытяжек из кресс-салата изучали по методу Петта в модификации Прокашева в 6-кратной повторности; содержание водорастворимых белков определили с помощью красителя амидо-черного – в 6-кратной повторности.

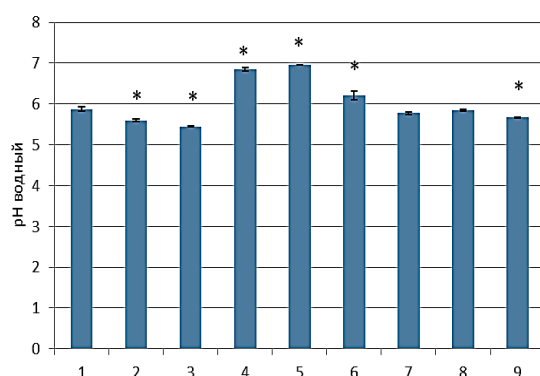
Данные эксперимента обработаны однофакторным дисперсионным непараметрическим методом (критерий Крускал-Уоллиса) при уровне значимости нулевой гипотезы $P < 0,05$. В рисунках приведены средние арифметические биологических повторностей и их стандартные ошибки.

Через 3 летних месяца в вариантах с внесением в почву 1% нефти в почве осталось около 0,5% нефтепродуктов, а при 3%-м загрязнении – около 1% остаточных нефтепродуктов. Применение биопрепаратов способствовало снижению содержания остаточной нефти только в варианте с 1%-м загрязнением и биопрепаратом 2 (рис. 1). Длина надземной части кресс-салата на нефтезагрязненных почвах была заметно ниже; в варианте с 1%-м загрязнением длина растений – на 20%, в варианте 3%-м загрязнением – на 37% ниже, чем на контроле (рис. 2).

Известкование почвы положительно повлияло на состояние растений, в варианте с 1%-м нефтезагрязнением длина растений не отличалась от контрольных значений. Положительное воздействие биопрепарата 1 на длину растений прослежено при 1% загрязнении. Биопрепарат 2 способствовал увеличению длины растений на 10% по сравнению с растениями в соответствующих загрязненных вариантах опыта.



(а)



(б)

Рис. 1. Содержание остаточных нефтепродуктов, г/кг почвы (а); реакция почвенной среды (б):

* значимые различия с контрольными значениями; 1) контроль; 2) нефтезагрязнение 1%; 3) нефтезагрязнение 3%; 4) известкование + нефтезагрязнение 1%; 5) известкование + нефтезагрязнение 3%; 6) нефтезагрязнение 1% + биопрепарат 1; 7) нефтезагрязнение 3% + биопрепарат 1; 8) нефтезагрязнение 1% + биопрепарат 2; 9) нефтезагрязнение 3% + биопрепарат 2.

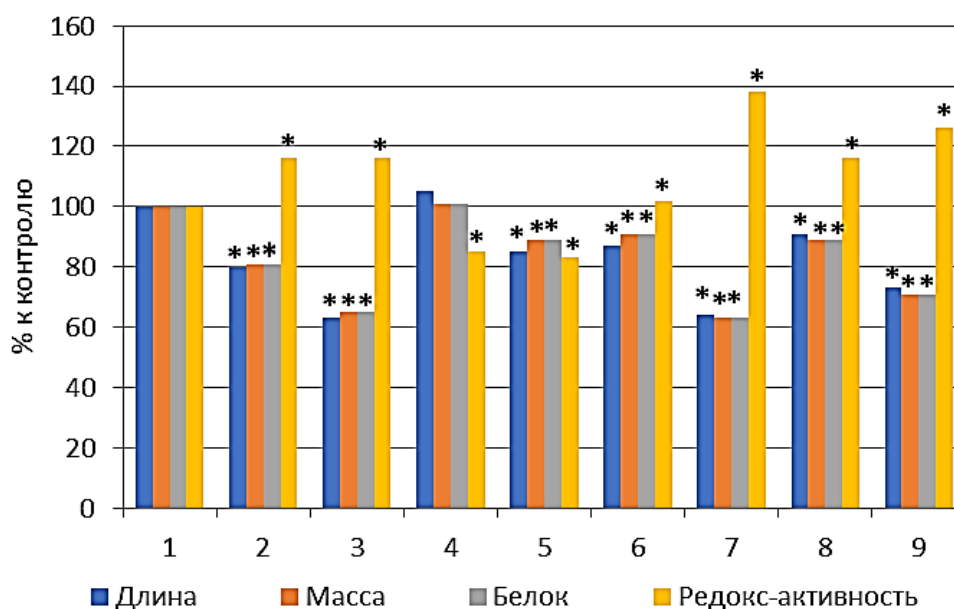


Рис. 2. Результаты фитотестирования почвы:

* значимые различия с контрольными значениями; 1) контроль; 2) нефтезагрязнение 1%; 3) нефтезагрязнение 3%; 4) известкование + нефтезагрязнение 1%; 5) известкование + нефтезагрязнение 3%; 6) нефтезагрязнение 1% + биопрепарат 1; 7) нефтезагрязнение 3% + биопрепарат 1; 8) нефтезагрязнение 1% + биопрепарат 2; 9) нефтезагрязнение 3% + биопрепарат 2.

Масса растений относительно повышена на известкованной нефтезагрязненной почве (рис. 2). Положительное влияние биопрепаратов было небольшим, прибавки массы не всегда были значимыми относительно растений на загрязненной почве без применения биопрепаратов.

По нашим данным нефтезагрязнение отрицательно повлияло на высоту, массу надземной части кресс-салата и на содержание в нем водорастворимых белков (рис. 2). На нефтезагрязненной почве кресс-салат характеризовался усиленной редокс-активностью; Сниженная редокс-активность отмечена на известкованной нефтезагрязненной почве, где растения, вероятно, испытывали наименьший окислительный стресс. В растениях на нефтеза-

грязненной почве содержание белка было ниже, чем в контрольных растениях, особенно, в вариантах с 3%-м нефтезагрязнением. Известкование не способствовало накоплению белков в кресс-салате. Нефтезагрязнение способствовало повышению редокс-активности растительных экстрактов; но в вариантах с известкованной почвой не отмечено усиления редокс-активности (рис. 2).

Результаты фитотестирования являются показательными индикаторами эколого-биологического состояния и уровня восстановления экологических функций нефтезагрязненной дерново-подзолистой почвы. Длина и масса надземной части кресс-салата, а также накопление в нем белков тесно коррелировали с содержанием остаточных нефтепродуктов в почве. Редокс-активность растительных экстрактов из кресс-салата следует применять в качестве показателя общей фитотоксичности почвы.

Библиографический список

1. Смирнова В.С., Пономаренко Е.В. Влияние нефтезагрязнений на почву и растения // Царскосельские чтения. – 2010. – С. 149–153.
2. 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.
3. 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.
4. Lisovitskaya O.V., Terekhova V.A. Phytotesting: basic approaches, problems of the laboratory method and modern solutions // *Doklady po ėkologiĉeskomu poĉvovedeniju*. – 2010. – № 1. – P. 13.

КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЯХ

Семерикова Д.М., Кайгородов Р.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Здоровье сельскохозяйственных животных и их продуктивность можно поддерживать только при условии удовлетворения физиологических потребностей во всех питательных и биологически активных веществах. Любое отклонение от нормы приводит к нарушению функций организма. Проблему повышения устойчивости и продуктивности сельскохозяйственных животных следует решать на основе кормовых ресурсов растительного происхождения и технологий кормопроизводства с включением в рацион биологически активных кормовых добавок естественного происхождения.

Ключевые слова: Фенольные вещества, качественный анализ, количественный анализ, биологически активные растения, кормовые растения

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE COMPOSITION OF PHENOLIC SUBSTANCES IN BIOLOGICALLY ACTIVE FEED PLANTS

Semerikova D.M., Kaigorodov R.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The animal's health can only be preserved provided that its physiological needs in all nutrient and biologically active substances are met. Any deviation from the norm leads to a violation of body functions. This problem should be solved on the basis of feed resources of plant origin and feed production technologies with the inclusion of biologically active feed additives in the diet.

Keywords: Phenolic substances, qualitative analysis, quantitative analysis, biologically active plants, feed plants

Проблему обеспечения животных энергией, питательными и биологически активными веществами следует решать комплексно: на основе кормовых ресурсов растительного происхождения и современных технологий кормопроизводства с включением в рацион биологически активных кормовых добавок. При организации кормовой базы для сельскохозяйственных и домашних животных особое внимание следует обращать на улучшение качества кормов, повышение в них содержания протеина, незаменимых аминокислот и биологически активных пищевых веществ [1]. В настоящее время ведется работа по замене синтетических комбикормов на натуральные источники биологически активных веществ, к которым относятся биологически активные корма [2]. Биологически активные травы используются в сельском хозяйстве для повышения устойчивости сельскохозяйственных животных к неблагоприятным факторам, а также повышения качества и количества продукции. В составе биоло-

гических активных кормов важнейшую роль играют фенольные соединения. Фенольные соединения обладают рядом функциональных свойств: антиоксидантные, антибактериальные, противовоспалительные и другие, что может благоприятно отразиться на состоянии животных и их продуктивность [3]. Цель исследований – изучить качественный состав и содержание фенольных веществ в разных частях растений из группы биологически активных кормовых трав. Объектами исследований послужили: астрагал датский (*Astragalus danicus* Retz.), клевер открытозевый (*Trifolium apertum* Bobr.), козлятник восточный (*Galega orientalis* Lam.), люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), левзея сафлоровидная (*Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin.), эспарцет песчаный (*Onobrychis arenaria* (Kit.) DC.). Экстракцию фенольных веществ проводили в высушенных до воздушно-сухого состояния образцах растений 70%-ным этанолом на водяной бане в при 60 оС в течение 1 ч. Суммарное содержание фенольных соединений в эквиваленте галловой кислоты проводили по модифицированному методу Фолина-Чокальтеу. Суммарное содержание флавоноидов в эквиваленте кверцетина: с полученными экстрактами проводили качественную реакцию на флавоноиды с 5%-м спиртовым раствором хлорида алюминия (III), оптическую плотность окрашенных растворов (желто-зеленый цвет) определяли на спектрофотометре СФ-2000 в видимой области спектра при длине волны 425 нм [4]. Содержание фенольных веществ (галловая, кофейная, феруловая кислоты и рутин, дигидрокверцетин, кверцетин) анализировали методом обращено-фазной высоко эффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией (ОФ ВЭЖХ УФ) на приборе Dionex, Ultimate 3000. Тип колонки: Polar Advantage II C18 2.1×150 мм, 3 мкм, 120 Å. Подвижная фаза: элюент А – фосфатный буфер рН 2,5, 20 мМ, элюент Б – ацетонитрил ОСЧ сорт 0, режим – градиентный. Детекция при длине волны 263 нм. В таблице 1 представлены данные по содержанию суммы фенольных веществ и флавоноидов в разных частях кормовых растений.

Таблица 1 – Содержание суммы фенольных веществ и флавоноидов в разных частях кормовых растений

Объект	Сумма фенольных соединений, %	Сумма флавоноидов, %
Астрагал датский (надземная часть)	3,71± 0,0086	0,66 ± 0,0029
Клевер открытозевый (цветки)	5,29 ±0,0113	0,74 ± 0,0024
Клевер открытозевый (надземная часть)	7,02±0,0055	0,66 ± 0,0028
Козлятник восточный (надземная часть)	2,4 ± 0,0053	0,67 ± 0,001
Козлятник восточный (побеги)	2,05 ±0,0063	0,56 ± 0,0026
Левзея сафлоровидная (цветки)	5,66 ± 0,0067	3,56 ± 0,0014
Левзея сафлоровидная (надземная часть)	3,27 ± 0,0017	0,74 ± 0,0012
Левзея сафлоровидная (листья)	3,65 ± 0,0076	1,05 ± 0,0014
Люцерна посевная (надземная часть)	3 ± 0,0089	0,5 ± 0,0015
Эспарцет песчаный (надземная часть)	3,31 ± 0,0023	0,76 ± 0,0019
$F_{расч}$	5240	2019
$F_{ст}$	1,79	
НСР	0,03	0,08

Наибольшее количество фенольных веществ наблюдается в левзее сафлоровидной (цветки). Второе место занимает левзея сафлоровидная (листья). Более 0,7% содержат клевер открытозевый (цветки), левзея сафлоровидная (всё растение), эспарцет песчаный (всё растение). Более 0,6% содержат астрагал датский (всё растение), клевер открытозевый (всё растение), козлятник восточный (всё растение). Наименьшее количество фенольных веществ в козлятник восточный (стебли с листьями) и люцерна посевная (всё растение).

Также можно заметить, что наибольшее количество флавоноидов в клевере открытозевом (всё растение). Второе место занимают левзея сафлоровидная (цветки) и клевер открытозевый (цветки). Более 3% содержат астрагал датский (всё растение), левзея сафлоровидная (всё растение), левзея сафлоровидная (листья), люцерна посевная (всё растение), эспарцет песчаный (всё растение). Наименьшее количество в козлятнике восточном (надземная часть), а также в его побегах.

Можно сделать вывод, что козлятник восточный (побеги) содержит меньше всего фенольных веществ, в частности флавоноидов, следовательно, наименее эффективен в качестве источника флавоноидов в рационе животных из числа исследуемых объектов.

Фенольные соединения из одного класса обладают сходным химическим строением и при разделении в хроматографической системе занимают близкие области по времени удерживания, что позволяет проводить качественный анализ хроматограмм по содержанию отдельных классов веществ.

В экстрактах астрагала датского присутствовали в основном фенольные кислоты. Клевер открытозевый отличался присутствием флавоноидов, при практически полном отсутствии фенольных и оксикоричных кислот. Левзея сафлоровидная характеризовалась высоким содержанием и разнообразием флавоноидов. Люцерна посевная проявила высокое содержание и разнообразие фенольных и оксикоричных кислот.

Количественный анализ экстрактов растений позволил выделить и определить содержание некоторых представителей всех трех классов фенольных веществ. Из класса фенольных кислот было определено содержание галловой кислоты, из оксикоричных кислот – кофейной и феруловой кислот, из флавоноидов – рутина, кверцетина и дигидрокверцетина.

Помимо идентифицированных фенольных веществ на основании анализа хроматограмм растений, полученных другими авторами [5], можно предположить присутствие исследованных нами растениях следующих соединений: фенольные кислоты (бензойная, салициловая); оксикоричные кислоты (коричная, кумаровая кислоты); флавоноиды (нарингин, гесперидин). В табл. 2 представлены данные по процентному содержанию индивидуальных фенольных веществ в разных частях кормовых растений.

Большое количество кофейной кислоты в цветках левзеи сафлоровидной и во всём растении Эспарцета песчаного. Среди представленных образцов левзея сафлоровидная и козлятник восточный содержат наибольшее количество феруловой кислоты.

Рутин также преобладает в побегах левзеи сафлоровидной, особенно в цветках, тогда как в листьях наоборот полное отсутствие этого вещества.

Преобладание дигидрокверцетина установлено в цветках левзеи сафлоровидной и во всём растении астрагала датского. Наибольшее значение кверцетина опытным путём было определено во всём растении клевера открытозёвого.

Анализ показал, что в эспарцете песчаном отсутствовали рутин, кверцетин и дигидрокверцетин.

Таблица 2 – Содержание индивидуальных фенольных веществ в разных частях кормовых растений, %

Фенольные вещества Образец	Аскорбиновая кислота	Кофейная кислота	Феруловая кислота	Рутин	Дигидрокверцетин	Кверцетин
Астрагал датский (надземная часть)	1,12	0,29	0,19	0,09	0,92	0,02
Клевер открытозевый (цветки)	1,23	0,14	0,49	0,18	0,39	0,33
Клевер открытозевый (надземная часть)	0,99	0,07	0,25	0,09	0,75	8,75
Козлятник восточный (надземная часть)	1	0,08	1,4	0,05	0,49	0,02
Козлятник восточный (побеги)	-	-	-	-	-	-
Левзея сафлоровидная (цветки)	1,25	0,5	-	3,55	1,34	0,41
Левзея сафлоровидная (надземная часть)	0,91	0,16	1,85	1,65	0,33	-
Левзея сафлоровидная (листья)	1,01	0,21	0,12	-	0,67	0,14
Люцерна посевная (надземная часть)	0,29	0,13	0,26	0,145	0,61	0,13
Эспарцет песчаный (надземная часть)	0,85	0,52	0,28	-	-	-

Таким образом, согласно качественному анализу хроматограмм и данным количественного содержания представителей отдельных классов индивидуальные фенольные соединения существенно варьируют в исследуемых кормовых растениях и проявляют как видовую специфику, так и анатомическую в отдельных частях одного вида кормовых растений. При использовании исследованных кормовых растений в кормопроизводстве необходимо учитывать их особенности в содержании биологически активных веществ.

Библиографический список

1. Мухина Н.В., Смирнова А.В., Черкай З.Н., Талалаева И.В. Корма и биологически активные кормовые добавки для животных. – М.: Колосс. – 2008. – 271 с.
2. Волошин В.А. Вопросы полевого кормопроизводства в Предуралье. – Пермь: Изд-во «От и До» – 2012. – 380 с.
3. Запрометов М.Н. Фенольные соединения и их роль в жизни растения: 56-е Тимирязевское чтение. – М.: Наука 1996. – 45 с.
4. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России – 2004. – 240 с.
5. Верниковская Н.А. Хроматографическое определение фенольных соединений и флавоноидов в лекарственных растениях. – Автореф. соиск. уч. степени канд. хим. наук. Краснодар – 2011. – 12 с.

ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ РОДА ОПУНЦИЯ ФЛОРЫ ПОЛУОСТРОВА КРЫМ

Котикова М.И., Серебряная Ф.К.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ВО ВолзГМУ Минздрава
России, Пятигорск, Россия*

Аннотация. Цель исследования – обозначить границы распространения, ведь разрастание культуры может угрожать биоразнообразию ареала, а также привести морфологическую характеристику, химический состав и возможное применение в области медицины. Многоплановые исследования по изучению представителей рода *Opuntia* на территории Крыма проводятся на базе одного из старейших научных учреждений – Никитского ботанического сада. Опуния является инвазионным видом Крыма.

Ключевые слова: опунция, кактусы, инвазивные виды, Крым

ECOLOGICAL-GEOGRAPHICAL STUDY OF SPECIES OF THE GENUS POPUNCE OF THE FLORA OF THE CRIMEA PENINSULA

Kotikova M.I., Serebryannaya F.K.

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of the Volga State Medical University
of the Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia*

Abstract. The purpose of the study is to identify the boundaries of distribution, because the proliferation of the crop can threaten the biodiversity of the area, as well as to provide morphological characteristics, chemical composition and possible application in the field of medicine. Multifaceted research on the study of representatives of the genus *Opuntia* in the Crimea is carried out on the basis of one of the oldest scientific institutions – the Nikitsky Botanical Garden. *Opuntia* is an invasive species of Crimea.

Keywords: *Opuntia*, cacti, invasive species, Crimea

Кактусы уже являются одними из самых распространенных и повреждающих инвазивных чужеродных растений в некоторые части мира. Огромный и растущий интерес ко многим кактусам для украшения создали важный новый путь для внедрения и распространения кактусов по всему миру [1,17,20]. Многие новые события вторжения ожидаются в будущем, существует ясная необходимость регулирования перемещения кактусов, зарегистрированных, как инвазивные в другом месте. Род *Opuntia* Mill. является одним из крупнейших в семействе *Cactaceae* Juss., он включает, по данным разных от 90 до 250 видов [10,11]. На сегодняшний день самым многочисленным видом является вид *Opuntia humifusa* (Raf.) или опунция расprostертая. Цель исследования – обозначить границы распространения, ведь

разрастание культуры может угрожать биоразнообразию ареала, а также привести морфологическую характеристику, химический состав и возможное применение в области медицины.

Основными центрами разнообразия кактусов являются северо-восточная Мексика, восточные Анды Боливии и Аргентина и юго-восточная Бразилия. Однако виды распространены во многих местах обитания, включая пустыни, песчаные прибрежные участки, кустарниковые леса, сухие лиственные леса, высокие альпийские степи [27]. Было установлено, что не менее 27 видов рода *Opuntia* являются инвазионными растениями в различных регионах земного шара. Семейство *Cactaceae* Juss. содержит некоторые из наиболее распространенных и разрушительных инвазивных чужеродных видов растений в мире, при этом Австралия (39 видов), Южная Африка (35 видов) и Испания (24 вида) являются основными горячими точками вторжения. В 2015 году была создана Глобальная рабочая группа по кактусам для улучшения международного сотрудничества и определения ключевых мер, которые могут быть приняты для ограничения воздействия, вызываемого инвазиями кактусов во всем мире. К настоящему времени имеются данные об инвазии еще нескольких видов; наибольшее число натурализовавшихся представителей отмечено в Испании, Южной Африке и Австралии. На территории Российской Федерации натурализовавшиеся растения опунций отмечены на Черноморском побережье Кавказа, Северном Кавказе, в Нижнем Поволжье, на Крымском полуострове [2,5,8].

Многоплановые исследования по изучению представителей рода *Opuntia* на территории Крыма проводятся на базе одного из старейших научных учреждений – Никитского ботанического сада [3,5,7]. Опунция является инвазионным видом Крыма. Считается, что кактусы на полуостров завезли итальянские солдаты, участвовавшие в Крымской войне в середине XIX века. После чего опунции распространились в нарушенных и естественных биотопах [4,6].

Что касается химического состава видов рода опунция, то благодаря исследованиям корейских ученых, можно с точностью рассказать о химическом составе стеблей и плодов опунции распротертой.

В плодах были обнаружены водорастворимые азотосодержащие пигменты – беталаины [12,14,15]. Известно, что беталаины являются водорастворимыми нитрогеновыми естественными пигментами, которые используются в качестве естественных красителей в пищевой промышленности, благодаря их применимости и их богатому фармакологическому профилю, включая антиоксидантные, противомикробные и противораковые свойства [9,13]. Известны ряд публикаций, которые описывают использование для анализа *Opuntia*, аналитических методов, включая ультрафиолетовую спектроскопию, спектроскопию ядерного магнитного резонанса и жидкостную хроматографию – масс-спектрометрию высокого разрешения (LC-HRMS), а также клеточную спектроскопию [16,19].

Что касается изученности фармакологической активности видов рода опунция, то известно противовоспалительное и хондропротекторное действие некоторых лиофилизированных экстрактов, полученных из клуды *Opuntia ficus indica* (L.) [18]. Комплексы биологически активных веществ, которые извлечены из стеблей *Opuntia ficus-indica*, были исследованы на предмет их химиопрофилактики с использованием человеческих раковых клеток *in vitro*. Изучены полифенольные соединения и наличие аскорбиновой кислоты в плодах *Opuntia humifusa*, что представляет интерес, как выраженное антиоксидантное средство, что может быть использовано для подавления пролиферации клеток рака шейки матки HeLa [21,28]. В семействе *Cactaceae* *Opuntia* включает в себя наиболее распространенные виды, имеющие признанную важность в жизни человека, представители семейства используются в традици-

онной медицине американских индейцев, в Мексике и в Корее, включая применение в пищу, а также как традиционное средство для лечения различных заболеваний, в том числе астматических состояний, как противоожоговое средство, известны антиоксидантные, мочегонные, антиканцерогенные, противовоспалительные, антидиабетические и антигиперхолестеринемические свойства.

Что касается применения в медицине экстрактов, выделенных из опунции распростертой, то известны работы корейских ученых, которые смогли выявить ингибирование роста раковых клеток. [9, 18, 22]. Растение содержит слизь, которая состоит из углеводов в виде пектина, арабинозы, галактозы, галактуроновой кислоты и рамнозы, при этом проявляя выраженную гастропротективную способность. Определены близкий состав и физико-химические свойства надземных органов опунции, в том числе с помощью индуктивно-связанной плазменной атомной эмиссионной спектрометрии обнаружены Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, P, Mn и Zn. Из семян *Opuntia ficus-indica*, собранных в восточной части Марокко, выделены жирные кислоты и токоферолы. [24,26]. Был изучен состав семян четырех разновидностей *Opuntia ficus-indica*, выращиваемых в Алжире, фенольные соединения были извлечены из обезжиренного порошка семян для количественной оценки и характеристики жидкой хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией (LC-MS(n)) и ядерным магнитным резонансом (LC-ЯМР). [22,25]. Стебли опунции распростертой имеют более высокие концентрации суммы флавоноидов, а также витамина С по сравнению с другими видами кактусов. Считается, что обилие природных антиоксидантов в этих растениях, прежде всего в их фенольных и флавоноидных соединениях, что в значительной степени способствует их антиоксидантной способности [17,20].

В природном ареале опунции распространены в Северной Америке, произрастают в разных типах растительности, включая нарушенные и естественные травянистые и разреженные древесно-кустарниковые сообщества на каменистых местообитаниях. Натурализация вида отмечена на Украине, в Российской Федерации – на Черноморском побережье Кавказа, в том числе на мысе Пенай, и на территории Крымского полуострова [2,3,6]. *Opuntia humifusa* (Raf.) является самым распространенным видом в Крыму и используется, как декоративное растение с конца XIX в., встречается во всех природных зонах полуострова, в последние годы отмечено активное внедрение вида, в том числе в естественные ценозы. В данный момент в Крыму произрастает 8 видов опунции: *O. Humifusa*; *O. engelmannii* var. *lindheimeri*; *O. macrorhiza*; *O. tortispina*; *O. polyacantha*; *O. tunoidea*; *O. phaeacantha* f. *rubra*; *O. fragilis*. [4,7].

Морфологическая характеристика *Opuntia humifusa* (Raf.). Жизненная форма – кустарник, корневая система – смешанная, побеги укороченные, высотой 5–10, реже 20 см. Сегменты имеют окраску от желто-зеленого до темно-зеленого цвета, а форму от округлой до почти яйцевидной формы, мясистые. Мякоть отличается более светлой окраской, сочная, вкус кисло-сладкий, приятный. Имеют метаморфозы побегов – колючки и глохидии. Колючки часто отсутствуют или по 1–2 на ареолу, раскидистые, от беловатого до коричневатого цвета, острые, прямые и обычно толстые, 25–60 мм. Глохидии многочисленно населяют кладодии и имеют длину до 4 мм. Внутренние листочки околоцветника по всей длине от бледно-до ярко-желтого цвета диаметром 20–30 мм; нити от желтых до оранжевых; пыльники от бледно-желтых до кремовых; лепестки с рыльцем белые.

Плоды зеленоватые, постепенно переходящие от абрикосового цвета к коричневато-красному, удлиненные, 30×20 мм, мясистые, сужающиеся у основания; мякоть зеленая и кисловатая, при идеальных условиях становится красновато-сладкой; семена: коричневые,

диаметром 3,5-4,5 мм, толстоватые. Что касается морфометрических показателей плодов и семян натурализовавшихся представителей рода *Opuntia*, то представлены данные по качественным и количественным признакам, в том числе форма, ширина и длина семян, их окраска [2].



Рис. 1. Эколого-морфологическая характеристика *Opuntia humifusa* (Raf.). полуострова Крым

Для проведения сравнительного эколого-морфологического анализа и определения урожайности указанных образцов проводились комплексные исследования, результаты представлены в табл. 1

Таблица – Распространение *Opuntia humifusa* (Raf.) на территории полуострова Крым

Морфометрические показатели/урожайность	Места сбора образцов						
	1	2	3	4	5	6	7
	Крым, Алуштинский район, с. Малореченское, береговой склон	Крым, г. Судак, на территории Генуэзской крепости	Крым, г. Судак, пос. Новый Свет, возле дороги	Крым, г. Судак, западный склон Фирейной горки	Южный берег Крыма, пгт Форос, одичавшее	Крым, городской округ Феодосия, пгт Курортное, биостанция Карадагского заповедника	Крым, Балаклавский р-н, хребет Орта-Кая
Почва	Скальный грунт	Глинистая почва	Супутинистая почва	Щебнисто-глинистая	Супутинистая почва	Супутинистая почва	Скальный грунт
Жизненная форма	Кустарник, 0,5–0,8 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,6–1 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,3–0,5 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,4–1 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,7–1 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,4–0,7 м выс., с распростертыми в стороны побегами	Кустарник, 0,5–0,65 м выс., с распростертыми в стороны побегами
Сегменты	Зеленые, с сизоватым налетом, округлые, обратнойцевидные, в среднем 25–31 см длиной, 16–18 см шириной	Светло-зеленые, с налетом, овальные, обратнойцевидно-эллиптические, в среднем 22–30 см длиной, 13–18 см шириной	Ярко-зеленые, с сизоватым налетом, округлые, ромбовидно-удлиненные, в среднем 15–20 см длиной, 13–15 см шириной	Темновато-зеленые, с налетом, полукруглые, в среднем 22–28 см длиной, 14–18 см шириной	Нежно-зеленые, с сизоватым налетом, овальные, обратнойцевидно-эллиптические, в среднем 17–29 см длиной, 1–19 см шириной	Зеленые, с белесым налетом, овальные, ромбовидно-удлиненные, в среднем 21–31 см длиной, 14–17 см шириной	Светло-зеленые, с сизоватым налетом, округлые, обратнойцевидные, 23–32 см длиной, 13–19 см шириной
Листья	Игольчатые, быстро опадающие, до 1,0 см дл. и до 2,0 мм толщ.	Шлифовидные, опадают быстро, до 1,5 см дл. и до 2,5 мм толщ.	Игольчатые, медленно опадающие, до 0,5 см дл. и до 1,5 мм толщ.	Шлифовидные, быстро опадающие, до 1,5 см дл. и до 2,0 мм толщ.	Спицевидные, опадающие, до 2,0 см дл. и до 2,5 мм толщ.	Спицевидные, медленно опадающие, до 3 см дл. и до 2,7 мм толщ.	Шлифовидные, опадающие, до 2,5 см дл. и до 3,0 мм толщ.
Колочки	1–3 короткие и 1 длинная, растопыренные, ярко-желтые, темнеют к основанию, 2,5–4,5 см длиной	2–3 короткие и 1 длинная, топорщатся в разные стороны, лимонно-желтые, у основания – краснокоричневые 3,5–4,5 см длиной	1 короткая и 2 длинные, прямонаправленные, песочного цвета, у основания – коричневые, 1,5–3 см длиной	1–6 короткие и 2 длинные, растопыренные, желтые, у основания – оранжево-коричневые, 2,5–5 см длиной	1–4 короткие и 1 длинная, растопыренные в разные стороны, светло-коричневые, у основания – красновато-коричневые, 2,5–4,5 см длиной	2–3 короткие и 1 длинная, топорщатся вверх, светло-желтые, у основания – кофейного цвета, 2,5–4,5 см длиной	1–5 короткие, 2 длинные, серо-желтые, растопыренные, у основания – темнокоричневые 3,5–5 см длиной
Ареолы	Удаленные, по 4–7 в ряду, крупные, овальные с коричневыми шерстинками	Располагаются в шахматном порядке, по 4–6 в ряд, маленькие, эллипсоидной формы, имеют шерстинки	Концентрируются на верхушке, в ряду по 5–6 в ряду, крупные, круглые, шерстяные волоски обильные	Удаленные друг от друга, по 7–8 в ряду, большие, эллиптической формы есть шерстинки	На верхушке близко расположены, затем редеют, по 5–7 в ряду, мелкие, овальные, с крупными волосками	Удаленные, по 5–8 в ряду, большие, с овальными, коричневыми шерстинками	Одаленные, по 4–5 в ряду, крупные, круглые, с мелкими волосками
Глохидии, окраска и размеры	Зеленовато-коричневые, до 1–2 мм дл	Желто-коричневые с ржавым оттенком, 1,5–2 мм дл	Зеленые с ржавым оттенком, 0,5–2 мм дл	Зеленовато-желто-коричневые, 1–2,5 мм дл	Ржавого цвета с зеньми проблесками, 1,5–2,5 мм дл	Горчичного цвета, 0,4–1,5 мм дл	Желто-зеленые, 1–2 мм дл
Окраска лепестков венчика	Бледно-желтые	От желтых до темно-красных	Охровые	Желтые	Оранжево-желтые	Светло-желтые	Лимонного цвета
Окраска и размеры плодов	Пурпурного цвета, мякоть розового цвета с белыми пятнышками, грушевидные 6,5–7,5 см длиной, 3,5–4 см шириной	Коричневато-бордовые, мякоть бордового цвета, пурпурного цвета, бочковидные 5,5–7,2 см длиной, 2,9–3,5 см шириной	Темно-красно-бордовые, мякоть бордового цвета, грушевидные 4,5–6 см длиной, 2,5–4 см шириной	Темно-алого цвета, мякоть красновато-малинового цвета, грушевидной формы с закругленным концом, 5–8 см длиной, 4–5 см шириной	Бордовые, мякоть нежно-розового цвета с красными пятнами, грушевидной формы, 5–7 см длиной, 3–3,5 см шириной	Пурпурно-бордовые, мякоть красного цвета, вытянутые цилиндрической формы 6–8 см длиной, 3–4 см шириной	Вишневого цвета, мякоть алого цвета, грушевидные, бочковидной формы 5–6 см длиной, 4–5 см шириной
Урожайность кг/м ²	16 кг/м ²	15 кг/м ²	8 кг/м ²	17 кг/м ²	10 кг/м ²	14 кг/м ²	13 кг/м ²

Заключение. Результаты, полученные в ходе проведенного нами исследования, помогли глубже взглянуть на проблему регулирования распространенных инвазий кактусов по всему миру, а также найти применение видов рода *Opuntia* Mill. в различных областях, посредством изучения химического состава растений. Данные позволяют нам точно сказать, что такой кактус, как *Opuntia humifusa*, имеет огромный потенциал в дальнейшем анализе, так как уже на сегодняшний день он показал свою противовоспалительную, хондропротекторную, противораковую и антиоксидантную активность. Использование кактусов в дальнейшем позволит количественно уменьшить популяцию этих растений в инвазионных участках и не допустить появления возможной угрозы биоразнообразию ареалов. Одной из таких локализаций является популяция видов рода *Opuntia* Mill. на территории Республики Крым. Именно она будет использоваться, как сырье для наших дальнейших исследовательских работ по виду *Opuntia* Mill.

Библиографический список

1. Hulme P.E. Beyond control: wider implications for the management of biological invasions. *Journal of Applied Ecology*. – 2006. – Vol. 43(5), 835–847.
2. Багрикова Н.А., Перминова Я.А. Характеристика и распространение натурализовавшихся в Крыму представителей рода *Opuntia* (Cactaceae). *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(3):149–160. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-149-160
3. Характеристика плодов и семян натурализовавшихся в Крыму представителей рода *Opuntia* (Cactaceae). Н.А.Багрикова, Л.Э.Рыфф, Е.С. Чичканова, Я.А. Перминова // *Ботанический журнал*. 2021. Т. 106, № 10. С. 1002–1015.
4. Багрикова Н.А. 2013. Адвентивные виды растений на территориях природных заповедников Крыма // *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. Т. 135. С. 96–106.
5. Багрикова Н.А. 2017. Инвазионные виды растений в растительных сообществах Крымского полуострова // *Изучение адвентивной и синантропной флор России и стран ближнего зарубежья: итоги, проблемы, перспективы* / ред. О.Г. Баранова, А.Н. Пузырев. Ижевск: Ижевский институт компьютерных исследований. С. 13–16.
6. Багрикова Н.А., Резников О.Н. 2014. Адвентивная фракция флоры природного заповедника «Мыс Мартыан»: история и перспективы ее дальнейшего изучения // *Научные записки природного заповедника «Мыс Мартыан»*. Вып. 5. С. 78–87.
7. Багрикова Н.А., Рыфф Л.Э. 2014а. Инвазионный вид *Opuntia lindheimeri* Engelm. в Южном Крыму // *Сборник научных трудов Государственного Никитского ботанического сада*. Т. 139. С. 47–67.
8. Багрикова Н.А., Рыфф Л.Э. 2014б. Натурализации представителей рода *Opuntia* Mill. на территории Крымского полуострова // *VI ботанические чтения памяти Й.К. Пачоского*. Херсон: Айлант. С. 19–21.
9. Anticancer properties of extracts from *Opuntia humifusa* against human cervical carcinoma cells. Nahm SW, Park J, Oh SY, Lee CW, Park KY, Kim H, Son YS. *J Med Food*. 2015 Jan;18(1):31–44. doi: 10.1089/jmf.2013.3096.PMID: 25379883
10. Arias S., Gama-López S, Guzmán-Cruz L.U & Vazquez-Benitez B. (2012). Cactaceae Juss. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*, Mexico, Instituto de Biología, UNAM.
11. Binggeli, P. Cactaceae, *Opuntia* spp., Prickly Pear, Raiketa, Rakaita, Raketa. In *The Natural History of Madagascar*; University of Chicago Press: Chicago, IL, USA, 2003; pp. 335–339.

12. Bioactives in cactus (*Opuntia ficus-indica*) stems possess potent antioxidant and pro-apoptotic activities through COX-2 involvement. Jinhee Kim, Soon Yil Soh, Juha Shin, Chi-Woung Cho, Young Hee Choi Sang-Yong Nam// *J Sci Food Agric*. 2015 Oct;95(13):2601-6. doi: 10.1002/jsfa.6968. Epub 2014 Nov 18.
13. Bouckaert R., Heled J., Kühnert D., Vaughan T., Wu C.H., Xie D., Suchard M.A., Rambaut A. & Drummond A.J. (2014) BEAST 2: A software platform for Bayesian Evolutionary analysis. *PLOS Computational Biology* 10: e1003537. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003537>
14. Cactus stem (*Opuntia ficus-indica* Mill): anatomy, physiology and chemical composition with emphasis on its biofunctional properties. Ventura-Aguilar RI, Bosquez-Molina E, Bautista-Baños S, Rivera-Cabrera F.J *Sci Food Agric*. 2017 Dec;97(15):5065-5073. doi: 10.1002/jsfa.8493. Epub 2017 Aug 28. PMID: 28631306 Review.
15. Chemical Composition and Antioxidant, Antiviral, Antifungal, Antibacterial and Anticancer Potentials of *Opuntia ficus-indica* Seed Oil. Alqurashi AS, Al Masoudi LM, Hamdi H, Abu Zaid A.// *Molecules*. – 2022. – vol.25;27(17):5453. doi: 10.3390/molecules27175453. PMID: 36080220
16. Chemopreventive effect of cactus (*Opuntia humifusa*) extracts: radical scavenging activity, pro-apoptosis, and anti-inflammatory effect in human colon (SW480) and breast cancer (MCF7) cells. Kim J, Jho KH, Choi YH, Nam SY. *Food Funct*. 2013 Apr 30;4(5):681-8. doi: 10.1039/c3fo30287c. PMID: 23435602
17. Drennan, P.M.; Nobel, P.S. Root growth dependence on soil temperature for *Opuntia ficus-indica*: Influences of air temperature and a doubled CO₂ concentration. *Funct. Ecol*. 1998, 12, 959–964.
18. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures/A M Panico, V Cardile, F Garufi, C Puglia, F Bonina, S Ronsisvalle// *J Ethnopharmacol*. 2007 May 4;111(2):315-21. doi:10.1016/j.jep.2006.11.020. Epub 2006 Dec 2
19. Exploration of Betalains and Determination of the Antioxidant and Cytotoxicity Profile of Orange and Purple *Opuntia* spp. Cultivars in Greece. Antonios D Tsailanis, Christos M Chatzigiannis, Christina D Papaemmanouil, Maria V Chatziathanasiadou, Panagiotis Chaloulos Isabel Riba, Graham Mullard, Wiesław Wiczowski, Apostolos Koutinas, Ioanna Mandala Andreas G Tzakos// *Plant Foods Hum Nutr*. 2022 Jun;77(2):198–205. doi: 10.1007/s11130-022-00962-7. Epub 2022 Apr 9.
20. Global Actions for Managing Cactus Invasions. Novoa, A.; Brundu, G.; Day, M.D.; Deltoro, V.; Essl, F.; Foxcroft, L.C.; Fried, G.; Kaplan, H.; Kumschick, S.; Lloyd, S.; et al. // *Plants*. – 2019. – vol. 8, 421; doi:10.3390/plants8100421
21. Le Thi Nhu Ngoc, Ju-Young Moon, Young-Chul Lee. Beneficial Effects of *Opuntia humifusa* (Korean Cheonnyuncho) on Human Health Based on Antioxidant Properties: Systematic Review and Meta-Analysis // *Antioxidants*(Basel). 2023. – vol.11;12(1):174. doi: 10.3390/antiox12010174.
22. Nutritive value and chemical composition of prickly pear seeds (*Opuntia ficus indica* L.) growing in Turkey. Mehmet Musa Özcan, Fahad Y Al Juhaimi// *Int J Food Sci Nutr*. 2011 Aug;62(5):533-6. doi: 10.3109/09637486.2011.552569. Epub 2011 Mar 10. PMID: 21391790
23. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. Chougui N, Tamendjari A, Hamidj W, Hallal S, Barras A, Richard T, Larbat R. *Food Chem*. 2013 Aug 15;139(1-4):796-803. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.01.054. Epub 2013 Jan 30. PMID: 23561175

24. *Opuntia humifusa* aqueous extract alleviates ethanol-induced gastric ulcer in a mouse model. Chi-Yeol Yoo, Alshammari Fanar Hamad, Sang-Han Lee//Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 2020. – 10(9):403. DOI: 10.4103/2221-1691.290131
25. Phenolic Compounds' Occurrence in *Opuntia* Species and Their Role in the Inflammatory Process: A Review. Zeghib W, Boudjouan F, Vasconcelos V, Lopes G.Molecules. 2022 Jul 25;27(15):4763. doi: 10.3390/molecules27154763.PMID: 35897933
26. Supercritical Fluid Extraction of Oils from Cactus *Opuntia ficus-indica* L. and *Opuntia dillenii* Seeds/ G.Al-Naqeb, E.Aprea et al. // Foods. – 2023 Feb 1;12(3):618. doi: 10.3390/foods12030618.
27. Temperature and extraction methods effects on yields, fatty acids, and tocopherols of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L.) seed oil of eastern region of Morocco. Kadda S, Belabed A, Loukili EH, Hammouti B, Fadlaoui S. Environ Sci Pollut Res Int. 2022 Jan; 29(1):158-166. doi: 10.1007/s11356-021-16752-8. Epub 2021 Oct 14.PMID: 34648165
28. Yoo CY, Son HU, Fanar A, Choi HJ, Alam MB, Lee SH.*Opuntia humifusa* aqueous extract alleviates ethanol-induced gastric ulcer in a mousemodel. Asian Pac J Trop Biomed 2020; 10(9): 403–410.

ЗООЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ

ЭПИМОРФНЫЕ ГУБОНОГИЕ МНОГОНОЖКИ (CHILOPODA: GEOPHILOMORPHA, SCOLOPENDROMORPHA) АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ

Вилкова Е.С.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Впервые рассмотрена история изучения и представлен список эпиморфных губоногих многоножек (Chilopoda: Geophilomorpha, Scolopendromorpha) Азиатской части России.

Ключевые слова: губоногие многоножки, фауна, Азиатская часть, Россия, Geophilomorpha, Scolopendromorpha

EPIMORPH CENTIPEDES (CHILOPODA: GEOPHILOMORPHA, SCOLOPENDROMORPHA) OF THE ASIAN PART OF RUSSIA

Vilkova E.S.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The history of the study is reviewed and a list of epimorph centipedes (Chilopoda: Geophilomorpha, Scolopendromorpha) of the asian part of Russia is presented for the first time.

Keywords: centipedes, fauna, asian part, Russia, Geophilomorpha, Scolopendromorpha

Класс губоногие многоножки, или хилоподы (Chilopoda) представлены группами эпиморфными (отряды Geophilomorpha и Scolopendromorpha) и анаморфными многоножками (отряды Lithobiomorpha и Scutigermorpha). На данный момент описано свыше 3000 видов губоногих многоножек [1], расположенных во всех ландшафтных зонах, кроме арктических пустынь. Составляя значительную часть населения верхнего почвенного яруса и подстилки в умеренном поясе, хилоподы имеют большое значение в истреблении вредных насекомых. Многие виды губоногих служат надежным показателем почвенных условий, направления сукцессионных процессов в различных биогеоценозах и степени влияния антропогенного фактора на окружающую среду [2].

Первые сведения, касающиеся эпиморфных многоножек Азиатской части России находим в трудах русского ученого А. В. Селиванова [3], где он указал 4 вида геофиломорфных многоножек: *Geophilus orientalis* (Sseliwanoff, 1881), *G. proximus* (C.L. Koch, 1847), *Srtigamia sibirica* (Sseliwanoff, 1881), *S. sulcate* (Sseliwanoff, 1881).

Исследования в этом направлении возобновились лишь во второй половине XX века. В ряде работ Л.П. Титовой приводится 19 новых для территории видов: *Escaryus sibiricus* Cook, 1899, *E. japonicas* Attems, 1927, *E. sachalinus* Takakuwa, 1935, *E. molodovae* Titova,

1973, *E. hirsutus* Titova, 1973, *E. polygonatus* Titova, 1973, *E. dentatus* Titova, 1973, *E. perelae* Titova, 1973, *E. krivolutskiji* Titova, 1973, *E. vitimicus* Titova, 1973, *E. chadaevae* Titova, 1973, *E. koreanus* Takakuwa, 1937, *E. chichibuensis* Shinohara, 1955, *E. retusidens* Attems, 1904, *Strigamia sacolinensis* (Meinert, 1870), *Arrup holstii* (Pocock, 1895), *A. mamaevi* (Titova, 1975), *A. dentatus* (Takakuwa, 1934), *Agnostrup striganovae* (Titova, 1975), из которых 10 видов были описаны как новые для науки [1, 4, 5, 6]. В более поздних почвенно-зоологических и эколого-фаунистических исследованиях упоминается еще пять новых для азиатской части России геофилomorфных многоножек: *Arctogeophilus macrocephalus* Folkmanova & Dobroruka, 1960 (Красноярский край) [7], *Pachymerium ferrugineum* (C.L. Koch, 1835) (Тюменская область) [8], *Geophilus flavus* (De Geer, 1778) (Западная Сибирь) [9], *Strigamia pusilla* (Sseliwanoff, 1884) (Юго-Западная и Центральная Сибирь) и *Strigamia transsilvanica* (Verhoeff, 1928) (о. Сахалин) [10]. Нахождение последнего вида на изучаемой территории требует дополнительной проверки [10].

В отличие от геофилomorфных многоножек, относительно широко распространенных в азиатской части России, сколопендровые представлены здесь всего одним видом – *Cryptops hortensis* (Donovan, 1810) [11]. Следует отметить, что эти находки были сделаны исключительно в теплицах г. Барнаул и г. Томск, а вид, благодаря антропохорной интродукции, широко распространен не только в России, но и во всем мире.

Таким образом, согласно литературным данным, фауна эпиморфных губоногих многоножек азиатской части России включает 29 вида из 5 семейств и 2-х отрядов. Ниже предлагается список видов, где после двоеточия приводятся сведения по их распространению на изучаемой территории.

Отряд Scolopendromorpha Leach, 1815

Сем. Cryptopidae Kohlrausch, 1881

Cryptops (Cryptops) hortensis (Donovan, 1810): Алтайский край, Томская область [11].

Отряд Geophilomorpha Pocock, 1895

Сем. Schendylidae Cook 1896

Escaryus dentatus Titova, 1972: Приморский край [6].

E. chadaevae Titova, 1972: Кемеровская область [6].

E. chichibuensis Shinohara, 1955: Курильские острова, остров Кунашир [6].

E. koreanus Takakuwa, 1937: Приморский край [6].

E. krivolutskiji Titova, 1972: Приморский край [6].

E. japonicus Attems, 1927: Дальний Восток [6].

E. hirsutus Titova, 1972: остров Сахалин [6].

E. molodovae Titova, 1972: остров Сахалин [6].

E. retusidens Attems, 1904: азиатская часть России [4, 6].

E. sachalinus Takakuwa, 1935: остров Сахалин [6].

E. sibiricus Cook, 1899: Кемеровская область, Дальний Восток [4, 6].

E. perelae Titova, 1972: Приморский край [6].

E. polygonatus Titova, 1972: Приморский край [6].

E. vitimicus Titova, 1972: Республика Бурятия [6].

Сем. Mecistocephalidae Bollman, 1893

Agnostrup striganovae (Titova, 1975): Приморский край [5].

Arrup dentatus (Takakuwa, 1934): Приморский край [5].

A. holstii (Pocock, 1895): Дальний Восток [5].

A. mamaevi (Titova, 1975): Приморский край [5].

Сем. Geophilidae Leach 1815

Arctogeophilus macrocephalus Folkmanova, Dobroruka, 1960: Западная Сибирь [7].

Geophilus orientalis Sseliwanoff, 1881: Дальний Восток [3].

G. flavus (De Geer, 1778): Западная Сибирь [9].

G. proximus C.L. Koch, 1847: Западная Сибирь [3].

Pachymerium ferrugineum (C.L. Koch, 1835): Тюменская область, Алтайский край [8].

Сем. Linotaeniidae Cook 1899

Strigamia pusilla (Sseliwanoff, 1884): Юго-Западная и Центральная Сибирь [10].

S. sacolinensis (Meinert, 1870): остров Сахалин, Восточная Сибирь [1].

S. sibirica (Sseliwanoff, 1881): Забайкальский край [3].

S. sulcata (Sseliwanoff, 1881): Дальний Восток [3].

Strigamia transsilvanica (Verhoeff, 1928): остров Сахалин [10].

Библиографический список

1. Титова Л.П. Геофилиды фауны СССР и новое в распространении сем. Mecistocephalidae // Проблемы почвенной зоологии. – 1969. – С. 165.
2. Залеская Н.Т., Титова Л.П. Губоногие многоножки (Chilopoda) // Зоология беспозвоночных. – 1980. – Т. 7. – С. 63–131.
3. Селиванов А.В. Geophilidae музея Императорской Академии наук // Записки Императорской Академии наук. – 1881С. 1–31.
4. Титова Л.П. Закономерности распространения рода Escaryus (Chilopoda) в СССР // Проблемы почвенной зоологии. – 1972. – С. 135.
5. Титова Л.П. Геофилиды семейства Mecistocephalidae в фауне СССР (Chilopoda) // Зоологический журнал. – 1975. – Т. 54. – № 1-6.
6. Титова Л.П. Новые виды рода Escaryus Cook et Collins (Schendylidae, Chilopoda) // Экология почвенных беспозвоночных. М.: Наука. – 1973. – С. 94–119.
7. Воробьева И.Г. Эколого-фаунистическая характеристика населения многоножек (Mugiapoda) среднего Енисея // Проблемы почвенной зоологии. Материалы II Всерос. совещ. М.: Изд-во КМК. – 1999. – С. 33–34.
8. Сергеева Е.В. Биотопическое распределение и численность губоногих многоножек (Chilopoda) в сообществах долины Иртыша в Западной Сибири // Евразийский энтомологический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 6. – С. 529–533.

9. Нефедьев П.С., Туф И.Х., Фарзалиева Г.Ш. Многоножки из городских районов юго-западной Сибири, Россия (Chilopoda). Часть 2. Геофиломорфа // *Arthropoda Selecta*. – 2017. – Вып. 26. – №1. – С. 8–14.
10. Нефедьев П.С., Туф И.Х., Фарзалиева Г.Ш. Комплексы многоножек и сороконожек на северных и южных склонах низменного Алтая, юго-западная Сибирь, Россия // *Zookeys*. – 2018. – С. 19–21.
11. Nefediev P. S. et al. First record of *Cryptops (Cryptops) hortensis* (Donovan, 1810) in southwestern Siberia, Russia (Chilopoda: Scolopendromorpha: Cryptopidae) // *Ukrainian Journal of Ecology*. – 2016. – Т. 6. – № 2. – С. 107–109.

ДЕТРИТНИЦЫ (DIPTERA, SCIARIDAE) В ОРАНЖЕРЕЯХ БОТАНИЧЕСКОГО САДА ПГНИУ

Плакхина Е.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Обследовано 10 секций оранжерейного комплекса Ботанического сада ПГНИУ. Зарегистрировано два вида семейства *Sciaridae*: *B. difformis* и *B. ocellaris*. Показаны динамика численности на протяжении года, различия численности особей в секциях теплиц и доля каждого вида в наиболее заселенной секции. Высказывается предположение о связи распределения с температурой и влажностью воздуха, а также с особенностями субстрата.

Ключевые слова: *Sciaridae*, *Bradysia difformis*, *Bradysia ocellaris*, оранжереи

FUNGUS GNATS (DIPTERA, SCIARIDAE) IN GREENHOUSES OF PSU'S BOTANICAL GARDEN

Plakkhina E.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. 10 compartments of the greenhouses of the PSU's Botanical Garden were examined. Two species of the family *Sciaridae* have been recorded: *B. difformis* and *B. ocellaris*. The population dynamics throughout the year, differences of the abundance in the compartments, and the share of each species in the most populated compartment are presented. It is assumed that the distribution is related to temperature and humidity, as well as to the characteristics of the substrate.

Keywords: *Sciaridae*, *Sciaridae*, *Bradysia difformis*, *Bradysia ocellaris*, greenhouses

Введение

Семейство *Sciaridae* широко распространено на всех континентах и отличается значительным разнообразием видов и популяций. На сегодняшний день описано около 1700 валидных видов. Несмотря на их экологическую важность, группой в значительной степени пренебрегали из-за небольших размеров (1-7 мм), скрытного образа жизни на личиночной стадии и трудностей с определением [1].

Личинки детритниц питаются грибами, водорослями, разлагающейся органикой и мягкими тканями корней растений, повреждения которых могут привести к гибели проростков и создают «ворота» для патогенных грибных инфекций [2].

Первая масштабная работа, посвященная сциаридам как вредителям тепличного хозяйства вышла в 1966 году [3]. Она посвящена обзору вредителей культур тепличного хозяйства Ленинградской области. В пределах России фауна сциарид хорошо изучена на примере Алтая [4].

Несмотря на то, что в Палеарктике известно более 800 видов сциарид [5], только 10 из них (менее 1% фауны) являются экономически значимыми вредителями, повреждающими черенки, корни и иногда стебли культурных растений [6].

Большинство известных нам исследований посвящены изучению этой группы с точки зрения потенциального или реального ущерба для культивируемых растений и грибов [5]. При этом основное внимание уделяется вопросам разработки новых методов отлова, биологической борьбы, молекулярным методам для определения родины инвазий и степени родства с изначальной популяцией, а также для различения близкородственных, морфологически схожих видов сциарид. Экология же этой группы в отечественной и зарубежной литературе освещена слабо.

Материал и методы

Материал собирался с 28 января 2022 года по 9 января 2023 года в 10 секциях оранжерейного комплекса Ботанического сада ПГНИУ: «Пермский период» (далее ПП), «Влажные тропики» (ВлТ), «Сухие тропики» (СухТ), «Полезные растения тропиков» (ПРТ), «Эпифиты» (Э), «Кактусы и суккуленты» (КС), «Коллекция орхидей» (КО), «Субтропики» (СубТ), «Теплая часть мемориальной оранжереи» (ТМО) и «Холодная часть мемориальной оранжереи» (ХМО). Для сбора насекомых были использованы ловушки Мёрике, которые в нашем случае представляли из себя одноразовые подложки из полистерола лимонно-желтого цвета (225x143x25 мм), заполненные небольшим количеством (глубина около 1 см) фиксирующей жидкости. В качестве фиксатора выступал 1-2% раствор формалина с добавлением моющего средства. Ловушки располагались на грунте по пять штук в линию в каждой из секций и экспонировались с вечера пятницы до утра понедельника, когда в оранжереях ботанического сада не осуществляется автоматических или ручной полив. Интервал между учетами составлял две недели.

Небольшая часть материала была определена профессором Алтайского государственного университета, д.б.н. Л. А. Комаровой. Пользуясь случаем выражаем искреннюю благодарность Людмиле Алексеевне за первичное определение нашего материала. Прочий материал идентифицировался по диагностическим признакам, подробно описанным в статье Мензела с соавторами [1].

Результаты

В оранжерейном комплексе ботанического сада ПГНИУ отмечено два вида семейства *Sciaridae*: *Bradysia difformis* (Frey, 1948) и *Bradysia ocellaris* (Comstock, 1882). Это виды космополиты, распространенные в обоих полушариях. Личинки *B. difformis* обитают в гниющем растительном материале в почве, компосте и мышиных норах и являются фитофагами, фитосапрофагами и мицетофагами на корнях различных культур [7]. *B. ocellaris* часто фигурирует в литературе как вредитель грибов вешенок [8].

Всего на протяжении года во всех секциях оранжерейного комплекса Ботанического сада ПГНИУ было собрано 8775 экземпляров детритниц.

Наибольшее количество особей отмечено в отделении ПРТ – 2653 особи, что составляет 30% от всего собранного материала. Также достаточно населенной детритницами является секция КО (19% от общего числа особей). В четырех из обследованных секций численность сциарид была низкой (рис. 1).

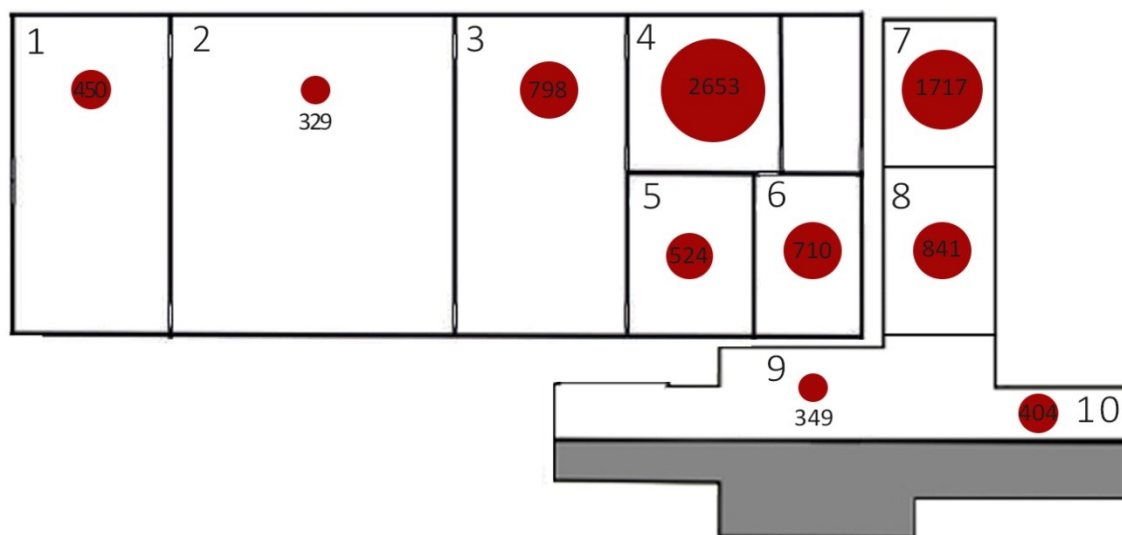


Рис. 1. Количество экземпляров семейства Sciaridae, отловленных в оранжерейном комплексе Ботанического сада ПГНИУ по секциям (1 – ПП, 2 – ВлТ, 3 – СухТ, 4 – ПРТ, 5 – Э, 6 – КС, 7 – КО, 8 – СубТ, 9 – ТМО, 10 – ХМО).

Подавляющее большинство особей представлено видом *B. difformis*. В секции ПРТ, где отмечено наибольшее количество детритниц, на протяжении всего периода исследований доминировала *B. difformis* (рис. 2). Доля *B. ocellaris* в учетах несколько увеличивается в зимние и осенние месяцы, когда численность доминанта в секции снижается до минимальных значений.

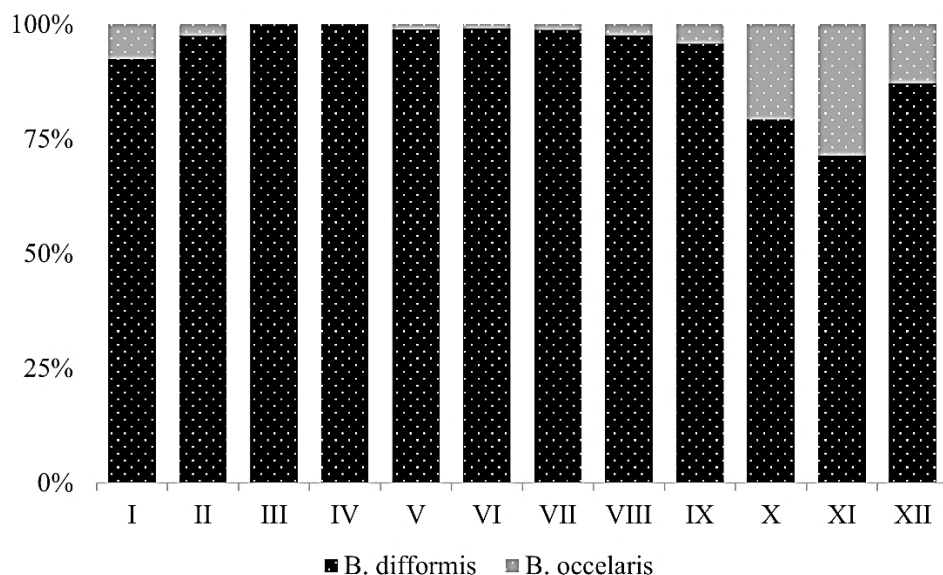


Рис. 2. Доля *B. difformis* и *B. ocellaris* в секции ПРТ оранжерейного комплекса Ботанического сада ПГНИУ на протяжении 2022 года.

Динамика численности детритницы *B. difformis* показана на рис. 3. Как видно из графика, ярко выраженный пик численности сциарид полностью обусловлен массовым размножением доминирующего в оранжереях вида.

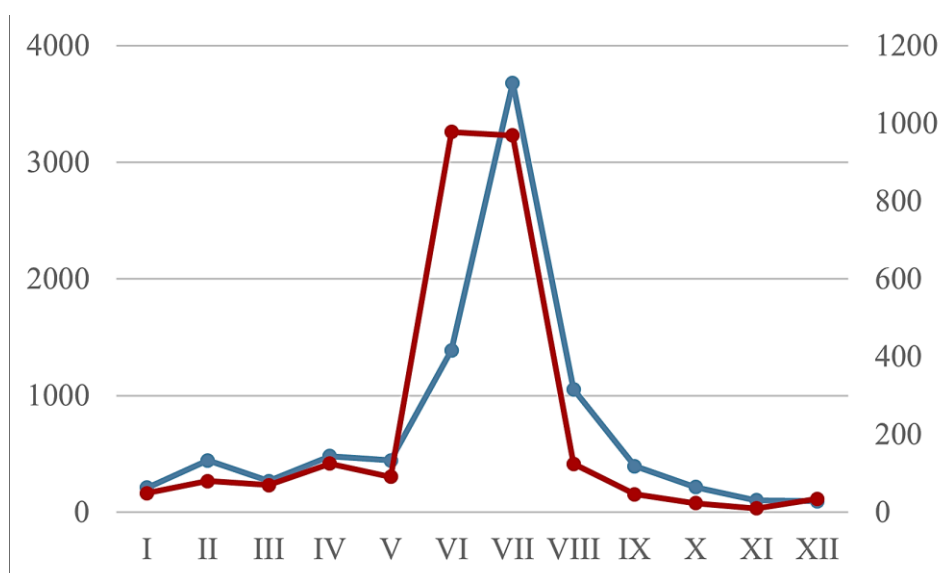


Рис. 3. Динамика численности *B. difformis* в оранжевом комплексе Ботанического сада ПГНИУ (синяя линия, правая шкала) и отдельно в секции ПРТ (красная линия, левая шкала)

В табл. 1 отражены показатели отлова *Sciaridae* в каждой из исследованных секций, а также отмечены даты проведения санитарных обработок. Обработки, произведенные в марте и мае, не отразились негативно на численности детритниц. Уменьшение численности отловленных особей в октябре скорее всего является результатом естественного спада, отраженного в графике на рис. 3 и обусловленного скорее понижением температур в секциях. Кроме того, следует отметить, что действие санитарных обработок в теплицах направлено на уничтожение определенного списка вредителей, в число которых не входили представители исследуемого семейства.

Таблица 1 – Численность комаров семейства сциариды в различных секциях оранжевого комплекса ботанического сада ПГНИУ на протяжении 2022 года

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
ПП	37	128	28	31	37	46	32	60	28*	15	3	5
ВлТ	27	54	27	15	34	23	42	37	34*	13	11	12
СухТ	52	56	42*	114	111*	93	118	79	59*	29	27	18
ПРТ	53	91	70	125	92	986	981	127	48*	27	14	39
КС	1	7	16	100	82	21	299	95	48*	21	16	4
Э	28	88	30	44	26	44	147	60	21*	15	7	14
КО	1	5	26*	29	23*	66	1283	206	39*	31	6	2
СубТ	5	8	26	13	24	74	423	192	51*	21	4	
ТМО	1	6	2*	9	12*	16	156	122	36*	32	12	
ХМО	5		1*		3*	20	200	75	31*	10	3	1

Примечание: *обработки в секциях.

Обсуждение

Детритницы в оранжерейном комплексе ботанического сада размножаются на протяжении всего года, летом их численность резко увеличивается. Поскольку для быстрого развития личинок сциарид важно сочетание комфортных температур и высокой влажности воздуха, логично было бы предположить, что наибольшая численность их будет в отделении ВлТ, где на протяжении всех сезонов фиксируется одни из наиболее высоких показателей относительной влажности и температуры воздуха (Табл. 2), однако, численность детритниц в этой секции самая низкая.

В исследовании о происхождении и распространении инвазии *B. difformis* в сосновых питомниках Южной Африки, направленного на оценку генетического разнообразия популяций, авторы пришли к заключению, что низкая генетическая вариабельность между популяциями различных питомников не может быть следствием множественной интродукции или самостоятельного перемещения особей на значительные расстояния между питомниками. По их мнению, низкий полиморфизм популяций свидетельствует об антропогенном расселении, т.к. растения и кора интенсивно перемещаются между питомниками [9]. Вполне вероятно, *B. difformis* попала в оранжерейный комплекс Ботанического сада ПГНИУ с мульчей из сосновой коры, покрывающей грунт именно тех секций, где зафиксирована максимальная численность особей этого вида (ПРТ и КО).

Зимой и осенью в секции КО (табл. 2) одна из самых низких температур (это секция непосредственно граничит с улицей с трех сторон), в то время как температура в секции ПРТ (которая окружена другими секциями с трех сторон) на протяжении всего года выглядит оптимальной для развития личинок. Время развития от яйца до взрослой особи представителей рода *Bradysia* колеблется в зависимости от температурных условий (16-24° С) от 19 до 33 дней [6]. Таким образом в КО *B. difformis* не находит оптимальных условий, но тем не менее показывает достаточно высокую численность популяции.

Таблица 2 – Основные климатические параметры в секциях оранжерейного комплекса Ботанического сада ПГНИУ

Секция	Относительная влажность	Средняя температура воздуха			
		Зима	Весна	Лето	Осень
ПП	80–90	22,3	21,5	23,3	19,3
ВлТ	90–100	28,6	23,6	23,2	23,2
СухТ	80	27,5	22,9	23,0	22,9
ПРТ	80	26,0	24,4	23,2	22,0
Э	95–100	24,1	23,4	23,3	21,7
КС	60–70	20,9	24,6	24,5	21,3
КО	85–90	14,8	21,1	23,2	13,3
СубТ	85–90	15,1	19,7	23,1	13,8
ТМО	85–90	12,5	16,6	20,2	13,1
ХМО	85–90	11,6	17,7	21,0	12,5

В работе о влиянии теплового шока на жизненные показатели *B. difformis* показано, что в теплицах вспышки численности некоторых видов рода *Bradysia* встречаются с одинаковой регулярностью: вспышки весной, осенью и зимой в теплицах, а летом численность популяции снижается, поскольку оптимальные температурные диапазоны для развития – 10-25 ° С, а температура выше 30° С оказывала угнетающее действие [10]. Возможно, повышение

температуры вело за собой пересыхание почвы, что неблагоприятно сказывалось на жизнедеятельности личинок.

Результаты нашего исследования демонстрируют обратную ситуацию, когда вспышка численности отмечается летом, в то время как в остальные сезоны численность держится на равномерно низком уровне. В летние месяцы в оранжерейном комплексе ботанического сада ПГНИУ держатся очень высокие температуры, чтобы предотвратить пересыхание растений, ведется частый полив, поэтому уровень влажности также достигает высоких значений.

Ранее исследования теплиц ботанического сада ПГНИУ на присутствие вредителей множество лет проводились с использованием липких ловушек, которые подвешиваются на уровне глаз исследователя. Детритницы же перемещаются во взрослой стадии преимущественно в приземном слое воздуха. Таким образом, использование нового, не типичного для оранжерей и теплиц метода исследования позволило выявить новую группу потенциальных вредителей.

Библиографический список

1. Menzel F. Smith J., Colauto Non. (2009). *Bradysia difformis* Frey and *Bradysia ocellaris* (Comstock): Two Additional Neotropical Species of Black Fungus Gnats (Diptera: Sciaridae) of Economic Importance: A Redescription and Review // *Annals of the Entomological Society of America*. – 2009. – V. 96. – P. 448-457.
2. San-Blas E., Luzardo M., Portillo E. et al. *Heterorhabditis amazonensis* for biological control of fungus gnats *Bradysia difformis* in Daisy gerberas // *BioControl*. – 2017. – V. 62. – P. 847–855.
3. Гербачевская А.А. Комарики сем. Sciaridae – вредители овощных культур и шампиньонов в закрытом грунте Ленинградской области: автореферат дис. канд. Биол. Наук. – Всесоюзная ордена Ленина академия сельскохозяйственных наук имени В. И. Ленина; Всесоюзный научно-исследовательский институт защиты растений. -Боровск. – 1966.
4. Комарова Л.А. Комаров С. С. Новые данные по фауне семейства сциарид (Diptera: Sciaridae) ООПТ Алтайского края // *Известия Алтайского отделения Русского географического общества*. – 2014. – № 35. – С. 69-72.
5. Cloyd R.A. Ecology of Fungus Gnats (*Bradysia* spp.) in Greenhouse Production Systems associated with Disease Interactions and Alternative Management Strategies // *Insects*. – 2015. – V. 6. – P. 325–332.
6. Harris M.A., Wayne A., Gardner W.A., Oetting R.D. A Review of the Scientific Literature on Fungus Gnats (Diptera: Sciaridae) in the Genus *Bradysia* // *Journal of Entomological Science*. – 1996. – V. 3. – P. 252–276.
7. Broadley A., Kauschke E., Mohrig W. (2018). Black fungus gnats (Diptera: Sciaridae) found in association with cultivated plants and mushrooms in Australia, with notes on cosmopolitan pest species and biosecurity interceptions // *Zootaxa*. – 2008. – V. 4415. – P. 201-242.
8. Hurley B., Slippers B., Wingfield B. et. al. Genetic diversity of *Bradysia difformis* (Sciaridae: Diptera) populations reflects movement of an invasive insect between forestry nurseries // *Biological Invasions*. – 2010. – V. 12. – P. 729-733.
9. Zhu G., Xue M., Luo Y. et. al. Effects of short-term heat shock and physiological responses to heat stress in two *Bradysia* adults, *Bradysia odoriphaga* and *Bradysia difformis*. *Scientific Reports*. – 2017. – V.7:13381.

ОЦЕНКА ВИДОВОГО СОСТАВА И ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В БОЛЬШЕСОСНОВСКОМ МУНИЦИПАЛЬНОМ ОКРУГЕ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Телегина А.А.¹, Ефимик В.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 видового состава и степени зараженности иксодовых клещей в Большесосновском округе Пермского края. Таксономический анализ собранного материала выявил, что все собранные иксодовые клещи относились к двум видам: таежный клещ *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) и луговой клещ *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 (Acarina, Ixodidae). Представлены результаты ПЦР-анализов, клещей на определение возбудителей четырех трансмиссивных заболеваний: вирусного клещевого энцефалита, инфекционного клещевого боррелиоза, моноцитарного эрлихиоза человека, гранулоцитарного анаплазмоза человека. Возбудителя клещевого энцефалита в исследованных клещах обнаружено не было. В остальном сохраняется общая для Пермского края тенденция – высокий процент зараженности иксодовых клещей боррелиями и низкий уровень зараженности другими клещевыми инфекциями.

Ключевые слова: иксодовые клещи, боррелиозы, эрлихиозы, анаплазмозы, Пермский край

ASSESSMENT OF THE SPECIES COMPOSITION AND INFESTATION OF IXODIC TICKS IN THE BOLSHESOSNOVSKY DISTRICT OF PERM KRAI

Telegina A.A.¹, Efimik V.E.¹, Slavnova E.A.²

¹ *Perm State National Research University, Perm, Russia*

² *Center of Hygiene and Epidemiology in Perm Krai, Perm, Russia*

Abstract. The assessment of the species composition and the degree of infection of ixodic ticks in the Bolshesosnovsky district of Perm Krai was carried out. The results of PCR analyses of ticks to determine the causative agents of four vector-borne diseases are presented: viral tick-borne encephalitis, infectious tick-borne borreliosis, human monocytic ehrlichiosis, and human granulocytic anaplasmosis.

Keywords: ixodic ticks, borreliosis, ehrlichiosis, anaplasmosis, Perm Krai

Большая часть территории Пермского края относится к зоне природно-очаговых клещевых инфекций. К последним относятся прежде всего клещевой энцефалит (КЭ), иксодовые клещевые боррелиозы (ИКБ), а также моноцитарный эрлихиоз (МЭЧ) и гранулоцитарный анаплазмоз человека (ГАЧ) [1-4]. До сих пор не все районы (округа) Пермского края в арахнологическом и инфекционном плане изучены одинаково хорошо.

К недостаточно исследованному району края относится Большесосновский муниципальный округ. А между тем жители этого округа уже давно жалуются на большое количе-

ство клещей в их местности. Поэтому оценка видового состава и зараженности иксодовых клещей в Большесосновском районе Пермского края в 2023 году была крайне актуальна.

Сбор клещей проходил с 10 по 28 мая 2023 г. на территории с. Тойкино и в его окрестностях (Большесосновский муниципальный округ Пермского края).

Материал собирался по общепринятой методике с помощью флага [5-6]. Живые клещи помещались в большие пробирки дифференцированной влажности. Самцы и самки собирались отдельно, для предотвращения их спаривания. С целью проведения ПЦР-анализа собранный материал отправлялся в лабораторию природно-очаговых, особо опасных и вирусных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Пермском крае». Всего было передано в лабораторию 248 клещей.

Таксономический анализ собранного материала выявил, что все собранные иксодовые клещи относились к двум видам: таежный клещ *Ixodes persulcatus* (Schulze, 1930) и луговой клещ *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 (Acarina, Ixodidae). Места сборов и результаты лабораторного анализа клещей представлены в таблицах 1-2.

Таблица 1 – Результаты лабораторного анализа клещей *Ixodes persulcatus* (пояснения в тексте)

Место сбора	Дата	Исследовано клещей	КВЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ
Опушка ельника	10.05.2023	6	0	4	0	0
Поле на пару	11.05.2023	5	0	2	0	0
Смешанный лес	15.05.2023	37	0	15	0	0
Сельский огород	16.05.2023	2	0	1	0	0
Опушка лиственного леса	19.05.2023	3	0	1	0	0
Сельский сквер (редколесье с кустарником)	20.05.2023	7	0	4	0	0
Обочина дороги в селе	20.05.2023	6	0	6	0	0
Разнотравный луг	21.05.2023	2	0	1	0	0
Разнотравный луг	22.05.2023	3	0	3	0	0
Опушка хвойного леса	23.05.2023	1	0	0	0	0
Опушка смешанного леса	27.05.2023	3	0	0	0	0
Поляна в хвойном лесу	28.05.2023	10	0	10	10	0
ИТОГО		85	0	47	10	0

Из 85 клещей, относящихся к виду *I. persulcatus*, 57 клещей, т.е. 67,1% были заражены. Боррелии были обнаружены у 47 клещей (55,3% от общего числа), бактерии эрлихии – у 10 клещей (11,8% от общего числа).

Из 163 клещей, идентифицированных, как *D. reticulatus*, только 37 (22,7%) оказались носителями трех инфекций: боррелиоза (20,9%), эрлихиоза (1,2%) и анаплазмоза (0,6%).

Таким образом, по нашим данным луговой клещ *D. reticulatus* в целом отличается от таежного клеща *I. persulcatus* меньшей степенью зараженности.

Таблица 2 – Результаты лабораторного анализа клещей *Dermacentor reticulatus* (пояснения в тексте)

Место сбора	Дата	Исследовано клещей	КВЭ	ИКБ	МЭЧ	ГАЧ
Опушка ельника	10.05.2023	17	0	7	0	0
Дорога через ельник	10.05.2023	5	0	2	0	0
Зарастающий луг	10.05.2023	18	0	2	1	1
Поле на пару	11.05.2023	17	0	2	0	0
Смешанный лес	15.05.2023	32	0	4	0	0
Пойменный луг	15.05.2023	22	0	7	0	0
Сельский огород	16.05.2023	1	0	0	0	0
Опушка лиственного леса	19.05.2023	1	0	0	0	0
Сельский сквер (редколесье с кустарником)	20.05.2023	11	0	6	0	0
Обочина дороги в селе	20.05.2023	10	0	1	0	0
Разнотравный луг	21.05.2023	2	0	0	0	0
Разнотравный луг	22.05.2023	17	0	2	0	0
Обочина дороги в селе	22.05.2023	5	0	1	1	0
Опушка хвойного леса	23.05.2023	1	0	0	0	0
Опушка смешанного леса	27.05.2023	4	0	0	0	0
ИТОГО		163	0	34	2	1

Если сравнить наши данные с данными по Кишертскому округу [7] и с многолетними исследованиями зараженности иксодовых клещей по Кировской области [8], то можно увидеть, что зараженность таежного клеща боррелиями в Большесосновском округе выше (табл. 3). Заметна доля клещей, зараженных бактериями эрлихии – 11,8%, но она почти в 4 раза ниже аналогичных данных в Кировской области.

Таблица 3 – Результаты инфицированности таежного клеща *I. persulcatus* в отдельных округах Пермского края и Кировской области (пояснения в тексте)

Место сбора	Исследовано клещей	КВЭ (в %)	ИКБ (в %)	МЭЧ (в %)	ГАЧ (в %)
Большесосновский округ Пермского края	85	0	55,3	11,8	0
Кишертский округ Пермского края	285	0,4	24,2	2,1	1,1
Кировская область	418	16,1	24,7	41,9	25,6

Сравнительная оценка зараженности лугового клеща *D. reticulatus* показала, что в Большесосновском округе клещи в целом заражены меньше, также заметна доля боррелиоза – почти 21% (табл. 4). В Кировской области клещи были заражены боррелиями в 1,5% раза больше. Доля других инфекций в клещах здесь тоже больше.

Таблица 4 – Результаты инфицированности лугового клеща *D. reticulatus* в отдельных округах Пермского края и Кировской области (пояснения в тексте)

Место сбора	Исследовано клещей	КВЭ (в %)	ИКБ (в %)	МЭЧ (в %)	ГАЧ (в %)
Большесосновский округ Пермского края	163	0	20,9	1,2	0,6
Кировская область	142	10,4	36,9	5,8	1,4

Обращает на себя внимание отсутствие возбудителя клещевого энцефалита в исследованных клещах в Большесосновском округе при вполне достаточной выборке в 248 клещей. В остальной сохраняется общая тенденция для Пермского края – высокий процент зараженности иксодовых клещей боррелиями и низкий – другими инфекциями, что соответствует данным Роспотребнадзора по Пермскому краю за многие годы и нашим исследованиям последних лет [7, 9].

Библиографический список

1. Афанасьева М.В., Воробьева Н.Н., Коренберг Э.И., Фризен В.И., Манокина Т.Е. Гранулоцитарный анаплазмоз человека: особенности клинических проявлений в России. // Инфекционные болезни. – 2006. – №4 (2) – С. 24–8.
2. Воробьева Н.Н., Григорян Е.В., Коренберг Э.И. Эрлихиоз в России // Инфекционные болезни. Диагностика, лечение, профилактика: тезисы докладов Российско-итальянской научной конференции. – СПб., 2000. – С. 55.
3. Коренберг Э.И. Эрлихиозы – новая для России проблема инфекционной патологии // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 1999. – №4. – С. 10–6.
4. Тетерин В.Ю., Коренберг Э.И., Нефедова В.В., Воробьева Н.Н., Фризен В.И., Кузнецова Т.И. Клинико-лабораторная диагностика инфекций, передающихся иксодовыми клещами, в Пермском крае // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – №4. С. 11–15.
5. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 55 с.
6. Беспятова Л.А., Бугмырин С.В. Иксодовые клещи Карелии (распространение, экология, клещевые инфекции) // Учебно-методическое пособие. Петрозаводск: Карельский научный институт РАН, 2012. – 100 с.
7. Ефимик В.Е., Соловьева Е.Е., Славнова Е.А. Оценка степени зараженности иксодовых клещей в УНБ «Предуралье» // Симбиоз-Россия 2022 [Электронный ресурс]: сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов (г. Пермь, ПГНИУ, 24–25 октября 2022 г.) – Пермь, 2023. – С. 682–687.

8. Волков С.А., Бессолицына Е.А., Столбова Ф.С., Дармов И.В. Анализ инфицированности клещей видов *Ixodes persulcatus* и *Dermacentor reticulatus* возбудителями трансмиссивных заболеваний на территории Кировской области // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6. № 2. С. 173–178.
9. Ефимик В.Е., Славнова Е.А. Оценка обилия и зараженности иксодовых клещей Черняевского леса (г. Пермь) // Анализ риска здоровью – 2023. Совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE-2023: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием: в 2 т. / под ред. проф. А.Ю. Поповой, акад. РАН Н.В. Зайцевой. – Пермь: Изд-во Перм. нац. исслед. политехн. ун-та, 2023. С. 126–130.

К ИЗУЧЕНИЮ СТРОИТЕЛЬНОГО ИНСТИНКТА У ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ *CYCLOSA CONICA* (PALLAS, 1772) И *MANGORA ACALYPHA* (WALCKENAER, 1802)

Григорьева Т.А., Тиунов А.В.

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. В статье анализируется строительный инстинкт пауков видов *Cyclosa conica* и *Mangora acalypha*. На основе наблюдений за последовательностями поведения отдельных особей составлены схемы строительного поведения для пауков каждого вида.

Ключевые слова: пауки, строительный инстинкт, кругопряды

TO THE STUDY OF THE CONSTRUCTION INSTINCT IN THE ORB-WEAVING SPIDERS *CYCLOSA CONICA* (PALLAS, 1772) AND *MANGORA ACALYPHA* (WALCKENAER, 1802)

Grigoreva T.A., Tiunov A.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The article analyzes the construction instinct of spiders *Cyclosa conica* and *Mangora acalypha*. Based on observations of individual behavior, schemes of construction behavior for spiders of each species have been compiled.

Keywords: spiders, construction instinct, orb-weavers

Представители отряда Aranei (Пауки) встречаются повсеместно и обладают сложным поведением. Важнейшей отличительной особенностью отряда является использование паутины при взаимодействии с окружающим миром, например, при оплетении убежищ, строительстве коконов, формировании приспособлений для расселения. Велика роль паутины при добывании пищи [1]. Одной из вершин развития строительного инстинкта у пауков является ловчая сеть пауков-кругопрядов (сем. Araneidae). Сети видоспецифичны, обладают формализуемой геометрической структурой, и поэтому кругопряды являются перспективными объектами для изучения в роли потенциальных объектов биоиндикации [2]

Существуют исследования, в которых разные аспекты структуры ловчих сетей рассматривались как отклик на состояние окружающей среды [3]. При этом важным является то, что структура сети – это результат сложного строительного инстинкта.

Описания усреднённых паттернов поведения пауков при строительстве встречаются достаточно часто [4] [5], однако работ, посвящённых длительному изучению строительного поведения, пока ещё недостаточно. Например, паттерн поведения кругопряда *Argiope argentata* (Fabricius, 1775) описан Робинсоном [6].

Целью настоящей работы было описание строительного инстинкта у *Cyclosa conica* и *Mangora acalypha*. Наблюдения выполнялись в период с начала июня по начало июля 2023

года на территории ООПТ Троицкий государственный природный комплексный заказник (Челябинская область, Троицкий район). Днем мы находили сети половозрелых самок *C. conica* и *M. acalypha*, далее сети подвергались механическому разрушению, чтобы спровоцировать повторную постройку сети. Через некоторое время область нахождения сети проверялась вновь, засекалось начало акта строительства, последовательность действий паука записывалась в полевой дневник. После завершения строительства пауки фиксировались в 75% растворе изопропанола для подтверждения идентификации.

У *M. acalypha* нами выделено 9 поведенческих актов во время строительства сети (строительство рамки, строение первых трёх радиусов, отдых в центре, отдых вне центра, строение остальных радиусов, плетение вспомогательной спирали, плетение ловчей спирали с одновременным поеданием вспомогательной, поедание центра и оплетение центра). У *C. conica* же, кроме уже перечисленных выше девяти актов, был выделен ещё один: при строительстве сети особь каким-то образом выбирает некоторый участок, который оплетает нитью перед плетением основной ловчей спирали. Этот акт наблюдался не у всех исследованных особей. Всего от начала до конца были зафиксированы паттерны строительного поведения у 5 особей *C. conica* и 8 особей *M. acalypha*.

Вероятности перехода между элементами поведенческих актов рассчитывались в программе PAST 4.03 с помощью алгоритма анализа временных рядов «цепь Маркова» (Markov chain), полученный усредненный алгоритм визуализирован с помощью графического редактора GIMP.

На основе рассчитанных вероятностей перехода были составлены схемы алгоритмов строительства ловчих сетей *Cyclosa conica* (рис., A) и *Mangora acalypha* (рис., B).

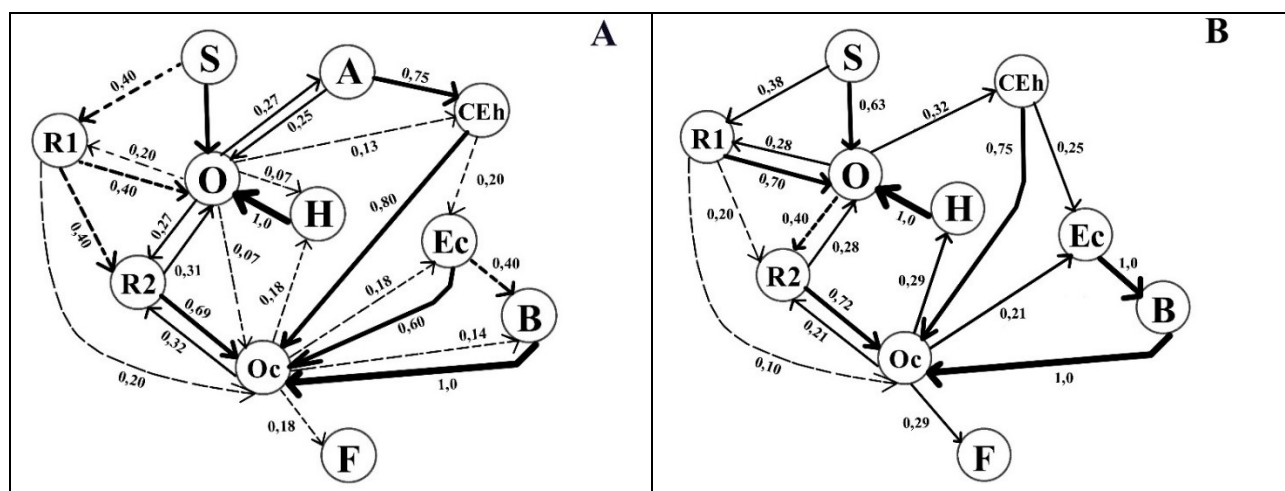


Рис. Последовательность элементов реализации строительного инстинкта *C. conica* (A) и *M. acalypha* (B). Обозначения: S – строительство рамы; R1 – строительство первых трёх радиусов; R2 – строительство остальных радиусов; O – отдых вне центра; Oc – отдых в центре; H – плетение вспомогательной спирали; CEh – плетение ловчей спирали с одновременным поеданием вспомогательной; A – оплетение одного из секторов; Ec – поедание центра; B – оплетение центра; F – завершение строительства. Над стрелками указаны вероятности перехода; толщина стрелок отображает величину вероятности.

Общий алгоритм строительства предполагает последовательное строительство рамы (рис. 1, S), строительство радиусов (R1, R2), плетение вспомогательной спирали (H), плетение ловчей спирали с одновременным поеданием вспомогательной (CEh), поедание нитей

центральной зоны сети (Ес), её повторное оплетение (В) и отдых в центре (Ос). Переход от одного шага к следующему происходит только по завершении этапа, между всеми фазами обязательно следует отдых.

Первым этапом постройки сети у обоих видов пауков является строительство рамы. Далее в 60–70% случаев пауки отдыхают вне центра сети, либо приступают к постройке первых трех радиальных нитей (радиусов). Следующий этап постройки неодинаков у изученных видов: самки *C. conica* после постройки первых трех радиусов переходят либо к отдыху вне центра сети, либо к постройке остальных радиусов с равной вероятностью, самки *M. acalypha* чаще выбирают отдых. В процессе достройки радиусов пауки иногда отдыхают в центре ловчей зоны.

Когда радиусы построены, пауки переходят к следующему этапу: строительство вспомогательной спирали (Н), самки *M. acalypha* перед этим отдыхают в центре сети, а *C. conica* – вне центра. Строительство вспомогательной спирали обязательно завершается отдыхом вне центра сети.

Далее происходит строительство клейкой спирали с одновременным поеданием вспомогательных нитей. При этом у *C. conica* сначала оплетается отдельный сектор (А), у *M. acalypha* этот этап отсутствует.

Фаза поедания центра перетекает в отдых в центре сети у *C. conica*, самки *M. acalypha* заплетают центр сети после поедания сразу, без отдыха. Завершается строительство ловчей сети отдыхом в центре сети. В среднем процесс строительства сети занимает приблизительно 5,8 часов.

Отдых в центре сети (Ос) практически с равной вероятностью переходит в фазу строительства вспомогательной спирали или в фазу поедания центра, если строительство ловчей зоны окончено. После строительства вспомогательной спирали особи данного вида, как и представители *Cyclosa conica*, переходят к отдыху вне центра. Строительство ловчей спирали и поедание вспомогательной, скорее всего, повлечёт за собой отдых особи в центре, после чего паук поедает центр и оплетает его. Строительство также завершается отдыхом в центре.

Стоит отметить, что, пусть вероятность одного из этапов больше, чем другого, начало некоторых этапов невозможно без предварительного завершения предыдущих.

В целом, строительное поведение *Cyclosa conica* и *Mangora acalypha* схоже, но имеет ряд различий. Например, представители *C. conica* в большинстве своём имеют в алгоритме строительства специфический этап А, отсутствующий у *M. acalypha*. Оплетение центра у *M. acalypha* происходит без предварительной стадии отдыха в центре. Стоит отметить, что представители *C. conica* после этапа О могли позволить себе вернуться в центральную зону и перейти к этапу Ос, в то время как у *M. acalypha* такого не наблюдалось.

В результате исследования мы описали схему стереотипного поведения при строительстве ловчей сети у кругопрядов *Cyclosa conica* и *Mangora acalypha*. Между стереотипами двух видов, обитающих в одном местообитании и принадлежащих к одной размерной группе обнаружены различия. Также обнаружены различия в расположении сетей в пределах ярусов: оба вида строят сети в кустарниках и нижней части древесного яруса, но выбирают для своих сетей разные субстраты. Так, особи *C. conica* предпочитали кустарники жимолости и низкие деревья, строя сети в пространстве между ними. Сети *M. acalypha* часто можно было заметить на травянистых растениях, таких, как высохшая крапива, а также на ветвях деревьев. Оба вида также встречались на кизильнике. В целом, сети *M. acalypha* располагались немного ниже, чем у *C. conica* (на 10–15 см).

Библиографический список

1. Михайлов К.Г. Общая арахнология. Краткий курс. Часть 2. Пауки: морфология, анатомия, биология. Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2012. 58 с.
2. Hose G.C. James J.M. Gray M.R. / Spider webs as environmental indicators. *Environmental Pollution* 120, 2002. 725–733
3. Benamu M.A. Schneider M. I. Gonzalez A. Sanchez N. E. Short and long-term effects of three neurotoxic insecticides on biological and behavioural attributes of the orb-web spider *Alpaida veniliae* (Araneae, Araneidae): implications for IPM programs. *Ecotoxicology*, 2013, 22:1155–1164
4. Foelix R.F. *Biology of spiders*, 2nd ed. p. cm. Oxford University Press, 2016. 310 p.
5. Иванов А.В. Пауки, их строение, образ жизни и значение для человека. Издательство Ленинградского университета, 1965. 304 с.
6. Robinson M.H. *Units of Behavior and Complex Sequences in the Predatory Behavior of *Argiope argentata* (Fabricius): (Araneae: Araneidae)*. Washington: Smithsonian institution press, 1971. 44 p.

О НАХОДКАХ ВОДЯНОГО УЖА *NATRIX TESSELLATA* (LAURENTI, 1768) НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ

Галиулин Д.М.¹, Печенкина К.О.^{1,2}, Четанов Н.А.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия

Аннотация. Приведен отчет об обнаружении нескольких особей водяного ужа *Natrix tessellata* на территории Пермского края. Это первая регистрация вида для региона. Образцы обнаружены вблизи зимовальных убежищ. Представлены данные морфометрии и термобиологии. Дано геоботаническое описание места отлова. Среди других рептилий, населяющих местонахождение, отмечены обыкновенный уж *Natrix natrix*, обыкновенная гадюка *Vipera berus*.

Ключевые слова: водяной уж, *Natrix tessellata*, новое местообитание

FINDINGS OF THE DICE SNAKE *NATRIX TESSELLATA* (LAURENTI, 1768) IN THE TERRITORY OF THE PERM KRAI

Galiulin D.M.¹, Pechenkina K.O.^{1,2}, Chetanov N.A.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Perm State Humanitarian Pedagogical University, Perm, Russia

Abstract. The article is devoted to reporting on the discovery of several individuals of the grass snake *Natrix tessellata* on the territory of the Perm Krai. This is the first registration of the species for this area. Samples were caught near wintering shelters. The paper presents morphometry and thermobiology data. It provides a geobotanical description of the capture location. Among other reptiles inhabiting this location, there are noted grass snake *Natrix natrix* and common European viper *Vipera berus*.

Keywords: dice snake, *Natrix tessellata*, new habitat

Согласно ранее проведенным исследованиям [1, 2, 3, 4, 5] на территории Пермского края достоверно обитают шесть видов рептилий: 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). При проведении ежегодных маршрутных учетов в окрестностях пос. Ергач Кунгурского района в весенне-летний период 2019-2022 гг. нами несколько раз были обнаружены змеи, по морфологическим признакам резко отличающаяся от представителей офидиофауны региона.

Исходя из отличительных морфологических черт, мы пришли к выводу, что выловленные змеи – представители вида водяной уж *Natrix tessellata* (Laurenti, 1768).

Северная граница ареала этого вида проходит через Поволжье [6]. На данной территории водяной уж встречен в Башкортостане, в Оренбургской, Самарской, Саратовской и Ульяновской областях. В Волжско-Камском бассейне вид достигает северного предела распространения. Однако на территории Пермского края он ни разу не отмечался, а ближайшие описанные места обитания расположены в сотнях километров к югу от описываемых нами находок.

Так, зафиксировано наблюдение трёх особей на юге республики Башкортостан [7]. Описано место обитания вида на севере Самарской области [8].

В Пермском крае с 2019 по 2022 годы было зафиксировано четыре находки особей водяного ужа *Natrix tessellata*, имеющих значительные различия морфологии, всего 1 самец и 3 самки, все меланистической окраски. Ранее находки считались случайными, вследствие выпуска в природу особей, привезенных из других регионов. Однако можно предположить наличие пусть и небольшой, но относительно устойчивой группы особей, способной сохраняться достаточно длительное время.

Для выловленных змей измерялись следующие параметры: длина тела (*L.corp.*), длина хвоста (*L.cd.*), масса, температура тела в трёх точках (пищевод, середина спины, середина живота), а также микроклиматические параметры в месте отлова (температуры субстрата и приземного воздуха, относительная влажность воздуха и освещённость).

Температуры измерялись с помощью терморезистора МТ-54, отградуированного по электронному термометру Chektemp. Относительная влажность воздуха фиксировалась термогигрометром ИВТМ-7М. Уровень освещённости регистрировался комбинированным прибором для измерения оптического излучения ТКА – 01/3.

Рассмотрим подробнее каждую из находок в хронологической последовательности. Детальная информация по всем находкам представлена в сводной таблице.

Первая находка самки водяного ужа совершена 5 мая 2019 года в 10:54 студенткой биологического факультета ПГНИУ Викторией Савиновой. Место отлова (57.49695° с.ш., 56.72356° в.д.) располагалось неподалеку от свалки бытовых отходов и предполагаемого зимовального убежища обыкновенного ужа.

7 мая 2021 года в 11:18 и 12:13 на расстоянии около 200 м друг от друга были обнаружены самец (57.49617° с.ш., 56.72668° в.д.) и самка (57.49640° с.ш., 56.72924° в.д.) соответственно. Оба места располагаются вблизи выходов гипса и известняка, которые могут служить в роли убежищ, как временных, так и зимовальных.

8 мая 2022 г. в 12:37 в окрестностях посёлка Ергач была обнаружена самка водяного ужа при выходе из убежища, предположительно после зимовки. Внутри убежища зафиксирована температура 11,0°C и влажность 45,0%.

Для находки номер 4 составлено подробное морфологическое описание (рис). Масса змеи составила 74 г, длина туловища с головой (*L. corp.*) – 595 мм, длина хвоста (*L. cd.*) – 150 мм, количество чешуек вокруг середины туловища (*Sq.*) – 19, число вентральных щитков (*Ventr.*) – 185, анальный щиток (*A.*), разделенный – 1/1, число подхвостовых щитков (*Scd.*) – 68 пар, число верхнегубных щитков (*Lab.*) справа – 8, слева – 8, нижнегубных щитков справа – 9, слева – 9, межчелюстных и подбородочных – по 1, количество передних и задних нижнечелюстных справа и слева – по 1, височных щитков (*Temp.*) в первом и втором рядах спра-

ва – 1 + 2, слева – 1 + 2, причём слева второй ряд значительно менее развит, число заглазничных щитков справа – 4, слева – 4, предглазничных справа – 3, слева – 3, количество предлобных, скуловых, задненосовых и передненосовых справа и слева – по 1. Верхняя часть туловища окрашена в черный цвет, на нижней части заметны желтоватые пятна на чёрном фоне.

Таблица – Сравнительная характеристика находок водяного ужа

№ находки	1	2	3	4
Дата, время поимки	05.05.2019, 10:54	07.05.2021, 11:18	07.05.2021, 12:13	08.05.2022, 12:37
Координаты	57.49695 с.ш., 56.72356 в.д.	57.49617с.ш., 56.72668 в.д.	57.49640с.ш., 56.72924 в.д.	57.496172с.ш., 56.726689 в.д.
Пол	♀	♂	♀	♀
<i>L. corp.</i> , мм	655	590	570	595
<i>L. cd.</i> , мм	160	150	150	150
Масса, г	–	75	82,4	74
Температура субстрата, °С	24,2	31	28,5	23,6
Температура приземного воздуха, °С	23,1	23,2	31,2	23,5
Температура пищевода, °С	24,7	23,4	37,7	26,1
Температура спины, °С	22,3	–	–	20,8
Температура брюха, °С	22,3	–	–	20,4
Относительная влажность воздуха, %	59,0	27,0	21,8	20,3
Освещенность, Вт/м ²	156,5	38,5	344,3	332,8



Рис. Щиткование головы водяного ужа

Место данной поимки (57.496172° с.ш., 56.726689° в.д., 135 м над ур. м.) вплоть до нескольких метров совпадает с находкой от 7 мая 2021 года и относится к Кунгурской лесостепи – самой северной ковыльной лесостепи в Европе [9]. Так как в данном биотопе было три находки в разные годы, было принято решение провести подробное описание участка.

Змеи были отловлены на склоне холма, занятого сосняком со смешанным подростом (*Betula pendula* Roth, *Pinus sylvestris* L., *Acer negundo* L., *Ulmus laevis* Pall., *Populus tremula* L., *Salix* sp.) и подлеском (*Padus avium* Mill., *Chamaecytisus ruthenicus* (Fisch. ex Woloszcz.) Kláskova, *Juniperus communis* L.). 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. Большинство растений представлено в вегетативной фенофазе.

Среди других рептилий, населяющих место отлова, ежегодно массово регистрируется обыкновенный уж *Natrix natrix* (Linnaeus 1758) в период формирования клубков, использующий, по всей видимости, меловые и известняковые отложения в качестве зимовальных убежищ, а их окрестности для дальнейшего размножения.

Симпатрия данных видов отмечается довольно часто [10], в том числе и для Поволжья [11], однако литературные данные об условиях совместного обитания или общих зимовальных убежищах найти не удалось.

Описанная точка отлова расположена за пределами достоверно известного ареала и располагается на значительном расстоянии от ранее описанных. Таким образом, в случае, если видовая принадлежность подтвердится, описанное место обнаружения водяного ужа можно считать самым северным на настоящий момент достоверным местом обитания.

Как уже упоминалось ранее, разумно предположить, что группа особей могла быть намеренно или случайно интродуцирована и, в дальнейшем, успешно акклиматизироваться.

Библиографический список

1. Юшков Р.А., Воронов Г.А. Амфибии и рептилии Пермской области: Предварительный кадастр. – Пермь: Изд-во Пермского ун-та, 1994. – 158 с.
2. Животные Прикамья: учебное пособие / ред. А. И. Шепель. –Пермь: Книжный мир, 2001 – Кн. 2: Позвоночные / А. И. Шепель [и др.]. – 2001. – 166 с.
3. Бакиев А.Г., Четанов Н.А. Об истории изучения герпетофауны Пермского края // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2011. – №2. – С. 31–43.
4. Четанов Н.А., Литвинов Н.А. К вопросу о жизненных стратегиях пресмыкающихся Камского Предуралья // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 5
5. Литвинов Н.А., Четанов Н.А., Ганщук С.В. Амфибии и рептилии Камского Предуралья. – Пермь: Астер Диджитал, 2023. – 242 с.
6. Бакиев А.Г., Гаранин В.И. и др. Змеи Волжско-Камского края. – Самара. Изд-во Самарского научного центра РАН, 2004. – 192 с.
7. Яковлев А.Г., Сабирзянов И.Р., Яковлева Т.И., Бакиев А.Г. Водяной уж *Natrix tessellata* в Башкортостане: первое достоверное местообитание // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2016. – Т. 25, № 4. – С. 90–93.
8. Кленина А.А. Водяной уж и узорчатый полоз на северных границах ареалов: новые данные из Шигонского района Самарской области // Самарская Лука: проблемы региональной и глобальной экологии. – 2019. – Т. 28, № 2. – С. 287–289.

9. Овеснов С.А. Кунгурская лесостепь: феномен или фантом? // Ботанические исследования на Урале: материалы регион. с междунар. участием науч. конф., посв. памяти П.Л. Горчаковского. Пермь, 2009. С. 270–275.
10. Hutinec B.J., Mebert K. Ecological partitioning between dice snakes (*Natrix tessellata*) and grass snakes (*Natrix natrix*) in southern Croatia // *Mertensiella*. – 2011. – Т. 18. – С. 225–233.
11. Кириллов А.А., Кириллова Н.Ю. Сравнительный анализ гельминтофауны *Natrix natrix* и *Natrix tessellata* (Reptilia, Colubridae) национального парка «Самарская Лука» (Россия) // *Nature Conservation Research. Заповедная наука*. – 2019. – №4. – С. 12–25.

НОВЫЕ ДАННЫЕ К ЭКОЛОГИИ РЕДКИХ ВИДОВ ОФИДИОФАУНЫ ЖИГУЛЁВСКОГО ЗАПОВЕДНИКА

Князева Е.В.¹, Четанов Н.А.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Пермский государственный гуманитарно-педагогический университет, Пермь, Россия

Аннотация. В статье приведён анализ пространственного распределения и соотношения полов у трёх редких видов офидиофауны Жигулёвского заповедника в естественных и антропогенных местообитаниях. Для узорчатого полоза выявлено преобладание самок в естественных местообитаниях и самцов – в антропогенных. Определена плотность населения змей, отмечено неравномерное распределение по изучаемой территории, наличие отдельных предпочитаемых участков. Помимо этого, получены данные по суточной активности данных видов.

Ключевые слова: обыкновенная медянка, узорчатый полоз, обыкновенная гадюка, экология

NEW DATA ON THE ECOLOGY OF RARE OPHIDIOFAUNAL SPECIES ZHIGULIOVSKY RESERVE

Knyazeva E.V.¹, Chetanov N.A.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Perm State Humanitarian Pedagogical University, Perm, Russia

Abstract. The article provides an analysis of the spatial distribution and sex ratio of three rare species of ophidiofauna of the Zhiguli Nature Reserve in natural and anthropogenic habitats. For the patterned snake, a predominance of females in natural habitats and males in anthropogenic habitats was revealed. The population density of snakes was determined, uneven distribution over the territory and the presence of preferred areas were noted. Data on the daily activity of species were obtained.

Keywords: *Coronella austriaca*, *Elaphe dione*, *Vipera berus*, ecology

На территории ФГБУ «Жигулёвский государственный природный биосферный заповедник им. И.И. Спрыгина» обитает 8 видов рептилий: европейская болотная черепаха *Emys orbicularis* (Linnaeus, 1758), прыткая ящерица *Lacerta agilis* (Linnaeus, 1758), живородящая ящерица *Zootoca vivipara* (Lichtenstein, 1823), колхидская веретеница *Anguis colchica* (Nordmann, 1840), обыкновенная медянка *Coronella austriaca* (Laurenti, 1768), узорчатый полоз (*Elaphe dione* Pallas, 1773), обыкновенный уж *Natrix natrix* (Linnaeus, 1758), гадюка обыкновенная *Vipera berus* (Linnaeus, 1758).

Из них в Красную книгу Самарской области внесены три вида змей – обыкновенная медянка, узорчатый полоз и обыкновенная гадюка. Всем трём видам присвоена III категория

редкости – редкий вид. Два первых вида относятся к семейству ужовых (*Colubridae*) и не представляют опасности для человека, однако являются слабоизученными и часто подвергаются прямому уничтожению и нарушению местообитания из-за неосведомленности населения [4].

У видов существуют приоритеты в выборе биотопов. Обыкновенная медянка встречается на опушках светлых, хорошо прогреваемых лесов, вырубках, в кустарниковых зарослях, открытых степях и горных лугах, на обочинах дорог, склонах с каменистыми россыпями. Узорчатый полоз населяет лесные и степные биотопы, предпочитает поросшие кустарником и травой каменистые склоны гор и оврагов [1, 2]. Достаточно часто эти два вида могут обитать синтопически. Обыкновенная гадюка населяет хвойные и смешанные леса с полянами, болотами, зарастающими гарями, берега рек, озёр и ручьёв, каменистые насыпи. Встречи с ними приурочены к опушкам, вырубкам, просекам, дорогам. Как правило, оседлы. Все три вида поднимаются в горы. В качестве убежищ используют норы грызунов, пустоты под камнями, трещины в почве и скалах [2, 6].

Медянка и полоз ведут дневной образ жизни, часы активности сходные (встречи на Самарской Луке фиксировались в 10–19 часов и 8–20 часов соответственно), степень активности гадюки зависит от погодных условий, змея может быть активна как в дневное, так и в ночное время [1].

В рамках проведения мониторинговых работ на территории Жигулёвского заповедника нами была поставлена следующая цель: изучение некоторых аспектов экологии редких видов офидиофауны Жигулёвского заповедника.

Материал и методика

Работа проводилась в мае-июле 2023 года на территории Жигулёвского государственного природного биосферного заповедника имени И.И. Спрыгина в Самарской области.

Учёт змей производился маршрутным методом. Маршрут был заложен в местах достоверных находок полоза и медянки сотрудниками заповедника в предыдущие годы: на территории с заброшенными постройками и на двух опушках Жигулёвских гор. Общая протяженность маршрута составила 6 км. Маршрут за время проведения исследования был пройден 36 раз. Ширина учётной полосы составила 5 м. Выход на маршрут производился в 8 часов утра и в 17 часов при отсутствии осадков и достаточном прогреве воздуха.

Встреченные особи отлавливались для определения пола и временного мечение с целью дальнейшей идентификации при повторном отлове. Определение пола производилось с помощью подсчёта брюшных щитков, количество которых у самок и самцов не перекрывается и является постоянным в течение всей жизни. Самцы обыкновенной медянки имеют не более 178 брюшных щитков, самки – не менее 182. Самцы узорчатого полоза – не более 195 щитков, самки – более 200 [3]. Гадюки не отлавливались из соображений безопасности, поэтому половой состав для них не приводится. В случае невозможности отлова отмечалась встреча с указанием числа увиденных особей для определения плотности населения. Плотность населения определялась по следующей формуле:

$$N = x / (L \cdot h),$$

где N – плотность населения, особей/км²; x – число учтённых особей;
 h – ширина полосы обнаружения, км; L – суммарная длина маршрутов, км [5].

Результаты и обсуждение

Из проведённых 36 выходов на маршрут два оказались безрезультатными, ни одна змея не была встречена. Причиной могли служить неблагоприятные погодные условия (слишком низкая или слишком высокая температура, высокая влажность из-за недавно выпавших осадков), оказывающие решающее влияние на активность рептилий, поскольку для изучаемых змей оптимальными являются ясная погода без осадков в первой и второй половине дня или пасмурная погода в течение всего светового дня.

Всего за время исследования на маршруте было зафиксировано 64 встречи обыкновенной гадюки, 22 – обыкновенной медянки, 42 – узорчатого полоза. Отловлено 16 особей медянок (7 самок и 9 самцов), 24 – узорчатых полоза (14 самок и 10 самцов). В связи с территориальной привязкой принято считать, что встречено 8 особей обыкновенной гадюки, так как визуально опознаваемые особи встречались практически на одних и тех же участках во время утреннего и вечернего нагревания. Преобладание самок среди полозов можно связать с их большей тягой к хорошо прогреваемым участкам и меньшей подвижностью в связи с периодом развития яиц. Аналогично число повторно отловленных самок среди полозов преобладает над числом самцов, что так же объясняется их меньшей подвижностью из-за развития яиц.

Основная масса встреч змей была приурочена к каменистым, хорошо прогреваемым склонам гор и антропогенным постройкам с искусственными покрытиями (бетон) и укрытиями (фрагменты шифера, металлические листы), обладающими высокой теплоёмкостью. Некоторые особи были извлечены из-под укрытий.

Примечательно, что повторные отловы чаще производились на участках с антропогенными сооружениями, нежели среди естественных укрытий, что можно объяснить меньшей плотностью в антропогенных местообитаниях, тогда как естественные местообитания позволяют змеям быть более скрытными, а большее число индивидуальных встреч говорит о большей плотности.

Встречи медянок отмечались в период с 8:06 до 18:55 (в 19:00 обнаружена в укрытии), из чего следует, что активность наступала раньше, чем отмечается в литературе. Встречи полоза зарегистрированы с 8:19 до 19:07, что соответствует литературным данным. Встречи гадюки обыкновенной согласно Бакиеву с соавторами [1] могут происходить в любое время суток в зависимости от погодных условий, в нашем исследовании этот вид был наиболее пластичен по активности и встречался с 7:04 по 19:37. В целом утверждение о том, что у медянки наиболее короткий период активности, а у гадюки продолжительный, подтверждается в наших исследованиях.

Отметим, что все три вида змей проявляли выраженный двухпиковый характер активности, при этом утренний нагрев у полозов был более растянут по времени – особи встречались даже в 14 часов при ясной солнечной погоде на субстрате с высокой степенью освещённости.

По распределению на маршруте можно выделить пять удалённых друг от друга участков, в которых были отмечены змеи, примечательно, что в четырёх из них встречаются все три вида. Наличие достаточно большого расстояния между ними могло натолкнуть на мысль о частичной изоляции расстоянием между группировками, что подтверждалось и повторными отловами особей всех трёх видов в абсолютно тех же местах.

Однако повторная находка крупной беременной самки полоза на вершине соседней горы по сравнению с первой поимкой говорит о высокой мобильности змей, несмотря на период развития яиц. Причина такой миграции до конца не ясна, поскольку в месте первой находки существуют как подходящие места для откладки яиц, так и места для зимовки.

При определении плотности населения змей мы постарались дать минимальную и максимальную оценки.

При минимальной оценке плотности учитывались только индивидуальные особи и все совершённые выходы. В таком случае плотность населения обыкновенной медянки составляет примерно 7 особей/км², узорчатого полоза – 11, обыкновенной гадюки – 4.

При максимальной оценке плотности учитывались все встреченные особи и лишь успешные выходы. В этом случае плотность обыкновенной медянки примерно равна 11 особей/км², узорчатого полоза – 21, обыкновенной гадюки – 31.

Скорее всего, реальная оценка плотности населения видов лежит между двумя этими величинами, причём плотность неравномерна в связи с привязанностью змей к индивидуальным участкам.

Исходя из вышеизложенного, сделаны следующие выводы:

1. Представители офидиофауны по территории заповедника распространены неравномерно, существуют участки, по всей видимости, с оптимальными условиями обитания, где плотность змей высокая.
2. Плотность населения в естественных местообитаниях выше, чем в антропогенных. По половому составу в естественных местообитаниях у узорчатого полоза преобладают самки, а в антропогенных – самцы. Среди медянок такой зависимости не было обнаружено, самцы незначительно преобладают над самками в естественных местообитаниях.
3. Период активности обыкновенной медянки несколько шире, чем указано в литературе, но уже, чем таковой у узорчатого полоза и обыкновенной гадюки.

Хотелось бы выразить благодарность сотрудникам Жигулёвского заповедника и лично директору Р.А. Горелову, а также сотрудникам института экологии Волжского бассейна РАН г. Тольятти А.Г. Бакиеву и А.А. Клёниной за предоставление места для исследования и консультирование.

Библиографический список

1. Бакиев А.Г., Гаранин В.И., Литвинов Н.А., Павлов А.В., Ратников В.Ю. Змеи Волжско-Камского края. – Самара: Изд-во СамНЦ РАН, 2004.
2. Банников А.Г., Даревский И.С., Рустамов А.К. Земноводные и пресмыкающиеся СССР – М.: Мысль, 1971. – С. 303.
3. Кленина А.А. К морфологии уховых змей Среднего Поволжья. Сообщение 1. Определение пола молодых особей / А.А. Кленина, А.Г. Бакиев, А.В. Павлов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. – 2019. – № 1 (25). – С. 61–71.

4. Красная книга Самарской области. Т. 2. Редкие виды животных / Под ред. С.В. Симака, А.Е. Кузовенко, С.А. Сачкова и А.И. Файзулина. – Самара: Издательство Самарской государственной областной академии Наяновой, 2019. – 354 с.
5. Шляхтин Г.В., Голикова В.Л. Методика полевых исследований экологии амфибий и рептилий. – Саратов: Изд-во Саратовского ун-та, 1986. – 79 с.
6. Юшков Р.А., Воронов Г.А. Амфибии и рептилии Пермской области: Предварительный кадастр. Пермь: Изд-во Перм. ун-та., 1994. 158 с.

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ НА ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РЕКИ НИЖНИЙ ДОН

Гречка Е.А.

Институт сферы обслуживания и предпринимательства (филиал) ДГТУ, Шахты, Россия

Аннотация. В работе рассмотрено экологическое состояние реки Нижний Дон Ростовской области. Представлены статистические данные о загрязнении выбранного участка загрязняющими веществами. Изложены результаты анализа качества воды участка реки Нижний Дон, проведенного в 2022 году. Проанализированы промышленные объекты, находящиеся в непосредственной близости от водного объекта и оказывающие на него воздействие.

Ключевые слова: сточные воды, вредные отходы, водное пространство, промышленные предприятия, качественный состав

THE IMPACT OF INDUSTRIAL ENTERPRISES ON THE ECOLOGICAL STATE OF THE NIZHNY DON RIVER

Grechka E.A.

Institute of Service and Entrepreneurship (branch) of DSTU, Shakhty, Russia

Abstract. The paper considers the ecological state of the Nizhny Don River in the Rostov region. Statistical data on the contamination of the selected site with pollutants are presented. The results of the analysis of the water quality of the Lower Don River section, conducted in 2022, are presented. Industrial facilities located in the immediate vicinity of a water body and affecting it are analyzed.

Keywords: waste water, harmful waste, water space, industrial enterprises, qualitative composition

Загрязнение бассейна Нижнего Дона сточными водами, является серьезной экологической проблемой Ростовской области [1], поскольку данный регион выступает важным индустриальным и сельскохозяйственным центром Российской Федерации. На его территории расположены предприятия машиностроения, угледобычи, металлургии, химии, пищевой промышленности, сельского хозяйства и других отраслей. Государственный южный порт г. Ростова-на-Дону и соседние населенные пункты, находящиеся в устьевой области, сосредоточены вокруг комплекса хозяйственных и промышленных предприятий. Поэтому в водное пространство реки производится сброс сточных вод предприятий, посредством поверхностного стока, что в последующем негативно сказывается на качестве воды.

При попадании в природные воды загрязняющих веществ происходят трансформация физических характеристик среды, таких как мутность, изменение цвета, появление неприятных запахов и вкусов [2]. В результате загрязнения эти воды становятся непригодными для питья, купания, занятий водными видами спорта и использования в технических процессах.

Сбрасываемые в поверхностные водные объекты вредные отходы становятся источниками загрязнения. Гидробионты подвергаются негативному воздействию от загрязнения водоемов, что нарушает пищевые цепи живых организмов. Применение загрязненной воды для полива может привести к отравлению продукции сельхозпроизводителей, делая ее опасной для людей и животных. Согласно отчету Росводресурсов [3], в 2022 году количество сброшенных сточных вод на территории Ростовской области увеличилось по сравнению с предыдущим годом. Общий объем сброшенных сточных вод достиг 198 млн м³, как показано на рис. 1.



Рис. 1. Объём загрязнённых сточных вод на территории Ростовской области за период 2019–2022 гг.

Для проведения исследования качества воды, были отобраны пробы из участка реки, расположенного в границах Нижнего Дона выше водозабора г. Ростов-на-Дону в 0,5 км ниже устья р. Аксай. Устье реки Дон принадлежит к форме бесприливной устьевой области с многорукавной дельтой. (рис. 2)

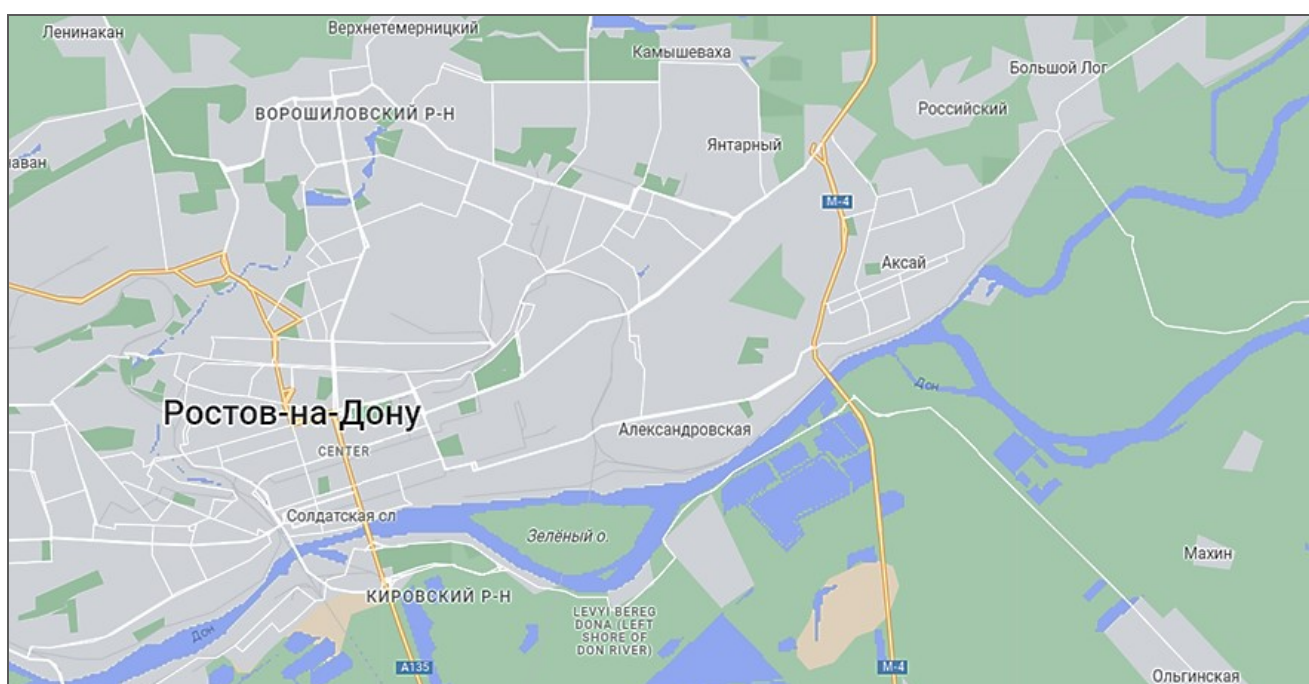


Рис. 2. Участок отбора проб воды из Нижнего Дона

По показателям, изложенным в Экологическом вестнике Дона [4], по истечению 2021 года величина нефтяного загрязнения возросла, в сравнении с двумя предшествующими годами и составила 0,07 мг/л. Стоит отметить, что концентрации нефтепродуктов в водах Нижнего Дона сохраняются на близком уровне. (рис. 3)

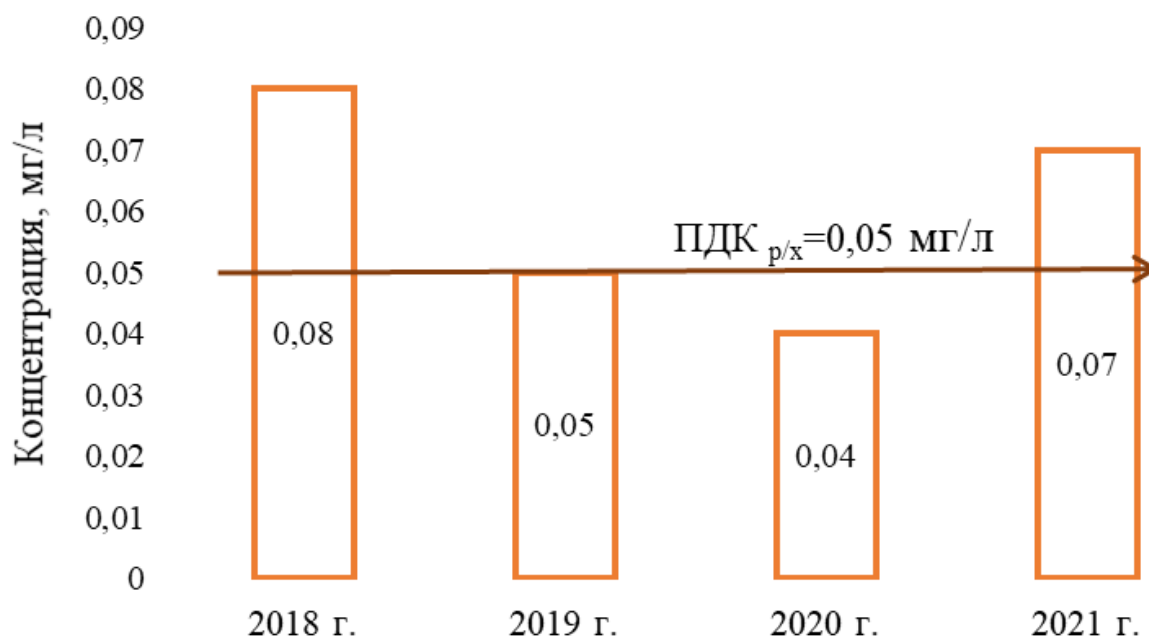


Рис. 3. Концентрации нефтепродуктов в водах Нижнего Дона за 2018–2021 гг.

Первостепенным источником поступления нефтяных компонентов в водное пространство Нижнего Дона выступает судоходство. Вместе со сточными водами судоходных компаний река подвержена загрязнению растворами хлорпрепаратов, используемых для дезинфекции судовых систем. Важным является то, что такие сбросы осуществляются практически ежедневно, а при некоторых условиях даже круглосуточно, что проявляется не только в пагубном влиянии на биоту, но и повышает риск загрязнения прибрежной зоны.

В настоящее время бассейн реки уже находится в крайне неудовлетворительном состоянии и водный путь функционирует на пределе своих возможностей, вследствие чего происходит обмеление. В свою очередь судоходные компании становятся подвержены значительным экономическим убыткам, поскольку вынуждены организовывать паузу судов, а именно перегрузку груза с одного речного судна на другое. Это обусловлено неспособностью судов преодолеть пережат во время маловодья.

В процессе своей деятельности промышленные предприятия используют воду для применения в разнообразных технологических процессах, именно для оперативного забора воды такие объекты расположены в непосредственной близости от водоёмов. И одними из таких отраслей производства являются металлургические заводы. Современное металлургическое предприятие на производство 1 тонны стального проката расходует около 180–200 м³ воды. К основным загрязняющим веществам в сточных водах данных производств относятся: нефтепродукты, свинец, медь, хлориды и сульфаты.

Непосредственно на качественный состав воды из реки Дон также влияют сточные воды предприятия «Ростовводоканал». В начале сентября 2023 года стало известно, что предприятие сбрасывало в реку такие загрязняющие вещества, как: аммоний-ион, нитрит-

ион, нитрат-ион, магний, кальций, фенол, кадмий, ХПК. Специалистами Росприроднадзора [5] было установлено превышение допустимых концентраций в отобранных пробах воды.

Нарушение АО «Ростовводоканал» требований к охране водного объекта привело к загрязнению Дона, стоит отметить, что причиненный ущерб реке Дон в денежном эквиваленте составил 117 263 103 рублей [6].

При проведении исследования исследования качества воды участка р. Дон, расположенного ниже устья пр. Аксай и устья р. Темерник в 2022 году были обнаружены превышения некоторых из перечисленных и иных показателей, а именно: БПК₅, Нефтепродуктов и Фосфат-ионов.

Гидрохимический анализ проб воды выбранного участка Нижнего Дон был осуществлён при помощи комплектов оборудования производства компании ЗАО «Крисмас +» [7]. Результаты анализа сопоставлены с СанПиН 2.1.3685-21 [8] и представлены в таблице.

Таблица – Результаты анализа качества воды участка р. Нижний Дон

№ п\п	Показатель	Полученные результаты	ПДК для вод хозяйственно-бытового назначения
1	БПК ₅	5,76 мг О ₂ /л	4 мг О ₂ /л
2	БПК _{полн}	4,4 мг О ₂ /л	6 мг О ₂ /л
3	Растворённый кислород (РК)	8,53 мг/л	не менее 4 мг/л
4	рН	7,9	6,0-9,0
5	Хлориды	78,5 мг/л	350 мг/л
6	Сульфат-ион	256 мг/л	500 мг/л
7	Железо общее	0,1 мг/л	0,3 мг/л
8	Алюминий	0 мг/л	0,2 мг/л
9	Нефтепродукты	0,5 мг/л	0,3 мг/л
10	Аммоний-ион	0,09 мг\л	1,5 мг/л
11	Медь	0 мг/л	1,0 мг/л
12	Фосфат-ионы	0,07 мг/л	0,04 мг/л
13	Нитраты	0,7 мг/л	45,0 мг/л
14	Нитриты	0,03 мг/л	3,0 мг/л

Химическая, сельскохозяйственная и пищевая промышленность являются основными источниками фосфатов и их соединений в сточных водах.

Помимо фосфатов каждая из упомянутых отраслей характеризуется определенными выбросами загрязняющих веществ, превышающими предельно-допустимые нормы.

Так находящийся в близости от Нижнего Дона Маслоэкстракционный завод в процессе мокрого шротулавления, охлаждения и конденсации парогазовоздушной смеси в барометрических конденсаторах, мойки масла, стирки салфеток фильтр-прессов и мойки оборудования, является источником поступления в реку: взвешенных веществ, ХПК, ПАВ, жиров, сухого остатка и нестабильного рН и БПК.

Заводы по производству сельскохозяйственной техники осуществляют сбросы в реку промышленных сточных вод, содержащих различные химические вещества, такие как: масла, смазки, растворители, красители и другие отходы производства. Эти вещества могут быть токсичными и негативно влиять на экосистемы водных ресурсов, нанося ущерб здоровью и размножению рыб. Попадание этих веществ на покровные органы рыб может явиться причиной возникновения раздражения, инфекции и даже гибели. Немало важным также является изменение физических свойств воды, которое может сказаться на пищевой цепи в водоеме и нарушить естественные экосистемы.

Кроме загрязняющих веществ в поверхностных водах зачастую содержатся ядовитые соединения и продукты распада пластика. В дальнейшем от мусора страдают речные обитатели, которые не только путаются в пакетах и рыбной леске, но и зачастую воспринимают микропластик в качестве пищи. Попадая на поверхность воды мусорные затрудняют рыбам доступ к кислороду, что способствует уменьшению света, улавливаемого планктоном и водорослями, тем самым снижая количество растворённого кислорода в воде.

Река Дон является важным природным объектом хозяйственного значения водных ресурсов Ростовской области. Загрязняющие вещества, попадающие в реку, могут повлиять на водные организмы, вызвав изменение состава и плотности популяции, а в некоторых случаях даже привести к исчезновению некоторых видов. Река Дон играет важную роль не только для водоснабжения, но и служит популярным местом отдыха с пляжами и рекреационными возможностями. Поэтому мониторинг и контроль качества воды, является важной задачей для обеспечения безопасности водопотребления жителей региона, а также для сохранения экосистемы реки и окружающей природной среды.

Библиографический список

1. Костромина Е.И. Экологическая оценка качества воды на участке реки Дон / Е.И. Костромина, Е.А. Гречка // Научная весна-2023. Технические науки: сборник научных трудов: научное электронное издание, Шахты, 15–19 мая 2023 года / Институт сферы обслуживания и предпринимательства (филиал) ДГТУ в г. Шахты. – Шахты: ИСОиП (филиал) ДГТУ в г. Шахты, 2023. – С. 114-121.
2. Занина И.А. Проблемы малых рек бассейна реки Дон / И.А. Занина, Е.Г. Берестова // Научная весна – 2016: Материалы: Научное электронное издание, Шахты, 20 мая 2016 года. – Шахты: Институт сферы обслуживания и предпринимательства (филиал) Донского государственного технического университета в г. Шахты, 2016. – С. 209–214.
3. Федеральное агентство водных ресурсов: официальный сайт. – Москва. – URL: <https://voda.gov.ru/favr/contacts/> (дата обращения: 11.08.2023).
4. Экологический вестник Дона // Министерство природных ресурсов и экологии Ростовской области: информационный портал. – URL: <https://cloud.mail.ru/public/ynx9/gu8yarJa4/VESTNIK-inter2021.pdf> (дата обращения: 24.08.2023).
5. Федеральная служба по надзору в сфере природопользования (Росприроднадзор): официальный сайт. – Москва. – URL: <https://rpn.gov.ru/> (дата обращения: 09.09.2023)

6. НИА «Экология» // 117 млн заплатит «Ростовводоканал» за загрязнение Дона. URL: <https://nia.eco/2023/09/08/69259/> (дата обращения: 13.09.2023)
7. 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.
8. 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.

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЁННОСТИ РОДНИКОВЫХ ВОД НЕФТЕПРОДУКТАМИ В ЛАНДШАФТАХ С РАЗНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ ИНДЕКСА ГЕМЕРОБНОСТИ

Гринчак О.А.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского, Брянск, Россия

Аннотация. Впервые исследовано содержание в водах родников г. Брянска нефтепродуктов. С применением ГИС-технологий построены геолого-гидрогеологические карты водосборных бассейнов родников и доказано, что наличие нефтепродуктов объясняется особенностями геологического строения природникового урочища и типом источника загрязнения, приуроченного к водосборной площади родника. Области питания родников, воды которых показали превышение концентрации нефтепродуктов, находятся на метагемеробной или полигемеробной территории. Для данных родников разработан экспрессный анализ для ведения систематического мониторингового исследования.

Ключевые слова: родники, индекс гемеробности, водосборный бассейн родника, нефтепродукты, Брянская область

ASSESSMENT OF THE DEGREE OF POLLUTION OF SPRING WATER WITH PETROLEUM PRODUCTS IN LANDSCAPES WITH DIFFERENT VALUES OF THE HETEROSITY INDEX

Grinchak O.A.

Bryansk State University named after Academician I.G. Petrovsky, Bryansk, Russia

Abstract. The content of petroleum products in the waters of springs in Bryansk was studied for the first time. Using GIS technologies, geological and hydrogeological maps of the springs' catchment basins were constructed and it was proven that the presence of petroleum products is explained by the peculiarities of the geological structure of the natural tract and the type of pollution source confined to the spring's catchment area. The feeding areas of the springs, the waters of which showed an excess concentration of petroleum products, are located in metagemerobic or polyhemeric territory. A rapid analysis has been developed for these springs to conduct a systematic monitoring study.

Keywords: springs, hemericity index, spring catchment area, petroleum products, Bryansk region

Определение следов нефти и продуктов её переработки в природных водах должно входить в перечень анализов для периодических мониторинговых исследований. Ряд работ

[Алферов, Яковенко, 2016; Aghinian, 2022.] подтверждают, что нефть и продукты её переработки относятся к числу наиболее распространённых и опасных веществ, загрязняющих поверхностные воды. Нефтепродукты (НП) – непостоянная смесь различных по природе компонентов, концентрации которых различаются на несколько порядков: низко- и высокомолекулярные предельные, непредельные алифатические, нафтоновые, ароматические углеводороды, кислородные, азотистые, сернистые соединения, а также ненасыщенные гетероциклические соединения типа смол, асфальтенов, ангидридов, асфальтеновых кислот. Под действием биологических, химических, физических процессов в объектах окружающей среды происходит быстрая трансформация НП.

Понятие «нефтепродукты» в гидрохимии условно ограничивается только углеводородной фракцией (алифатические, ароматические, алициклические углеводороды), согласно определению, впервые принятому Комиссией по унификации методов анализа природных и сточных вод стран-членов Совета экономической взаимопомощи (1968 г.) [Другов, Родин, 2000].

Согласно [Природные ресурсы и окружающая среда Брянской области, 2022], в 2021 отчётном году на территории Брянской области выявлено загрязнение подземных вод на 8 промышленных площадках предприятий, осуществляющих обращение с нефтепродуктами, на 6 полигонах ТБО, на 2 полях фильтрации (лагуны свиного комплекса). На предприятиях нефтяной промышленности содержание нефтепродуктов в грунтовых водах составляло от 0,11 мг/л до 50 мг/л (500 ПДК). Самые высокие содержания нефтепродуктов в грунтовых водах в пределах г. Брянска выявлены на территориях промыво-пропарочного поезда Вагонного депо «Брянск-Восточный», Брянской базы (раздаточный блок) и Центральной базы АО «Брянскнефтепродукт». (>500 ПДК).

Рассмотренные предприятия располагаются в радиусе более 1 км от водосборной площади ближайшего к ним родника (рис. 1), что позволяет нивелировать влиянием предприятий нефтяной промышленности на родниковые воды г. Брянска.

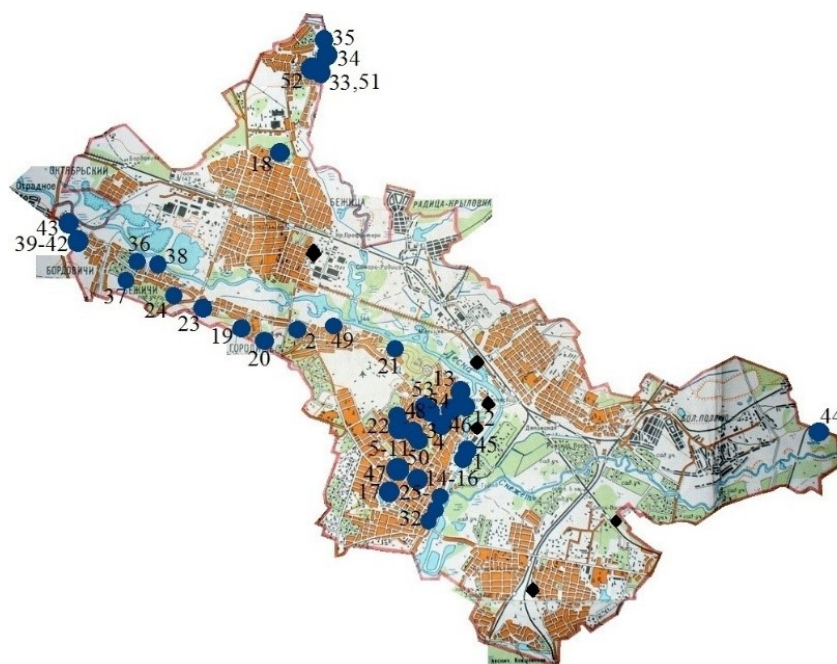


Рис. 1. Карта-схема родников г. Брянска (●) и предприятий нефтяной промышленности (◆)

Однако выявленное содержание НП на территории водоохранной зоны реки Десны не позволяет пренебречь анализом воды на наличие нефтепродуктов. В их присутствии вода приобретает специфический вкус и запах, изменяются её цвет, pH, ухудшается газообмен с атмосферой, нарушаются процессы самоочищения водоёма [Гидрохимические показатели..., 2010]. Следовательно, определение НП в природных водах должно входить в перечень анализов для периодических мониторинговых исследований.

Родники включены в государственную систему мониторинга водных объектов как «важные поверхностные водные объекты» [Водный кодекс РФ от 03.06.2006 № 74-ФЗ]. Следовательно, разработанную систему комплексного мониторинга родников Брянской области необходимо дополнить сведениями о наличии нефтепродуктов в воде.

Таким образом, цель настоящей работы – изучить количественное содержание нефтепродуктов в водах родников в границах крупной урбоэкосистемы (г. Брянск) и выявить зависимость концентрации поллютанта со степенью антропогенной преобразованности природникового урочища.

Для определения концентрации НП в родниковых водах нами использовался ИК-спектрофотометрический метод, обладающий слабой зависимостью аналитического сигнала от типа нефтепродукта, составляющего основу загрязнения пробы. Метод основан на экстракции НП из пробы органическим растворителем (CCl_4), очистке экстракта от полярных соединений методом колоночной хроматографии на оксиде алюминия и последующей регистрации ИК-спектра в области $2700\text{--}3200\text{ см}^{-1}$, обусловленного валентными колебаниями CH_3 - и CH_2 -групп алифатических и алициклических соединений и боковых цепей ароматических углеводородов, а также связей CH ароматических соединений. Методика анализа описана в пп. 3.1.9 методической части. Анализ проводился с использованием инфракрасного Фурье-спектрометра «ИнфралЮМ ФТ-02» в комплекте с программным обеспечением «СпектралЮМ».

Определение проводилось по группам родников согласно разработанной классификации экологического состояния родников и природниковых урочищ (табл. 1). Как видно из табл. 1, концентрация НП в родниках г. Брянска варьировалась от 0,105 до 0,873 мг/л (1,75ПДК). Отмечено, что изменение содержания НП объясняется не пространственным фактором, а степенью антропогенной нагрузки на природниковое урочище, в первую очередь, площадью загрузки родника.

Так как в воде опорных родников (№ 2, 12, 36, 37) было обнаружено повышенное содержание НП, то ставится актуальным вопрос о разработке экспрессного метода анализа для систематического мониторинга.

При анализе предлагаемым методом определяются неполярные и малополярные углеводороды (суммарное содержание алифатических, олефиновых, нафтеновых, ароматических соединений), составляющие обычно основную и наиболее характерную часть нефти и продуктов её переработки.

Метод основан на предварительной концентрации НП путём экстрагирования из водной среды неполярным растворителем – четырёххлористым углеродом в кислой среде при pH 3-4 с последующим анализом экстракта полуколичественным методом бумажной хроматографии, который основан на использовании различия коэффициентов сорбируемости ком-

понентов анализируемого раствора. Различные значения коэффициентов распределения обеспечивают разделение смеси в экстракте. Чувствительность обнаружения нефтепродуктов разработанным методом составляет 0,5 мг/л (значение ПДК).

Таблица 1 – Содержание нефтепродуктов в родниках г. Брянска

Номер и местоположение/ название родника	Степень гемеробности	Класс экологической безопасности	Нефтепродукты, мг/л
<i>ПДК</i>			<i>0,5</i>
1 – парк «Звёздный»	6	3	0,389
2 – ост. Памятник Болгарским Патриотам	7	3	0,873
3 – Памятник природы регионального значения «Верхний Судок»	3	2	0,279
5 – Памятник природы областного значения «Нижний Судок»	3	2	0,341
12 – Святой источник «Тихвинский»	7	4	0,549
13 – ул. Верхняя Лубянка	5	2	0,254
14 – источник «Подарь»	4	3	0,211
18 – мкр-н «Камвольный»	5	2	0,652
19 – пос. Городище, Святой источник	4	2	0,362
20 – пос. Городище, «Святой колодец»	5	3	0,184
23 – ул. Федюнского	6	3	0,511
24 – Совхозный проезд	4	2	0,352
25 – ул. Сакко и Ванцетти, Родник №1	6	3	0,398
30 – ул. Сакко и Ванцетти, Родник №7	6	3	0,367
33 – пос. Чайковичи, «Цыганский родник»	5	3	0,333
34 – пос. Чайковичи, «Чайковичский родник»	5	3	0,105
36 – пос. Бежицы, «Нижний родник»	7	4	0,679
37 – пос. Бежицы, «Верхний родник»	6	3	0,607
44 – пгт. Белые Берега	7	4	0,702
49 – пос. Городище	4	3	0,456
52 – Чайковичи «Цыганский колодец»	5	3	0,203
53 – ул. В. Сафроновой	3	2	0,216

Таблица 2 – Сравнение двух методов анализа на сходимость

Родник	Концентрация НП, мг/л			
	ИК	Экспресс-методом		
		V _{пробы} = 250 мл	V _{пробы} = 500 мл	V _{пробы} = 1 л
2	0,873	–	0,8	0,9
18	0,652	–	0,6	0,6
34	0,105	–	–	–

По результатам анализа растворов с известной концентрацией нефтепродуктов, приготовленных из ГСО, построили градуировочный график для определения массы нефтепродуктов в пробе (рис. 2).

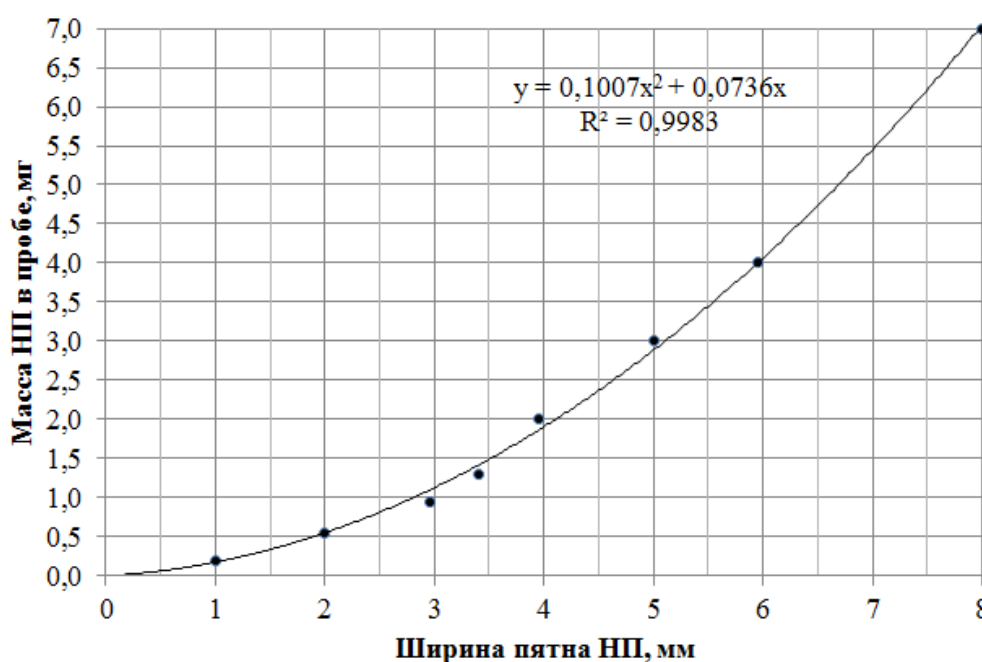


Рис. 2. Градуировочный график зависимости ширины пятна от массы нефтепродуктов в пробе

Концентрация нефтепродуктов в пробе воды рассчитывается по формуле:

$$C_{\text{НП}} = \frac{m_{\text{НП в пробе}}}{V},$$

где V – объём воды, взятой на анализ, мл; $m_{\text{НП в пробе}}$ – масса нефтепродуктов в пробе, найденная по градуировочному графику (рис. 2), мг.

Таким образом, для родников, имеющих 4 класс экологического состояния, согласно алгоритму пп. 4.8, и расположенных на метагемеробных и полигемеробных ландшафтах, необходимо включить в перечень определяемых мониторинговых показателей анализ на нефтепродукты по вышеприведённой методике.

С применением ГИС-технологий были построены геолого-гидрогеологические карты водосборного бассейна изученных родников (рис. 3).

Область питания родников, воды которых показали превышение концентрации НП, находится на метагемеробной или полигемеробной территории. Коэффициент корреляции между параметрами «степень гемеробности: концентрация нефтепродуктов» составляет 0,654, что указывает на прямую корреляционную связь средней силы.

Природниковое урочище родника №18 приходится на α -эвгемеробную территорию (степень гемеробности 5), характеризующую 2-м классом экологического состояния. Однако в воде обнаружено превышение ПДК по НП в 1,3 раза. Вклад в повышенное содержание НП в воде родника №18 вносит предприятие полного цикла ООО «Брянский камвольный комбинат», также в границах водосборного бассейна функционирует заправка Роснефть и ООО

«Брянская газовая компания», оказываемая комплекс услуг: круглосуточный шиномонтаж, мойка-самообслуживание, стоянка грузовых и легковых автомобилей и т.д. Таким образом, для данного родника необходимо учитывать большую площадь области питания и дальнейшее расположение водосборного бассейна и зоны разгрузки.



Рис. 3. Карта водоносного бассейна родников г. Брянска: а) 2 – ост. Памятник Болгарским Патриотам; б) 12 – Святой источник «Тихвинский»; в) 18 – мкр-н «Камвольный»; г) 34 – пос. Чайковичи, «Чайковичский родник»

Область питания родников № 2 и № 12 не приходится на действующие предприятия и автозаправки. Однако природниковое урочище характеризуется как метагемеробное, то есть данные родники расположены под обочиной автодорог на расстоянии менее 10 м. Особенно интенсивное дорожное движение над зоной разгрузки родника №2. Анализ химического состава водорастворимой части различных видов топлива (табл. 3) показал, что присутствующие в топливе ароматические углеводороды, такие как бензол, толуол, этилбензол, ксилолы относительно хорошо растворимы в воде: растворимость равна 820, 515, 152, 175 мг/л, соответственно (табл. 4). Например, бензин-АИ-92 в своём составе содержит около 50% толуола, дизельное топливо – о-ксилол (83%) [Нестеров, 2008].

Таблица 3 – Химический состав (основные углеводородные компоненты) водорастворимой части различных видов топлива [Алтунин, Белавцева, 1993]

Углеводороды	Бензин прямогонный	Бензин АИ-92	Керосин Т-8	Дизельное топливо	Нефть
Бензол	50,0	17,15	0,59	2,1	10,71
Толуол	17,53	49,33	2,58	3,3	32,58
Этилбензол	0,69	7,71	4,36	–	9,27
Мета- и пара ксилолы	3,76	12,39	8,33	–	10,28
О-ксилол	0,92	6,57	6,14	82,3	6,66
Неароматические УВ	27,45	1,5	3,0	12,3	9,0

Таблица 4 – Растворимость УВ в дистиллированной воде при 25 °С [Скурлатов и соавт., 1994]

Компоненты	Растворимость, мг/л	Компоненты	Растворимость, мг/л
Н-пентан	38,5	Циклопентан	156,0
Н-гексан	9,5	Циклогексан	55,0
Н-гептан	2,9	Циклогептан	7,9
Н-октан	0,66	Бензол	820,0
Н-декан	0,016	Толуол	515,0
Н-додекан	0,0037	О-ксилол	175,0
Н-тетрадекан	0,0022	Этилбензол	152,0
Н-гексадекан	0,0009	Н-пропилбензол	9,0

Подземные воды, разгружаемые в оврагах и на мезогемеробных территориях, характеризуются наименьшими значениями концентрации НП. Причём для некаптированных выходов отмечены более низкие концентрации НП, что, вероятно, объясняется более протяжённой зоной разгрузки (для родников № 3, 5, 14 она составляет более 1 км).

Таким образом, химический состав родниковых вод определяется особенностями геологического строения природникового урочища и типом источника загрязнения, приуроченного к водосборной площади родника.

Непосредственная близость автодорог оказывает прямое влияние на состав родниковых вод. Поэтому зона санитарной охраны должна охватывать площадь протяжённостью не менее 50 м от места разгрузки вверх по рельефу. Требуется исключить расположение на водосборной площади родников автозаправочных станций, стоянок легковых и грузовых автомобилей, помещений различного рода сервиса для грузовых, легковых и дизельных автомобилей.

Библиографический список

1. Алферов И.Н. Характеристика качества питьевой воды для населения вододефицитного региона (на примере Оренбургской области) / И.Н. Алферов, Н.В. Яковенко // Экология человека. – 2016. – № 7. – С. 3–10.

2. Aghinian A.O. Hydrogeological conditions of the upper streams of the vedi river and assessment of groundwater natural resources of the jermanis springs watershed / A.O. Aghinian, O.A. Sargsyan, T. Mkrtchyan // Proceedings of the YSU C: Geological and Geographical Sciences. – 2022. – Vol. 56, № 3 (259). – P. 135–145.
3. Другов Ю.С. Экологические анализы при разливах нефти и нефтепродуктов: монография / Ю.С. Другов, А.А. Родин. – СПб: Анатолия, 2000. – 250 с.
4. Природные ресурсы и окружающая среда Брянской области. Годовой доклад об экологической ситуации в Брянской области в 2021 г. – Брянск: Департамент природных ресурсов и экологии Брянской области, 2022. – 220 с.
5. Гидрохимические показатели состояния окружающей среды: справочные материалы / Под ред. Т.В. Гусевой. – М.: Форум: ИНФРА-М, 2010. – 192 с.
6. Водный кодекс Российской Федерации от 03.06.2006 № 74-ФЗ (ред. от 08.12.2020) (вступ. в силу с 01.01.2021) // Собрание законодательства РФ, 05.06.2006, № 23, ст. 2381.
7. Нестеров А.В. Очистка нефтесодержащих сточных вод сочетанием экстракционных и адсорбционных методов: дис. ... канд. техн. наук: 02.00.16 / Нестеров Алексей Вячеславович. – Иваново, 2008. – 167 с.
8. Скурлатов Ю.И. Введение в экологическую химию / Ю.И. Скурлатов, Г.Г. Дука, А. Мизити. – М.: Высшая школа, 1994. – 400 с.
9. Алтунин В.С. Контроль качества воды / В.С. Алтунин, Т.М. Белавцева. – М: Колос, 1993. – 367 с.

ГИДРОХИМИЯ ОЗЁР И ОЦЕНКА РЕКРЕАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В НЕЧЕРНОЗЕМЬЕ РФ (БРЯНСКАЯ ОБЛАСТЬ)

Панчукова О.В.

Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского, Брянск, Россия

Аннотация. Выявлены показатели состояния озёр и прудов в рамках общегосударственной системы экомониторинга на территории сочетанной антропогенной нагрузки. Эколого-химические и биологические показатели водоёмов исследованы в городской черте административного центра г. Дятьково, п. Дружба.

Ключевые слова: гидрохимический состав, озёра, водные ресурсы, рекреационная устойчивость, Брянская область

HYDROCHEMISTRY OF LAKES AND ASSESSMENT OF RECREATIONAL SUSTAINABILITY IN THE NON-BLACK EARTH REGION OF THE RF (BRYANSK REGION)

Panchukova O.V.

Bryansk State University named after Academician I.G. Petrovsky, Bryansk, Russia

Abstract. Indicators of the state of lakes and ponds were identified within the framework of the national environmental monitoring system in the territory of combined anthropogenic load. The ecological, chemical and biological indicators of reservoirs were studied within the city limits of the administrative center of Dyatkovo, the village of Druzhba.

Keywords: hydrochemical composition, lakes, water resources, recreational sustainability, Bryansk region

Брянская область занимает первое место по запасам пресных вод в ЦФО: по территории протекает 2867 рек, расположены 49 крупных и более 80 мелких озёр, большая часть из которых зарегистрирована в урбоэкосистемах. Густота речной сети в бассейне р. Десна – 25,4 км на 100м², там же расположены и самые обширные по площади зеркала озёра [3]. По водотокам в староосвоенном регионе имеется значительное количество мониторинговой информации, о химических и биологических характеристиках озёр – закладывается научная база долгосрочных наблюдений. Малые водные объекты – озёра – быстро теряют устойчивость и в них запускаются процессы эвтрофикации [2]. Для создания экомониторинговой базы разработана программа «Городские озёра», которая охватывает не только водные объекты крупной урбоэкосистемы – г. Брянска, но и на богатые озёрами различного происхождения и прудами малые города Брянской области.

На территории Дятьковского района как неблагополучного по сочетанному загрязнению такие водные объекты впервые за двухлетний период исследованы на предмет эколого-химических и биологических показателей. Цель исследования – выявить показатели состоя-

ния озёр и прудов в рамках общегосударственной системы экомониторинга на территории сочетанной антропогенной нагрузки.

Эколого-химические и биологические показатели водоёмов исследованы в городской черте административного центра г. Дятьково, п. Дружба. К искусственно созданным объектам относятся пруды: Жировский (часть озера Буяновского), Чижовский, Парковый и Орловский, озеро Совхозское (п. Дружба). Остальные водные объекты имеют естественное происхождение. Озеро Круглое (Святое), исток реки Серижа – карстового происхождения, выполняющее в том числе и рекреационную функцию. Пролетарское озеро (Пильнеское озеро) имеет самый большой рекреационный потенциал, Орловский пруд – эстетическая достопримечательность г. Дятьково.

Химический анализ проб воды Дятьковского района проводился в период с 2022 по 2023 гг. [1]. Воды озёр и прудов, находящихся в черте населённых пунктов Дятьковского района, изменяются от 135 мг/л (озеро Пильня) до 314 мг/л (Чижовский пруд). Наибольший диапазон изменений суммы ионов отмечен у озёр Дачного, Совхозного, Орловского, а также двух прудов. Наименьшие колебания показателя выявлены для Больничного, Буяновского озёр, озера Пильня. Среднее значение показателей pH составляет единиц, наименьшее – 6,4–6,6 (озёра Круглое, Пильня, Буяновское, Белая речка), наибольшее – 7,5–8,0 (пруды). Наименьшая кислотность вод зарегистрирована для крупных водоёмов, наибольшая – для малых по площади и эвтрофицирующихся водных объектов. Слабощелочная реакция определена для проб, отобранных в осеннее время, что стимулирует эвтрофирование, делает менее подвижными ионы тяжёлых металлов. Значения pH всех проб в ранне-осенний период меньше, чем в весенний период. Температура вод изученных объектов колеблется от 11–17 °C в весенний период, наименьшая весенняя температура зарегистрирована для крупных водных объектов, наибольшая – для мелких по площади. Наивысшая температура + 23°C определена для эвтрофицирующихся прудов.

Для ионов хлора низкие концентрации выявлены в образцах вод озёр Бела речка, Пильня (26, 29 мг/л), наибольшие показатели хлорид-ионов зарегистрированы для осенних проб всех исследованных объектов: 49–52 мг/л, в основном для прудов, озёр Круглое, Святое. В целом концентрация хлоридных ионов в 10 раз ниже ПДК. Концентрация сульфат-ионов, также, как и хлорид-ионов, не превышает ПДК и ниже этого норматива в 8–9 раз. В осенних пробах содержание сульфат-ионов выше, чем в весенних. Наибольшие значения определены для озёр Совхозное, Дачное (21–24 мг/л), двух прудов. Малые значения сульфат-ионов – 10–13 мг/л – определены в пробах крупных озёр, непроточных: Круглое, Святое, Кучеровское, Буяновское. ПДК по аммонийным ионам 0,5 мг/л: в 12 водных объектах эта концентрация в 8–9 раз ниже норматива. В прудах имеются показатели, свидетельствующие об источниках азота: весной и осенью определена концентрация в 0,5 мг/л, что соответствует ПДК. Значения общей жёсткости свидетельствуют о принадлежности вод к объектам со средней и высокой жёсткостью: 80% и 20% соответственно. Содержание железа общего в водах – диагностический признак, свидетельствующий о процессах оглеения.

Для всех проб вод в водоёмах определено превышение ПДК по железу (0,3 мг/л): наибольшие цифры зарегистрированы для прудов, озёр Совхозное, Дачное, Белая речка, Пролетарское, Парковое, Орловское. Для всех озёр не выявлено очень чистой зоны по содержанию кислорода для показателей нормы в летний период. В весенних пробах O₂ всегда больше, чем в осенний. Наибольшая концентрация O₂ определена для 40% водных объектов. Вода в Жировском и Чижовском пруду относится к группе «загрязнённые», IV класс. В 35% водных исследованных объектов класс загрязнения III, «умеренно загрязнённые». В целом

концентрация кислорода в замкнутых водных объектах благоприятная, что делает процессы эвтрофикации маловероятными.

Увеличение потребностей населения в отдыхе определяет проведение в экомониторинге специальных исследований, которые характеризуют рекреационные возможности ландшафтов при водоёмах. Для водоёмов исследуемого района прямыми наблюдениями (экспертный путь) определялись коэффициенты и проводились расчёты. Наибольший индекс E_n рассчитаны для озёр Больничное, Круглое, Пролетарское, Совхозное. Эти показатели изменяются от 703,15 до 356,37. наименьшие E_n выявлены для Жировского пруда, Дачного озера, Орловского озера: значения от 12,35 до 88, 55. Таким образом, рекреационная ёмкость пляжей определяется не только природоохранными критериями, но и косвенными условиями экологической и психологической комфортности.

Библиографический список

1. ГОСТ 17.1.3.07-82. Охрана природы. Гидросфера. Правила контроля качества воды водоемов и водотоков // [Электронный ресурс] / Справ.-правовая система «Консультант-Плюс». URL: [http:// www.consultant.ru](http://www.consultant.ru).
2. Каширо М.А. Влияние экологического состояния водных объектов на рекреационный потенциал городской территории (на примере г. Томска) [Электронный ресурс] / Режим доступа: <https://cyberleninka.ru/article/n/vliyanie-ekologicheskogo-sostoyaniya-vodnyh-obektov-na-rekreatsionnyy-potentsial-gorodskoy-territorii-na-primere-g-tomska/viewer>.
3. Природные ресурсы и окружающая среда Российской Федерации. Центральный федеральный округ / Под ред. Н.Г. Рыбальского. Брянская область. М.: НИИ-Природа, 2007. 1144.

О ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ОТПЕЧАТКА КУТИКУЛЯРНЫХ ЧЕШУЕК ВОЛОС СОБАКИ ДОМАШНЕЙ

Заморин Д.Б., Тихонова Т.В.

Пермский военный институт войск национальной гвардии РФ, Пермь, Россия

Аннотация. В статье обсуждается опыт изучения кутикулярных чешуек волоса *Canis familiaris* с использованием метода изготовления негативных отпечатков. Рассмотрены различные техники получения отпечатков и подготовки волоса к изготовлению препарата. Показана пригодность метода изготовления отпечатка кутикулы на маникюрном лаке.

Ключевые слова: собака, шерсть, волосяной покров, кутикула, отпечаток

ABOUT THE APPLICATION OF THE METHOD OF OBTAINING AN IMPRINT OF CUTICLE SCALES OF THE HAIR OF A CANIS FAMILIARIS

Zamorin D.B., Tikhonova T.V.

Perm Military Institute of National Guard Troops, Perm, Russia

Abstract. The article discusses the experience of studying the cuticle scales of the *Canis familiaris* hair using the method of making negative prints. Various techniques for obtaining prints and preparing the hair for the preparation of the drug are considered. The suitability of the method of making a cuticle print on nail polish is shown.

Keywords: dog, coat, hairline, cuticle, print

Волосяной покров или шерсть является отличительной чертой представителей класса Mammalia. Волосяной покров покрывают почти все тело зверя, выполняя основную функцию по созданию теплоизоляционного слоя, обеспечивая защиту от механических воздействий, а кроме того, участвуя в формировании чувства осязания. Значимость функций волосяного покрова делает изучение его структуры актуальным.

Каждый волос представляет собой нитевидную многослойную структуру, состоящую из центрального (мозгового) слоя, коркового слоя и наружной оболочки – кутикулы. Кутикула формируется слоем плоских ороговевших клеток, частично перекрывающих или касающихся друг друга. Полностью кератинизированные клетки кутикулы выглядят как чешуйки. Их форма и расположение является одним из диагностических признаков в систематике млекопитающих, позволяющих установить таксономическую принадлежность животного. Известно, что форма кутикулярных чешуй генетически детерминирована и характеризуется видо- и родоспецифичностью [1,2,3], что дает возможность применения результатов анализа морфологии кутикулярных чешуек в зоологии для видовой идентификации животных [1,4,5,6], в частности, для определения рациона хищника по остаткам жертв в погадках и экскрементах [7,8]. Описание кутикулярных структур волоса применяется в археологических

исследованиях [9] в товароведческой экспертизе, в следственной и судебной практике [10,11].

Решение по идентификации объекта по волосяному покрову может быть получено на основании генотипического исследования ДНК с использованием метода ПЦР, возможном при сохранности ядер клеток влагалищных оболочек или митохондриальной ДНК в луковице или прикорневой части стержня волоса [12,13]; определения специфических кератинов и антигенов [14,15]. Однако визуальное изучение морфологии волоса является наиболее доступным методом, позволяющим увидеть микроморфологические параметры объекта: форму стержня волоса, состояние его корневого и периферического концов, выраженность зубчатости оптического края, толщину сердцевины, цвет фона коркового слоя, характеристики пигмента, форму поперечных срезов, толщину волоса, а также рисунок, образуемый линиями свободных краев чешуек кутикулы [16,17].

Изучение структуры и рисунка кутикулярных чешуй не требует сложных манипуляций и возможно даже в полевых условиях. Рассмотреть структуру кутикулярных чешуй непосредственно с помощью светового микроскопа удастся не всегда из-за затемнения пигментами мозгового и коркового слоев волоса. Решением данной проблемы является изготовление негативного отпечатка кутикулы волоса.

Метод получения отпечатков кутикулы волос на желатиновом слое фотопластинок был предложен в 1930 г. А. Шредером [18]: очищенный волос наклеивается на желатиновую основу, нанесенную на предметное стекло, затем отрывается пинцетом за кончик. Получившийся отпечаток исследуют под световым микроскопом с увеличением от 10× до 40×.

Недостатками использования желатина в качестве основы для отпечатка является низкая контрастность препарата, что было устранено добавлением в раствор желатина небольшого количества метиленового синего, и низкая устойчивость отпечатка к нагреванию осветителем микроскопа – отпечатки расплавлялись. Кроме того, мягкий слой желатина легко деформируется при случайных касаниях к поверхности препарата.

Для предотвращения таких деформаций в качестве основы нами был использован 50% раствор поливинилацетата (ПВА), который обладает хорошей выравнивающей способностью и позволяет сформировать пленку равномерной толщины. Для жестких волос можно использовать более концентрированный раствор ПВА. Устойчивость препарата оказалась выше, чем у отпечатков, сделанных на желатине.

Наиболее стойкий препарат получился, когда в качестве основы мы использовали слой бесцветного маникюрного лака. Эта основа дала возможность рассмотреть структуры чешуек волоса без дополнительного окрашивания.

Образцами для изготовления препаратов послужила шерсть собак породы немецкая овчарка, шерстный покров которой соответствует «дикому типу» – недлинный, плотно прилегающий к телу, двухярусный, состоящий из покровных (направляющие и остевые) и пуховых волос. Для изготовления препарата использовались остевые волосы в средней зоне стержня.

Отбор волос проводился в период после завершения весенней линьки. Были взяты волосы с боковой поверхности грудной клетки, чуть ниже лопатки. Выбор данного участка тела обусловлен тем, что его волосяной покров наиболее типичен и однороден.

Подготовка волоса к изготовлению отпечатка сводилась к предварительной промывке его в ацетоне или перекиси водорода для удаления жировой смазки и минеральных загрязнений. Промывка перекисью дала худшие результаты – кутикула становилась рыхлой, нарушалась целостность чешуек, выраженность зубчатости оптического края (рис. 1А). При обра-

ботке ацетоном разрушения кутикулы не происходило, картина отпечатка поверхности волоса получалась наиболее четкой (рис. 1Б).

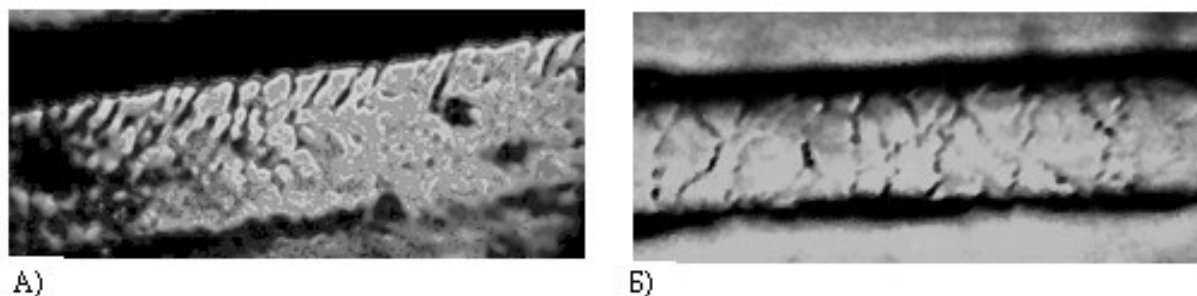


Рис. 1. Отпечаток кутикулы центральной части стержня остевого волоса немецкой овчарки (А – перикись, маникюрный лак, Б – ацетон, маникюрный лак).

Полученные нами препараты отпечатков кутикулярного узора волоса немецкой овчарки соответствуют изображениям, приведенным в литературе (рис. 2) [19,20] для волка, шакала и других пород собаки, что позволяет использовать их в определении групповой специфичности псовых.

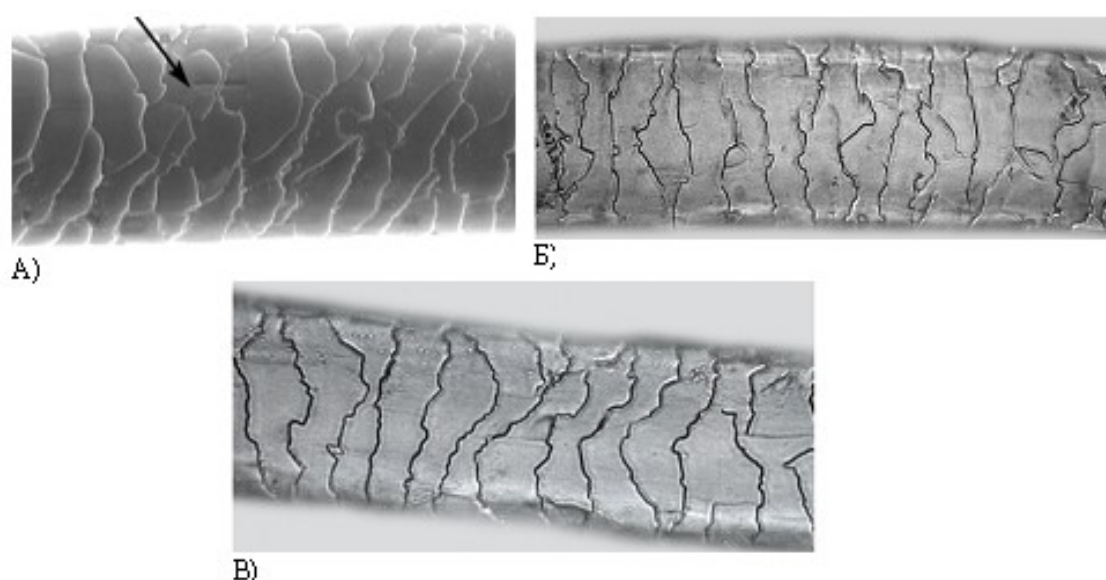


Рис. 2. Отпечаток кутикулы центральной части стержня остевого волоса некоторых псовых (А – *Canis familiaris* (ездовая лайка), Б – *Canis lupus*, В – *Canis aureus*).

Кутикула остевых волос немецкой овчарки имеет полукольцевидное строение – одна чешуйка не полностью охватывает стержень, поперек стержня располагается 1–1,5 чешуйки, вдоль стержня чешуйки лежат почти параллельно друг другу, образуя поперечную исчерченность. Форма и размеры чешуй по длине стержня более или менее одинаковы. Ширина чешуи равна высоте или чуть больше ее. Свободные края чешуек неплотно прилегают к корковому слою. Свободный край чешуек имеет треугольную форму с острой вершиной. Форма типичной чешуйки кутикулы псовых указана стрелкой на рис. 2А.

Таким образом, метод получения отпечатка кутикулы волоса на маникюрном лаке может быть использовано для оценки морфологических особенностей шерстного покрова и идентификации псовых.

Библиографический список

1. Чернова О.Ф. Архитектоника волос и ее диагностическое значение // Теоретические основы современных методов экспертного исследования: Пособие для экспертов, следователей и судей. Вып. 3. Москва: Российский федеральный центр судебной экспертизы (РФЦСЭ), 2003. 51 с.
1. Хибхенов, Л.В. Морфологическая характеристика волос домашних, сельскохозяйственных и охотничье-промысловых животных / Л.В. Хибхенов, С.П. Ханхасыков // Вестник Бурятской государственной сельскохозяйственной академии им. В.Р. Филиппова, 2020. № 4(61). С. 90–95.
2. Волк. Происхождение, систематика, морфология, экология / под ред Д.И. Бибикова. М.: Наука, 1985. 608 с.
3. Подлесных Е.А., Реусова Т.В. Выбор показателей для идентификации волос волка // МНИЖ. 2016. №2-3(44). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vybor-pokazateley-dlya-identifikatsii-volos-volka> (дата обращения: 16.09.2023).
4. Салаутин В.В., Салаутина С.Е. Видовые особенности строения волос у домашних и диких животных // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. 2015. №3. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/vidovye-osobennosti-stroeniya-volos-u-domashnih-i-dikih-zhivotnyh> (дата обращения: 16.09.2023).
5. Никифорова Ж.М., Разоренова О.И., Жаров Е.А. Определитель волос млекопитающих, встречающихся в экспертно-криминалистической практике. М.: Всесоюз. науч.-криминал. центр МВД СССР, 1991. 24 с.
6. Сидорович А.А. Методология исследования позвоночных хищников: изучение питания: учеб.-метод. пособие. Минск : БГУ, 2014. 88 с.
7. Салманова Е.И., Костыря А.В., Микелл Д.Д. Спектр питания дальневосточного леопарда *Panthera pardus orientalis* на юго-западе Приморского края России // Известия Иркутского государственного университета. Серия: Биология. Экология. 2013. №2. URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/spektr-pitaniya-dalnevostochnogo-leoparda-panthera-pardus-orientalis-na-yugo-zapade-primorskogo-kрая-rossii> (дата обращения: 16.09.2023).
8. Некоторые элементы погребального обряда северных селькупов по данным палеоэкологических исследований / О.Е. Пошехонова [и др.] // ВИАЭ. 2015. №4 (31). URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/nekotorye-elementy-pogrebalnogo-obryada-severnyh-selkupov-po-dannym-paleoekologicheskikh-issledovaniy> (дата обращения: 16.09.2023).
9. Туманов А.К., Белкин П.К. Судебно-медицинская экспертиза. Москва, 1972. С. 28–31.
10. Барсегянц Л.О., Верещака М.Ф. Морфологические особенности волос человека в аспекте судебно-медицинской экспертизы. М.: Медицина, 1982. 215 с.
11. Кисин М.В. Судебно-биологическая экспертиза волос животных. Вып. 2. Методики экспертного исследования. М.: Министерство юстиции Российской Федерации РФЦСЭ, 2001. С. 104–109.
12. Павлинов И.Я. Систематика современных млекопитающих. М: Изд-во Московского университета, 2003. С. 22–23.
13. Современные методы экспертного исследования волос человека: учеб. пособие / М.Г. Пименов [и др.]. М.: ЭКЦ МВД России, 2008. С. 7.
14. Криминалистическое исследование митохондриальной ДНК биологических следов человека: методич. рекомендации / А.Ю. Культин [и др.]. М.: ЭКЦ МВД России, 2008. С. 19–20.

15. Белкин Р.С. Криминалистическая энциклопедия. М.: БЕК, 1997. С. 124.
16. Кухаренко Н.С. Определение вида животных по волосу: учебно-методическое пособие к лабораторно-практическим занятиям по судебной ветеринарной и ветеринарно-санитарной экспертизе. Благовещенск: ДальГАУ, 2015. 26 с.
17. Гаркави А.С. Развитие в СССР судебномедицинской экспертизы волос (Исторический очерк). // Судебно-медицинская экспертиза. М., 1966 №2. С. 33–35. URL: <https://www.forens-med.ru/book.php?id=4127> (дата обращения: 16.09.2023).
18. Bahuguna, A., Sahajpal, V., Goyal, S.P., Mukherjee, S.K. and Thakur, V. 2010. Species identification from guard hair of Selected Indian Mammals A reference guide. Published by Wildlife Institute of India, Chandrabani Dehra Dun. – P. 448.
19. Чернова О.Ф., Васюков Д.Д., Савинецкий А.Б. Архитектоника волос ездовых собак Чукотки. // Доклады Академии наук. 2016. Т. 467, № 3. С. 365–371.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СПРЕЕВ ПРОТИВ КЛЕЩЕЙ

Лобанова Н.Л., Омельченко Н.В.

Пермский военный институт войск национальной гвардии РФ, Пермь, Россия

Аннотация. Статья посвящена сравнительному анализу эффективности акарицидно-репеллентных средств, используемых для защиты человека от иксодовых клещей. Сравнение проводилось по оценке высоты и скорости подъема клещей из природной популяции по обработанной ткани. Показана наибольшая эффективность средства «Рефтамид Экстра Анти-клещ».

Ключевые слова: иксодовые клещи, акарицидные средства, инфекции передаваемые клещами

COMPARATIVE EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF ANTI-TICK SPRAYS

Lobanova N.L., Omelchenko N.V.

Perm Military Institute of National Guard Troops, Perm, Russia

Abstract. The article is devoted to a comparative analysis of the effectiveness of acaricidal-repellent agents used to protect humans from ixodid ticks. The comparison was made by assessing the height and speed of rise of ticks from the natural population on the treated tissue. The greatest effectiveness of the product «Reftamid Extra Anti-tick» has been shown.

Keywords: ixodid ticks, acaricidal agents, infections transmitted by ticks

Клещи семейства *Ixodidae* являются кровососущими членистоногими. Инфекции, передаваемые клещами, в силу наличия обширных природных территорий, являющихся их нозоареалами, требуют постоянного эпидемиологического и эпизоотологического надзора и контроля [1].

Количество обращений за медицинской помощью в Российской Федерации по поводу присасывания клещей в 2021 г. составило 309,49 на 100 тыс. населения, а среднемноголетний показатель за весь период официальной регистрации таких обращений (2014–2021 гг.) – 342,34 на 100 тыс. населения. Клещевой вирусный энцефалит является вторым по распространенности заболеванием в группе инфекций, передающихся клещами. Заболеваемость моноцитарным эрлихиозом человека и гранулоцитарным анаплазмозом человека в 2021 г. в Российской Федерации отмечена на уровне единичных случаев [2].

Пермский край входит в число субъектов Российской Федерации с наиболее высокой обращаемостью по поводу укусов клещами и заболеваемостью клещевым вирусным энцефалитом и иксодовым клещевым боррелиозом [3, 4].

Пик активности клещей в основном приходится на май – июнь и первую половину июля месяца. Появляются клещи с первыми проталинами в апреле. Клещевой вирусный эн-

цефалит сегодня является единственной инфекцией из группы инфекций, передающихся клещами, для предупреждения которой массово используются средства специфической профилактики. Для предупреждения остальных заболеваний эффективно использовать акарицидно-репеллентные продукты. Ими необходимо обработать одежду вокруг щиколоток, коленей, бедер, талии, а также манжеты рукавов и воротник.

Данная работа имеет целью сравнить эффективность доступных спреев против клещей для человека посредством оценки скорости и высоты подъема клещей по обработанной спреями ткани.

Эксперимент проводили с апреля по июль 2023 года на территории лыжероллерной трассы Пермского национального исследовательского политехнического университета и вблизи территории Пермского военного института (г. Пермь). Сбор клещей для дальнейшего эксперимента проводился в лесном массиве вдоль тропинок, как правило на высокой траве, так как количество клещей там больше, чем в глубине лесного массива.

Поиск и сбор клещей осуществляли, используя «флаг» состоящий из вафельной ткани размером 0,6 м на 1,5 м, материю узким концом прикрепляли к палке длиной 1–1,5 метра (рис. 1А). Во время сбора следили за тем, чтобы «флаг» не скручивался, плавно протаскивали его справа или слева от себя вдоль тропинки по высокой траве. Осмотр флага производили каждые 30–40 шагов. 25 клещей собрали в емкость с влажной ваткой для предотвращения их высыхания (рис. 1Б).



А



Б

Рис. 1. Поиск и сбор иксодовых клещей

По методике Арисова, Архипова (2018) оценивали скорость наступления состояния нокдауна и высоту подъема клещей по обработанной средствами ткани [5]. Для этого на ленты из хлопчатобумажной бязи размером 10*40 см цветным карандашом наносили отметки длиной от 0 до 30 см. Первую отметку (нулевую) делали на расстоянии 10 см от края. Полоска бязи для контрольной группы не обрабатывалась. В опытных группах полоски ткани обрабатывались спреями в объеме 2–3 нажатий. Тканевые полоски на воздухе выдерживались до полного высыхания спрея и размещались вертикально под углом 60 градусов (рис. 2А).



А

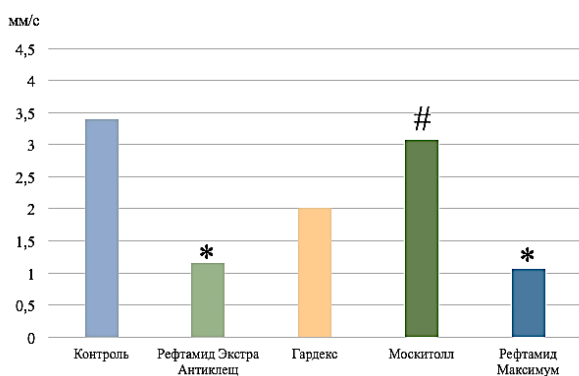


Б

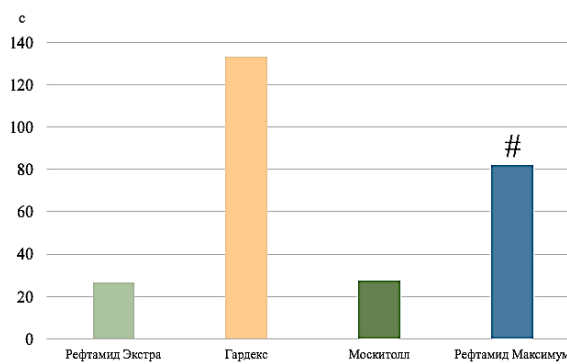
Рис. 2. Проведение эксперимента

Пойманных клещей помещали на 5 см ниже нулевой отметки и наблюдали за скоростью передвижения, дополнительно стимулируя их пальцем наблюдателя, который держали на расстоянии 0,5 см от гипостомы клеща. С помощью секундомера регистрировали время от момента пересечения клещом нижней черты обработанного участка до отпадения клеща с тестовой полоски, что соответствует времени наступления нокдауна, регистрировали максимальную высоту и скорость подъема клеща (рис. 2Б).

Для сравнительной оценки были выбраны четыре средства от клещей для человека, обладающие заявленным репеллентно-акарицидным действием: аэрозоль-инсектоакарицид «Рефтамид Экстра Антиклещ», аэрозоль «Гардекс», спрей «Москитолл», аэрозоль-репеллент «Рефтамид Максимум».



А



Б

Рис. 3: А – скорость подъема клещей по обработанной ткани; Б – время наступления состояния нокдауна (где * – достоверно по сравнению с группой «Контроль», # – достоверно по сравнению с группой «Рефтамид Экстра Антиклещ»)

Выявлено, что скорость подъема клещей по обработанной ткани достоверно снижается в случае использования аэрозолей «Рефтамид Экстра Антиклещ» и «Рефтамид Максимум» (рис. 3А). В качестве основного активного вещества в аэрозоль-инсектоакарициде «Рефтамид Экстра Антиклещ» использован альфациперметрин, в «Рефтамид Максимум» –

диэтилтолуамид. Действующим веществом аэрозоля «Гардекс» является диэтилтолуамид; спрея «Москитолл» – альфациперметрин и диэтилтолуамид.

Скорость наступления состояния нокдауна наиболее выражена у клещей при обработке ткани средствами «Рефтамид Экстра Антиклещ» и «Москитолл» (рис. 3Б).

Таким образом, в полевом эксперименте с природной популяцией иксодовых клещей была показана наибольшая эффективность средства «Рефтамид Экстра Антиклещ», которое обеспечивает более эффективное снижение скорости подъема клещей по обработанной ткани и оказывает наиболее выраженное акарицидное действие, ускоряя состояние нокдауна у клещей.

Библиографический список

1. Хутко А.Р., Богущий М.И., Савицкая В.А. Клещевой лайм-боррелиоз как значимая медико-экологическая проблема // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2007. – № 4 (20). С. 134–136.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2021 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2022. – 340 с.
3. Ефимик В.Е., Соловьева Е.Е., Славнова Е.А. Оценка степени зараженности иксодовых клещей в УНБ «Предуралье» // Симбиоз–Россия 2022. Сборник статей XIII Международной конференции ученых-биологов. Пермь. – 2023. С. 682–687.
4. Ефимик В.Е., Славнова Е.А. Оценка обилия и зараженности иксодовых клещей Черняевского леса (г. Пермь) // Анализ риска здоровью – 2023. Совместно с международной встречей по окружающей среде и здоровью RISE-2023: материалы XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Пермь. – 2023. С. 126–130.
5. Арисов М.В., Архипов И.А. Методы определения эффективности инсектицидов, акарицидов, регуляторов развития и репеллентов при эктопаразитозах плотоядных животных // Российский паразитологический журнал. – 2018. – Т. 12. – № 1. С. 81–97.

ОЦЕНКА КООРДИНАЦИОННЫХ СПОСОБНОСТЕЙ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК НА НЕУСТОЙЧИВОЙ ПЛАТФОРМЕ

Корнилова Е.А., Отинов И.В.

Пермский военный институт войск национальной гвардии РФ, Пермь, Россия

Аннотация. В статье отмечается, что служебные собаки должны быть готовы, как психологически, так и физически к разнообразным условиям работы. Подчеркивается, что повышение координационной устойчивости собак является важным компонентом в тренировочном процессе. Применение тренажера позволяет оценить координационные способности немецких и бельгийских овчарок с помощью тренажера «Неустойчивая платформа».

Ключевые слова: служебные собаки, координация, тренажер, тестирование

ASSESSMENT OF THE COORDINATION ABILITIES OF SERVICE DOGS ON AN UNSTABLE PLATFORM

Kornilova E.A., Otinov I.V.

The Perm Military Institute of the National Guard Troops of the Russian Federation, Perm, Russia

Abstract. The article notes that service dogs must be prepared, both psychologically and physically, for a variety of working conditions. It is emphasized that increasing the coordination stability of dogs is an important component in the training process. The use of the simulator allows you to evaluate the coordination abilities of German and Belgian shepherds using the “Unstable Platform” simulator.

Keywords: service dogs, coordination, simulator, testing

В настоящее время в войсках национальной гвардии Российской Федерации применяются служебные собаки, которые для выполнения поставленных служебно-боевых задач должны быть готовы, как психически, так и физически к разнообразным условиям работы [1]. При комплексной физической подготовке служебных собак необходимо развивать в ней не только силу, выносливость, скорость, но и координационные способности.

Учитывая, что под координацией подразумевают способность предельно целесообразно согласовывать все движения частей тела в процессе решения конкретной двигательной задачи, то есть возможность управлять собственными движениями [2], можем сказать, что координационные способности – умение наиболее совершенно, быстро, целесообразно, экономно, точно и находчиво решать двигательные задачи, особенно при возникновении сложных и неожиданных ситуаций [3].

В управлении движениями они отвечают за согласованные, упорядоченные разнообразные двигательные навыки. Координационные способности включают в себя: ориентиров-

ку в пространстве, точность воспроизведения движения по пространственным, силовым и временным параметрам, статическое и динамическое равновесие [4].

Многие авторы указывают на то, что одним из важных компонентов в тренировочном процессе профессиональных спортсменов является повышение координационной устойчивости. Результаты эмпирических исследований выявили, что регулярное выполнение комплексов особых упражнений (статичных и динамических), направленных на повышение координации и улучшения равновесия, у большинства занимающихся значительно улучшают координационные способности [5,6] вне зависимости от возраста. Для служебной собаки умение управлять своим телом является одним из основных параметров, как при тренировках, например, задержании нарушителя, так и в реальных условиях.

Сбалансированная собака имеет значительные преимущества по сравнению с не тренированной. Во-первых, это улучшенная проприоцепция, то есть ощущение относительного положения частей тела и их движений. Цель упражнений на баланс – улучшить проприоцепцию для того, чтобы лучше контролировать свое тело при любых обстоятельствах [7]. Во-вторых, снизить вероятность травматизма, так как регулярные упражнения содействуют укреплению опорно-двигательного аппарата, тренируя почти все группы мышц животного (укрепляются суставы, развивается мышечный корсет). В-третьих, отмечают повышение работоспособности и улучшение многих двигательных действий собаки, связанные с выполнением служебных обязанностей: атака фигуранта, следовая работа в разнообразных условиях и другие комплексные специфические задачи.

На кинологическом факультете были сконструированы и апробированы тренажеры «Неустойчивая платформа», осуществляющий горизонтальные колебательные движения платформы с непредсказуемой амплитудой достаточно низко над землей (рис. 1). Применение тренажера позволяет оценить психологическую устойчивость у служебных собак, приучить к спокойному отношению и выполнению работы в условиях различных колебаний.



Рис. 1. Тренажер «Неустойчивая платформа»

Тренажер обладает multifunctionality: во-первых, при первой встрече животного позволяет оценить психическую устойчивость особи в ответ на незнакомый неожиданный раздражитель (качающаяся платформа); во-вторых, позволяет оценить координацион-

ные способности взрослых натренированных собак; в-третьих, платформа может использоваться как тренажер для собак разного возраста, ее небольшая высота позволяет установить его на выгульной площадке щенков.

Цель данного исследования – оценить координационные способности взрослых натренированных собак с помощью тренажера «Неустойчивая платформа». В эксперименте участвовали служебные собаки одного из кинологических городков Уральского округа войск национальной гвардии, а именно бельгийские овчарки (малинуа) в количестве четырех особей и восемь немецких овчарок, все собаки старше двух лет.

В ходе тестирования оценивались координационные способности, устойчивость на тренажере и послушание собаки. На предварительном этапе оценивалась продолжительность выполнения комплекса команд «Сидеть, лежать, стоять» в обычных условиях на поверхности земли («Земля»). Команды подавались через определенные промежутки времени. Все собаки были натренированы должным образом.

Далее собака заводилась на платформу тренажера (размером 600*1000 мм), находящуюся в 30 см над землей, и вновь выполняла комплекс команд. В процессе тестирования отмечались действия собаки при заходе на тренажер, продолжительность и уверенность выполнения комплекса, устойчивость (рис. 2).



Рис. 2. Выполнение бельгийской на неустойчивой овчаркой (малинуа) комплекса команд платформе

В тестировании участвовали двенадцать собак двух пород. На первом этапе были проанализированы результаты предварительного этапа «Земля» ($9,00 \pm 0,67$ секунд) и собственно тестирования на неустойчивой поверхности ($32,6 \pm 1,83$ секунд), выявлена достоверная разница ($t_d=12,1$, при $p=0,01$) между этапами, т.е. продолжительность затраченного времени на выполнение комплекса команд увеличилась в три-четыре раза (рис. 3).

Данное тестирование позволило оценить уровень координационных способностей овчарок при первом заходе на тренажер. Необходимо отметить, что при втором и последующих заходах большинство особей адаптировались к качающейся поверхности и выполняли команды более уверенно, что доказывает возможность тренировки баланса и координации собак.

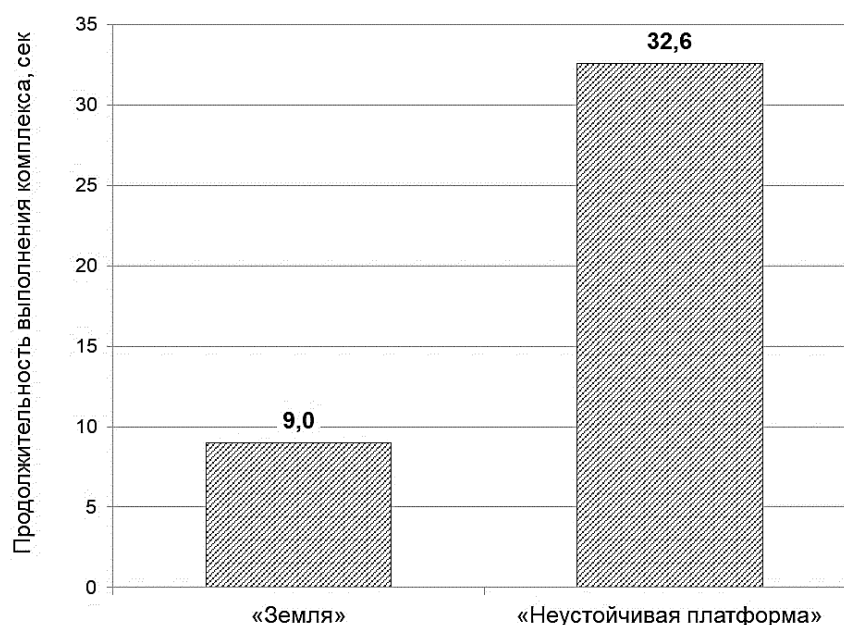


Рис. 3. Продолжительность выполнения комплекса команд служебными собаками в разных условиях

Отметим, что 33,3% собак испытывали затруднения с первым заходом на неустойчивую платформу, 75% особей потребовались дополнительные команды для выполнения посадки и укладки, 33,3% овчарок вместо выполнения комплекса легли на платформу, увеличивая площадь опоры. Кроме того, большинство собак (75%) проявили признаки неуверенности на тренажере (попытки спрыгнуть, тремор задних конечностей).

Сравнение собак разных пород показало отсутствие достоверной разницы между бельгийскими овчарками ($n=4$) и немецкими овчарками ($n=8$), как на предварительном этапе «Земля» ($t_d=1,43$, при $p=0,05$), так и во время собственно тестирования «Неустойчивая платформа» ($t_d=1,54$, при $p=0,05$) (табл.).

Таблица – Значения среднего арифметического собак разных пород по результатам тестирования с учетом ошибок

	Бельгийская овчарка (малинуа)	Немецкая овчарка
«Земля»	7,50±1,44 с	9,75±0,62 с
«Неустойчивая платформа»	28,75±3,12 с	34,50±2,06 с

На рис. 4 изображена частота встречаемости признаков, продемонстрированных служебными собаками разных пород при первом заходе на неустойчивую платформу. У разных особей сочетание указанных признаков варьировало, также, как и степень их проявления.

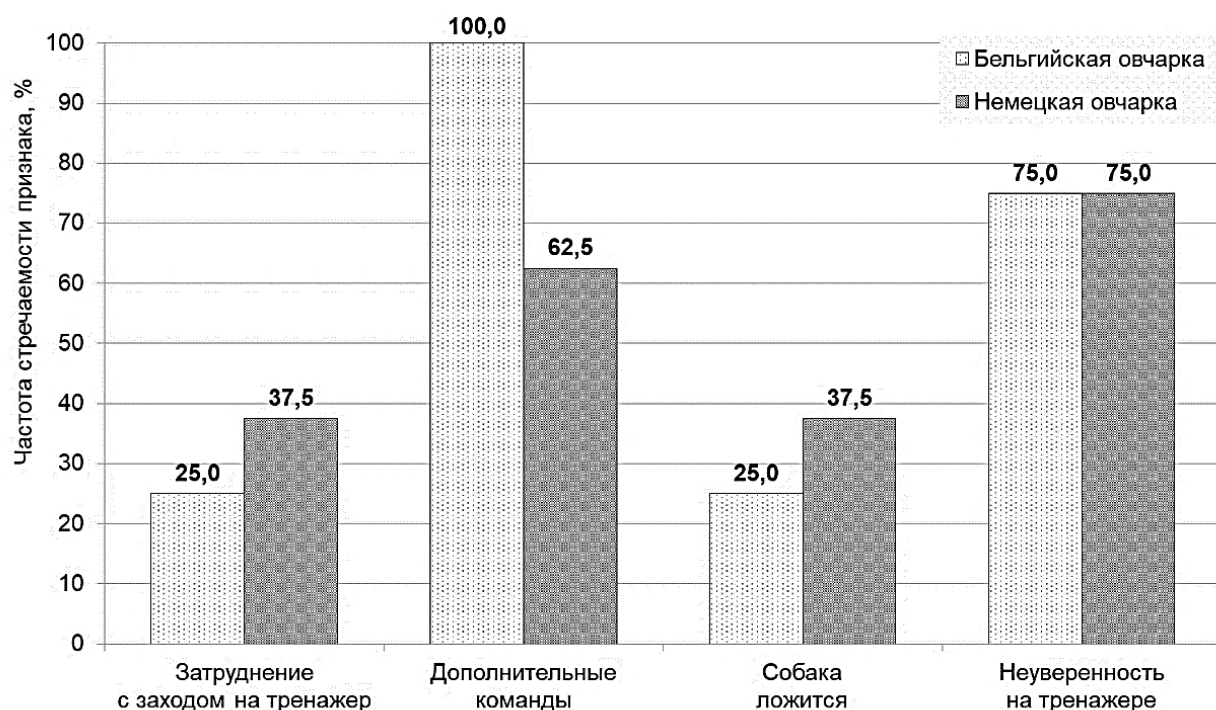


Рис. 4. Частота встречаемости признаков, продемонстрированных служебными собаками разных пород при первом заходе на неустойчивую платформу.

Подводя итог, отметим, что собаки, ранее не встречающиеся с неустойчивыми поверхностями, сначала испытывали значительные затруднения, которые выражались в замедленных двигательных реакциях, неуверенности. В дальнейшем, при регулярных тренировках, двигательные навыки совершенствовались, собаки стали лучше управлять своим телом, учитывать непредсказуемую амплитуду движения платформы. Рекомендуем использовать тренажер данного типа при подготовке служебных и спортивных собак.

Библиографический список

1. Федеральный закон № 226-ФЗ от 03 июля 2016 «О войсках национальной гвардии Российской Федерации». ст. 20.
2. Пыжьянов А., Керимова Н. Баланс, координация, подвижность // Junior Tennis. №4 (64). 2017. [Электронный ресурс] URL: <http://stennis.ru/lessons/376-balans-koordinaciya-podvizhnost.html> (Дата обращения 03.01.23 г.)
3. Коздов Д.М. Развитие координационных способностей спортсмена // Спорт в школе и здоровье детей. URL: <https://urok.1sept.ru/articles/662126> (Дата обращения 28.12.2022 г.)
4. Технология формирования вестибулярной устойчивости у детей с ограниченными возможностями здоровья: учеб.-метод. пособие / С.Ю. Максимова, В.В. Анцыперов, И.В. Федотова, И.С. Таможникова, А.А. Мартынов. – Волгоград: ФГБОУ ВО «ВГАФК», 2019. 80 с.
5. Сидоренко А.С., Пригода Г.С. Повышение координационной устойчивости в скиджоринге на собаке // Ученые записки университета им. П.Ф. Лесгафта. № 9 (175). СПб: ФГБОУ ВО «Национальный государственный Университет физической культуры, спорта и здоровья имени П.Ф. Лесгафта», 2019. С. 270–273. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=41157252> (Дата обращения 28.12.2022 г.)

6. Хорошева Т.А., Корнеев С.А. Развитие координационных способностей как направление повышения двигательной активности современного человека // Уральский научный вестник. Уральск: ТОО Уралнаучкнига, Т.4. № 2. 2018. С. 61–66. URL: <https://www.elibrary.ru/item.asp?id=32847307> (Дата обращения 25.02.2022 г.)
7. Телебокова И.М. Система упражнений по дог-фитнесу / И.М. Телебокова // Химия, физика, биология, математика: теоретические и прикладные исследования: сборник статей по материалам XIII-XIV международной научно-практической конференции. Том № 7-8 (7): Общество с ограниченной ответственностью «Интернаука», 2018. – С. 34–42. [Электронный ресурс]. URL: <https://elibrary.ru/item.asp?id=35458091> (Дата обращения 15.10.22 г.)

ДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ РУК КУРСАНТОВ ВОЕННОГО ВУЗА

Крылова И.О., Якурнов А.С.

Пермский военный институт войск национальной гвардии РФ, Пермь, Россия

Аннотация. В статье освещены результаты динамического исследования по обсемененности поверхности кожи рук курсантов военного вуза санитарно-показательными микроорганизмами за период с 2017 по 2023 гг. Показано, что качественный состав транзиторной микрофлоры у анализируемых выборок курсантов представлен семью видами бактерий группы кишечных палочек. Анализ экспериментальных данных по обсемененности поверхности кожи рук показал, что количество санитарно-показательных микроорганизмов у курсантов военного вуза первого года обучения ниже, чем у курсантов-кинологов второго года обучения, у обучающихся курсантов-кинологов 4 года обучения меньше, чем у курсантов 1 и 2 курсов. Оценка эффективности обработки кожи рук антисептическими средствами с помощью индекса бактерицидности выявила факт снижения чувствительности микрофлоры к антисептикам разных форм применения.

Ключевые слова: транзиторная микрофлора; кожа рук; курсанты военного вуза; гигиена

DYNAMIC INDICATORS OF MICROBIAL CONTAMINATION OF THE HANDS OF CADETS OF A MILITARY UNIVERSITY

Krylova I.O., Yakurnov A.S.

Perm Military Institute of the National Guard Troops of the Russian Federation, Perm, Russia

Abstract. The article highlights the results of a dynamic study on the contamination of the surface of the skin of the hands of cadets of a military university with sanitary-indicative microorganisms for the period from 2017 to 2023. It is shown that the qualitative composition of the transient microflora in the analyzed samples of cadets is represented by seven types of bacteria of the *Escherichia coli* group. The analysis of experimental data on the contamination of the surface of the skin of the hands showed that the number of sanitary-indicative microorganisms in the cadets of the military university of the first year of training is lower than that of the cadets of the second year of training, the students of the cadets of the 4th year of training are less than those of the cadets of the 1st and 2nd courses. Evaluation of the effectiveness of hand skin treatment with antiseptic agents using the bactericidal index revealed a decrease in the sensitivity of microflora to antiseptics of various forms of application.

Keywords: transient microflora; hand skin; cadets of a military university; hygiene

Согласно пп. 335-336 гл. 8 Общевоинских уставов вооруженных сил Российской Федерации «Охрана здоровья военнослужащих – неотъемлемая часть подготовки к выполне-

нию своего воинского долга...». Охрана здоровья военнослужащих достигается «...осуществлением санитарно-противоэпидемических (профилактических) и лечебно-профилактических мероприятий» [1]. В условиях современной эпидемической ситуации факторы риска биологической природы на здоровье военнослужащих действуют постоянно, ведь инфекционные заболевания вызываются микроорганизмами, населяющими разные экологические ниши [2]. Соприкосновение поверхности кожи с окружающей средой способствует её контаминации микроорганизмами, нехарактерными для кожи в обычных условиях [3; 4].

Исходя из этого, целью исследования явилось: изучить бактериальную обсемененность поверхности кожи рук курсантов военного вуза и оценить различные варианты антисептической обработки.

Объект исследования: транзитная микрофлора поверхности кожи рук курсантов военного вуза.

Организация и методика исследования: проведено исследование и обобщены данные по бактериальной обсемененности рук курсантов за период с 2017 по 2023 гг. Произведен отбор 266 микробиологических проб: смыв с поверхности рук (контроль); смыв после работы со служебными собаками; после гигиенической обработки рук дезинфицирующим спреем или мылом. Анализируемые выборки: курсанты-кинологи (первого года обучения – 31 проба; второго года обучения – 60 проб; четвертого года обучения – 39 проб); курсанты факультета тыла (первого года обучения – 136 проб).

Исследование транзитной микрофлоры рук проводили: *методом смыва* [5; 6] и *методом отпечатков* [6; 7].

Гигиеническую обработку кожи рук курсантов производили спреем «Кожный антисептик», мылом твердым с антимикробным эффектом «Safeguard Activ», мылом твердым «Слоненок», марки «Ординарное» – согласно инструкции по применению.

Эффективность антисептической обработки оценивали по индексу бактерицидности, (%) [8]: Индекс бактерицидности (ИБ) = $100 - 2 \text{ или } 3 \text{ сост.} \cdot 100 / 1 \text{ сост.}$, где 1 состояние – поверхность кожи рук, не обработанная антисептиком, 2 и 3 состояние – варианты обработки.

Результаты исследования

В исследовании участвовали курсанты военного вуза, испытывающие повышенную контаминирующую нагрузку (курсанты-кинологи 2 года обучения, осуществляющие уход, кормление и дрессировку служебных собак согласно Приказу начальника №1500 от 27.12.2022 г. [9]) и курсанты факультетов кинологического (1 и 4 лет обучения) и тыла (1 года обучения), не имеющие в повседневной деятельности риска повышенной бактериальной нагрузки санитарно-показательными микроорганизмами.

Анализ экспериментальных данных по обсемененности поверхности кожи рук курсантов первого года показал (табл. 1), что количество санитарно-показательных микроорганизмов группы кишечной палочки составило $898,9 \pm 185,9$ КОЕ, что на 27,21% меньше, чем обсемененность кожи рук транзитной микрофлорой при повышенной нагрузке, связанной с уходом и кормлением курсантами служебных собак на втором году обучения (табл. 2).

Таблица 1 – Динамика обсемененности поверхности кожи рук у курсантов первого года обучения, БГКП, КОЕ/дм²

Курс обучения	1 курс	1 курс-1	1 курс-2	1 курс 1	1 курс 2
Год обучения	фев.23	ноя.21	ноя.21	ноя.22	ноя.22
БГКП, КОЕ	1396,8	1088,0	859,2	888,4	262,0
Среднее значение, (M±m)	898,9±185,9				

Таблица 2 – Динамика обсемененности поверхности кожи рук у курсантов второго года обучения, БГКП, КОЕ/дм²

Курс обучения	2 курс	2 курс
Год обучения	сен.19	сен.20
БГКП, КОЕ	1176,2	1294,0
Среднее значение, (M±m)	1235,0±34,01	

Анализ обсемененности кожи рук курсантов 4 года обучения оказался на 49,25% меньше чем количество бактерий группы кишечных палочек (БГКП) на поверхности рук у курсантов 1 и 2 курсов обучения (табл. 3).

Таблица 3 – Динамика обсемененности поверхности кожи рук у курсантов четвертого года обучения, БГКП, КОЕ/дм²

Курс обучения	4 курс	4 курс
Год обучения	сен.17	сен.19
БГКП, КОЕ	576,6	677,0
Среднее значение, (M±m)	626,8±28,98	

Проведен эксперимент, по оценке эффективности антисептической обработки поверхности кожи рук с применением кожных антисептиков. Анализ выявил, что индекс бактерицидности при обработке антисептическим средством в виде спрея, составил 47,19% (средний уровень корреляции) и 22,63% (сильная связь показателей до и после обработки) при гигиенической обработке антибактериальным мылом (табл. 4).

Таблица 4 – Динамика обсемененности поверхности кожи рук у курсантов первого года обучения до и после антисептической обработки, БГКП, КОЕ/дм²

Курс обучения	1 курс 1 взвод до обработки	1 курс 1 взвод после обработки	1 курс 2 взвод до обработки	1 курс 2 взвод после обработки
Год обучения	ноя.22	ноя.22	ноя.22	ноя.22
БГКП, КОЕ	888,4	317,6	262,0	108,6
Индекс бактерицидности, %	Антисептический спрей 47,19 Коэффициент корреляции r=0,6388		Антибактериальное мыло 22,63 Коэффициент корреляции r=0,8787	

Эффективность обработки мылом поверхности кожи рук курсантов 4 курса в эксперименте с дополнительной контаминирующей нагрузкой (занятия со служебными собаками) составила 63,41%, что выше ИБ в отношении антисептического средства в виде спрея (47,19%) и антибактериального мыла (22,63%) (рис. 1). Действительно, это лишь подтверждает факт снижения чувствительности микрофлоры кожи рук к антисептикам в связи с повышенной степенью обработки антибактериальными средствами в период пандемии Covid-19.

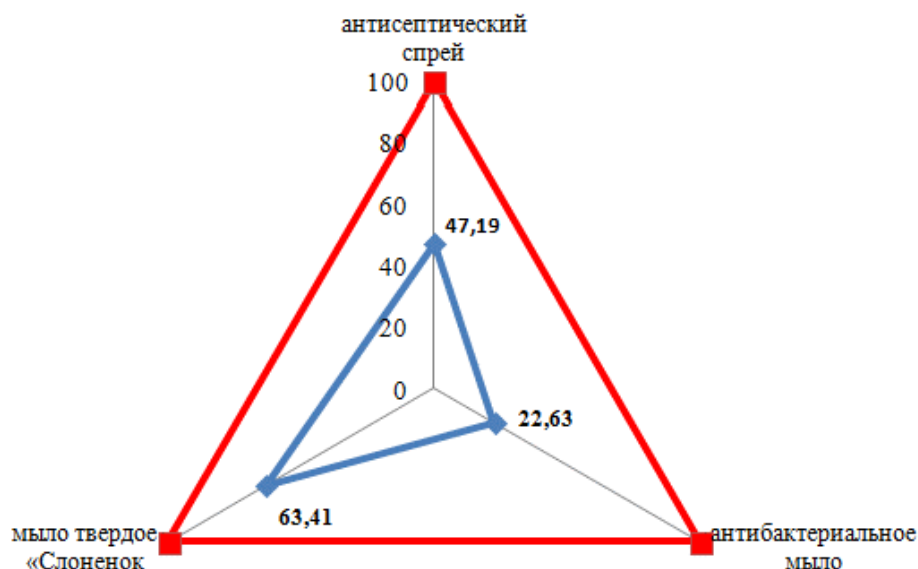


Рис. 1. Эффективность гигиенической обработки поверхности кожи рук военнослужащих военного вуза (красная линия – контроль 100% эффективность)

Таким образом, в ходе исследования выявлено, что взаимодействие со служебными собаками является дополнительной контаминирующей нагрузкой для военнослужащих. Контактный путь передачи инфекционного начала (вирусной, бактериальной, грибковой природы) при помощи рук является звеном в эпизоотической цепи и становится фактором риска здоровью в системе «человек-собака» и «человек-человек». В ходе эксперимента ни одно гигиеническое средство, обладающее, в том числе и антисептическими и антибактериальными свойствами не дало удовлетворительного результата. Известно, что эффективность обработки антисептическими и моющими средствами оценивается согласно п. 4.1. МР 4.2.02020-20: «Оценка «удовлетворительно» по качеству обработки оборудования, посуды, инвентаря, и др. может быть поставлена только тогда, когда санитарно-показательные, условно-патогенные, и патогенные микроорганизмы будут отсутствовать на поверхности обработанных предметов [6]. В условиях повышенной контаминирующей нагрузки (тесный контакт со служебной собакой, отсутствие возможности осуществить гигиену рук и пр.), основными критериями, по которым можно осуществить выбор антисептического средства для гигиенической обработки поверхности кожи рук, может быть: короткое время обработки, необходимый спектр антимикробного действия, безопасность, удобная для применения форма выпуска (антисептический спрей; гель антисептик для рук и пр.), активное действующее вещество (АДВ) антисептика, токсичность, способ нанесения средства, стоимость, производитель.

Библиографический список

1. General military charters of the Armed Forces of the Russian Federation with the Charter of the Military police as amended for 2020 – Moscow: Eksmo, 2020. – 480 p.
2. Krylova I.O. Contamination with mold fungi as a risk factor for the health of servicemen of the internal troops. Cynological Bulletin. Issue 7. Collection of scientific papers. Perm: PVI of the Ministry of Internal Affairs of Russia, 2015. pp. 186-192.
3. Alyoshukina A.V. Medical microbiology. Rostov-on-Don: Phoenix, 2003, 474 p.
4. Service Note "On some approaches to the participation of the National Guard troops of the Russian Federation in carrying out tasks to eliminate the consequences of major seasonal risks in the spring period in the conditions of the spread of Covid-19 coronavirus infection". Military Scientific Directorate, Scientific Center for Strategic Studies of the Federal Service of the VNG of the Russian Federation, Moscow: FS VNG of the Russian Federation, 2020. – 71 p
5. MUK 4.2.2942-11 "Methods of sanitary and bacteriological studies of environmental objects, air and sterility control in medical organizations".
6. Methodological recommendations of MR 4.2.02020-20 "4.2. Methods of control. Biological and microbiological factors. Methods of sanitary-bacteriological investigation of microbial contamination of environmental objects.
7. Krylova I.O. Guide to laboratory and practical work in microbiology for cadets-dog handlers: educational and methodical manual. – Perm: Publishing House of the PVI of the National Guard Troops, 2019. – 102 p.
8. Rafikova L.M., Abdullina G.I., Kirillova V.A. Determination of the sensitivity of the microflora of human skin to disinfection agents. /Medicine and healthcare: materials of the V International Scientific Conference (Kazan, May 2017). – Kazan: Publishing House "Buk", 2017. pp. 22-24.
9. Order of the head of the FGC HEU HE "Perm Military Institute VNG RF" No. 1500 dated 27.12.2022 "On the organization of combat training, internal and guard services for the 2023 academic year".

ЭКОЛОГО-ОРНИТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ АЭРОДРОМА «АЭРОПОРТ ТУРУХАНСК»

Харин Р.В

Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены сведения по результатам эколого-орнитологического обследования аэродрома «Аэропорт Туруханск» в 2019 г. Приведены видовой состав орнитофауны окрестностей и территории аэродрома; список видов птиц, представляющих наибольшую опасность для воздушных судов; суточная и сезонная динамика активности птиц; количественная оценка орнитологической обстановки на аэродроме; условия, способствующие скоплению птиц; некоторые рекомендации для обеспечения безопасности полетов.

Ключевые слова: авиационная орнитология, авиация, птиц и авиация, орнитология

ECOLOGICAL AND ORNITHOLOGICAL RESEARCH OF THE AIRFIELD «TURUKHANSK AIRPORT»

Kharin R.V.

Perm State National Research University, Perm, Russia

Abstract. The information on the results of ecological and ornithological research of the airfield "Turukhansk Airport" in 2019 is presented. A quantitative assessment of the ornithological situation at the airfield is given; the species composition of the avifauna of the vicinity and territory of the airfield; a list of bird species that pose the greatest danger to aircraft; daily and seasonal dynamics of bird activity; conditions conducive to the accumulation of birds; some recommendations for flight safety.

Keywords: aviation ornithology, aviation, birds and aviation, ornithology

В России по данным Государственного научно-исследовательского института гражданской авиации (ГосНИИГА) ежегодно происходит от 43 до 68 аварий, связанных с птицами [1]. Наибольшее количество инцидентов происходит на аэродромах или в непосредственной близости от них, во время взлета или посадки [2,3]. Поэтому особое внимание уделяется обследованию аэропорта и прилегающей территории. Безопасность полетов в гражданской авиации требует постоянного мониторинга орнитологической обстановки. Обобщение и анализ полученных сведений позволяет лучше понимать особенности динамики орнитологической обстановки на аэродроме и приаэродромной территории, и делать прогнозы.

Проведение таких работ позволяет повысить эффективность работы авиационной службы безопасности, что поможет сберечь человеческие жизни и снизить финансовые издержки, обеспечить нормальную работу аэропорта.

Целью работы являлось определение характера орнитологической обстановки на аэродроме и прилегающей территории в радиусе 15 км. Были проведены маршрутные учеты птиц; точечные учеты птиц, перемещающихся через взлетно-посадочную полосу; выявлен видовой состав орнитофауны окрестностей и территорий аэродромов; список видов птиц, представляющих наибольшую опасность для воздушных судов; суточная и сезонная динамика активности птиц; условия, способствующие скоплению птиц; а также предложены рекомендации для обеспечения безопасности полетов ВС.

Материал и методы исследования

Исследования проводились на аэродроме «Аэропорт Туруханск» и прилегающей территории в радиусе 15 км, пос. Туруханск Красноярского края. Весенние исследования проводились в период с 24 по 30 мая 2019 г., позднелетние наблюдения – с 24 по 28 июля.

Туруханск находится в 1474 км к северу от Красноярска, при впадении Нижней Тунгуски в Енисей, на 120 километров южнее полярного круга. Посёлок расположен на правом берегу Енисея; географически относится к западной части Восточной Сибири и к западным предгорьям Среднесибирского плоскогорья. Согласно геоботанической характеристике находится в таёжной зоне с резко континентальным субарктическим климатом.

При проведении работ руководствовались Приказом МГА СССР от 26.12.1988 № 209 «Об утверждении руководства по орнитологическому обеспечению полетов в гражданской авиации» (РООП ГА-89) [4].

Для формализованной количественной характеристики напряженности орнитологической обстановки на аэродромах выбрана методика В.А. Юдкина и М.А. Грабовского [5]. Вблизи торцов взлетно-посадочной полосы (ВПП) закладывается два постоянных наблюдательных пункта (ПНП), по одному с каждой стороны ВПП. Регистрируются все птицы, перемещающиеся через ПНП в границах видимости от наблюдателя. Оценивается высота и направление перемещения, особенности поведения встреченных птиц, по возможности, пол и возраст. Отмечаются пересечения ВПП и перемещения птиц вдоль ВПП, кружащие и сидящие на летном поле особи. Учеты проводятся в разное время суток и в разные сезоны года. 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 $\text{кг/час} \cdot \text{км}^2$. Оценки напряженности орнитологической обстановки проводится согласно таблице критериев, в зависимости от значения интенсивности перемещений ($\text{кг/час} \cdot \text{км}^2$): спокойная, удовлетворительная, умеренно-напряженная, чрезвычайно напряженная, критическая.

Для выявления мест скоплений, мигрирующих птиц и путей миграции, определения численности и видового состава птиц, характера их пребывания и поведения на аэродромах и прилегающей территории, а также выявление особенностей территории способствующих концентрации птиц, проведены маршрутные учеты и точечные наблюдения. Особое внимание уделяется выявлению мест скопления птиц. Использовались стандартные методики маршрутного учета птиц. Учитывались рекомендации по проведению маршрутных и точечных учетов птиц, особенности учетов для разных групп птиц и в разные сезоны года [6,7,8,9,10,11]. Порядок перечисления видов приведен по Л.С. Степаняну (2003).

Результаты исследований

За весь период наблюдений на аэродроме и прилегающей территории отмечено 69 видов птиц (на аэродроме 62 вида) из 20 семейств и 7 отрядов.

Таблица – Видовой состав птиц, зарегистрированных в аэропорту
и на прилегающей территории

Таксономическая единица	Отмечался на территории аэродрома	Отмечался на прилегающей территории
Белолобый гусь <i>Anser albifrons</i>	+	+
Пискулька <i>Anser erythropus</i>	+	+
Гуменник <i>Anser fabalis</i>	+	+
Чирок-свиистунок <i>Anas crecca</i>	+	+
Шилохвость <i>Anas acuta</i>	+	+
Хохлатая чернеть <i>Aythya fuligula</i>	-	+
Черный коршун <i>Milvus migrans</i>	+	+
Полевой лунь <i>Circus cyaneus</i>	+	-
Орлан-белохвост <i>Haliaeetus albicilla</i>	-	+
Дербник <i>Falco columbaris</i>	+	+
Золотистая ржанка <i>Pluvialis arcticaria</i>	+	-
Галстучник <i>Charadrius hiaticula</i>	+	-
Малый зуек <i>Charadrius dubius</i>	+	+
Фифи <i>Tringa glareola</i>	+	+
Большой улит <i>Tringa nebulosa</i>	+	+
Мородунка <i>Xenus cinereus</i>	+	+
Кулик-воробей <i>Calidris minuta</i>	+	+
Чернорзобик <i>Calidris alpina</i>	+	-
Бекас <i>Gallinago gallinago</i>	+	+
Кроншнеп <i>Numenius</i> sp.	+	-
Халей <i>Larus heuglini</i>	+	+
Сизая чайка <i>Larus canus</i>	+	+
Речная крачка <i>Sterna herundo</i>	-	+
Сизый голубь <i>Columba livia</i>	+	+
Болотная сова <i>Asio flammeus</i>	+	+
Большой пестрый дятел <i>Dendrocopus major</i>	+	+
Береговая ласточка <i>Riparia riparia</i>	+	+
Деревенская ласточка <i>Hirundo rustica</i>	+	+
Рогатый жаворонок <i>Eremophila alpestris</i>	+	+
Лесной конек <i>Anthus trivialis</i>	+	+
Пятнистый конек <i>Anthus hodgsoni</i>	+	+
Желтая трясогузка <i>Motacilla flava</i>	+	+
Белая трясогузка <i>Motacilla alba</i>	+	+
Сорока <i>Pica pica</i>	+	+

Таксономическая единица	Отмечался на территории аэродрома	Отмечался на прилегающей территории
Кедровка <i>Nucifraga caryocatactes</i>	+	+
Черная ворона <i>Corvus corone</i>	+	+
Серая ворона <i>Corvus cornix</i>	+	+
Ворон <i>Corvus corax</i>	+	+
Свиристель <i>Bombycilla garrulus</i>	+	+
Серая славка <i>Sylvia communis</i>	-	+
Пеночка-весничка <i>Phylloscopus trochilus</i>	+	+
Пеночка-теньковка <i>Phylloscopus collybita</i>	+	+
Пеночка-таловка <i>Phylloscopus borealis</i>	-	+
Желтоголовый королек <i>Regulus regulus</i>	-	+
Серая мухоловка <i>Muscicapa striata</i>	+	+
Малая мухоловка <i>Ficedula pavra</i>	+	+
Черноголовый чекан <i>Saxicola torquata</i>	+	+
Обыкновенная каменка <i>Oenanthe oenanthe</i>	+	+
Обыкновенная горихвостка <i>Phoenicurus phoenicurus</i>	+	+
Варакушка <i>Luscinia svecica</i>	+	+
Синехвостка <i>Tarsiger cyanurus</i>	-	+
Рябинник <i>Turdus pilaris</i>	+	+
Оливковый дрозд <i>Turdus obscurus</i>	+	+
Чернозобый дрозд <i>Turdus atrogularis</i>	+	+
Белобровик <i>Turdus iliacus</i>	+	+
Пестрый дрозд <i>Zoothera dauma</i>	+	+
Буроголовая гаичка <i>Parus montanus</i>	+	+
Обыкновенный поползень <i>Sitta europaea</i>	-	+
Домовый воробей <i>Passer domesticus</i>	-	+
Полевой воробей <i>Passer montanus</i>	+	+
Зяблик <i>Fringilla coelebs</i>	+	+
Вьюрок <i>Fringilla montifringilla</i>	+	+
Обыкновенная чечетка <i>Acanthis flammea</i>	+	+
Обыкновенная чечевица <i>Carpodacus erythrinus</i>	+	+
Красноухая овсянка <i>Emberiza cioides</i>	+	+
Камышовая овсянка <i>Emberiza schoeniclus</i>	+	+
Полярная овсянка <i>Emberisa pallaris</i>	+	+
Овсянка-крошка <i>Emberiza pusilla</i>	+	+
Лапландский подорожник <i>Calcarius lapponicus</i>	+	+
Пуночка <i>Plectrophenax nivalis</i>	+	+
Итого	62 вида	69 видов

Всех птиц, которые регистрируются на аэродроме или в непосредственной близости от него можно объединить в несколько групп по характеру пребывания и поведения.

1. Птицы, гнездящиеся и использующие аэродром в качестве кормовой станции.

Из постоянных обитателей, использующих летное поле как место для гнездования и кормовую станцию, основную часть составляют желтая трясогузка, белая трясогузка, черноголовый чекан, варакушка, лесной конек, пятнистый конек, дрозды и др. Эти птицы могут регулярно и многократно пересекать ВПП в поисках корма или при защите территории. Из-за малых размеров эти виды при столкновении не причиняют серьезного ущерба самолетам. В тоже время, из-за высокой плотности их населения, достигаемой после завершения размножения, могут возникать помехи при движении воздушного судна по взлетно-посадочной полосе. В период массового появления летных молодых птиц этих видов, их скопления привлекают на аэродром хищных птиц.

В качестве кормовой станции выкошенные участки вдоль взлетно-посадочной полосы используют вороны и сороки. Эти виды кормятся на поверхности земли в непосредственной близости от взлетно-посадочной полосы, а также пересекают ее весьма часто.

На территорию аэропорта в поисках корма часто залетают черные коршуны, болотная сова и чайки. Периодически на территории аэропорта регистрировался небольшой сокол – дербник, который охотился здесь на птиц.

2. Птицы, кормящиеся за пределами аэродрома в непосредственной близости у периметра.

Имеется ряд видов, которые используют для поиска корма не сам аэродром, а ближайшие пространства. Для птиц нет границ между пространством до и после периметра аэропорта. Находясь в поисках пищи, они часто посещают территорию аэропорта. К таким видам относятся черный коршун, болотная сова, береговая ласточка, сорока, черная и серая вороны.

3. Птицы, останавливающиеся в аэропорту во время миграций.

Во время весенних миграций птицы, по пути с юга на север, могут останавливаться на территории аэропорта на отдых и в поисках пищи. Так, в конце мая регистрировались стайки куликов от нескольких особей до 60-100 особей: золотистая ржанка, галстучник, малый зуек, фифи, мородунка, кулик-воробей, чернозобик, грязовик. Из воробьинообразных на территории аэропорта отмечены стайки от 10 до 60 особей: рогатый жаворонок, коньки, трясогузки, свиристель, дрозды, овсянки. Кроме того, около ВПП и в непосредственной близости отмечены гуси и утки. Перемещения остановившихся на территории аэропорта мигрирующих птиц не носят направленного характера. Транзитные стаи птиц имели северное – северо-восточное направление движения. В конце лета основной вклад в сложную орнитологическую обстановку вносят вороны (черная ворона), кулики (галстучник), сизые голуби и мелкие воробьинообразные (желтая трясогузка, белая трясогузка, черноголовый чекан), а также черный коршун.

Места скоплений птиц и особенности территории, способствующие концентрации птиц

В границах 15-км зоны основные места концентрации птиц зарегистрированы на свалке ТБО, в пос. Туруханск и на территории аэропорта.

Одно из наибольших скоплений птиц найдено на свалке ТБО. Весной скопления чаек насчитывали около 50 особей, серой и черной вороны до 140 особей, воронов до 20 особей.

Отмечен орлан-белохвост. Летом отмечены скопления серой и черной вороны, воронов. Птиц привлекает открытая территория и наличие корма. Столь близкое расположение мест концентрации птиц рядом с аэропортом значительно повышает риски столкновения птиц с воздушными судами.

Весной на бесснежных участках в пос. Туруханск отмечались стаи мелких воробьинообразных – воробьи, выюрки, чечетки, овсянки и др. Регистрировались стаи дроздов. Весной и летом вечером наблюдались скопления серых и черных ворон, сорок.

На р. Енисей отмечались пролетающие стаи уток, куликов и чаек, а также скопления сорок, серых и черных ворон. В прибрежной пойменной растительности отмечались стаи дроздов, зябликов, выюрков.

На территории аэропорта имеются участки, где весной скапливается талая вода и образуются временные водоемы. Имеется множество сырых участков и участков с открытой почвой (нарушен травяной покров, нет дерна), открытых участков с очень низкой травой. Вместе с тем на территории аэропорта много кустарниковой растительности и деревьев. Весной поверхность быстро освобождается от снежного покрова. В итоге, на этой территории возникают оптимальные условия для привлечения разных групп птиц.

Сезонные и суточные перемещения птиц

Сезонные перемещения птиц могут представлять большую опасность для авиации [2,3]. Во время весенних наблюдений (конец мая) на территории аэропорта регистрировались скопления мигрирующих птиц – гуси, утки, кулики, мелкие воробьинообразные. Особенно следует отметить гусей, которые регистрировались на территории аэропорта, находились около ВПП. Количество их было не велико 3-5 особей. Но даже одиночные особи видов крупного размера могут представлять серьезную угрозу для ВС. Из уток зарегистрированы крупные стаи шилохвости (до 100 особей) и чирков-трескунков (до 15 особей). Которые пересекали ВПП, а также останавливались на территории аэропорта для отдыха. Среди мигрирующих куликов на территории аэропорта отмечены стаи золотистых ржанок, смешанные стаи галстучников и малых зуйков, стайки мородунок, куликов-воробьев, чернозобиков. Из воробьинообразных птиц на территории аэропорта регистрировались стаи рогатых жаворонков, свиристелей.

Согласно журналам регистрации скоплений птиц, на аэродроме в весенний период наиболее массовые скопления в 2017 и 2018 гг. отмечены для чаек во второй половине мая. Отмечались стаи чаек от 10 до 100 особей.

Перемещения остановившихся на территории аэропорта мигрирующих птиц не носят направленного характера. Мигрирующие стаи птиц на прилегающей территории имели северное – северо-восточное направление движения.

В конце лета появляются в массе молодые птицы, которые представляют наибольшую угрозу для воздушных судов. Не имея достаточного жизненного опыта, они могут «неправильно» реагировать на приближающееся воздушное судно, способствуя возникновению опасных ситуаций. Молодые птицы часто сбиваются в стайки, могут совершать разведывательные полеты и чаще появляться на территории аэропорта.

Массовых и интенсивных сезонных перемещений в конце июля на территории аэропорта не наблюдалось. Все перемещения относятся, скорее всего, к местным (молодым) птицам. Направленного сезонного перемещения птиц не отмечено.

Количественная характеристика орнитологической обстановки на аэродроме.

Согласно критериям использованной методики [5] весной в мае орнитологическая обстановка на аэродроме характеризовалась, как критическая. Интенсивность перемещений птиц колебалась от 44 до 235 кг/ч*км², в среднем составляла 112 кг/ч*км² (рис. 1).

Наблюдается небольшая разница интенсивности перемещений птиц на разных торцах ВПП (рис. 1). Наибольшая интенсивность перемещений птиц отмечалась в юго-восточной части ВПП, в разные периоды суток менялась от 101 до 235 кг/ч*км², в среднем за день – 136 кг/ч*км² (рис.2-3). Днем интенсивность наименьшая, вечером – наибольшая. На противоположной стороне ВПП, в северо-западной части, интенсивность перемещений птиц немного меньше, колеблется в разные периоды суток от 44 до 128 кг/ч*км², в среднем за день – 87 кг/ч*км² (рис. 1–3). Утром интенсивность наименьшая, вечером – наибольшая.

В конце лета орнитологическая обстановка характеризуется как удовлетворительная, ближе к спокойной. Интенсивность перемещений птиц колеблется от 0,2 до 13 кг/ч*км², в среднем составляет 7 кг/ч*км² (рис. 1). В среднем разница в интенсивности перемещений на разных торцах нет, наибольшая активность отмечалась утром и днем, наименьшая вечером (рис. 2–3).

В среднем за два сезона наблюдений орнитологическая обстановка на территории аэропорта характеризуется, как чрезвычайно напряженная. Основные перемещения птиц на территории аэропорта не превышали 60 метров.

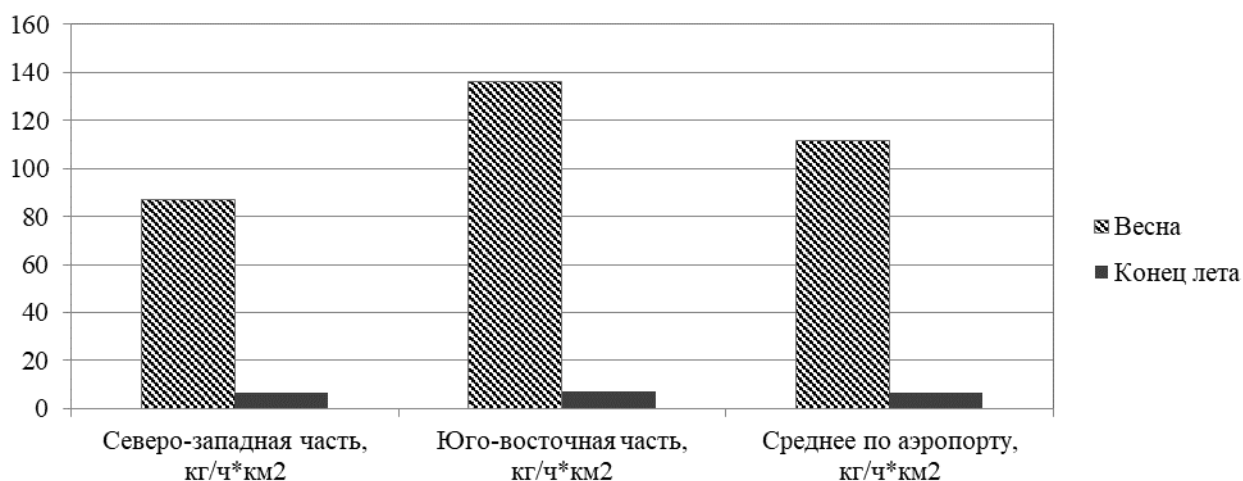


Рис. 1. Интенсивность перемещений птиц во всех направлениях через ВПП, кг/час*км².

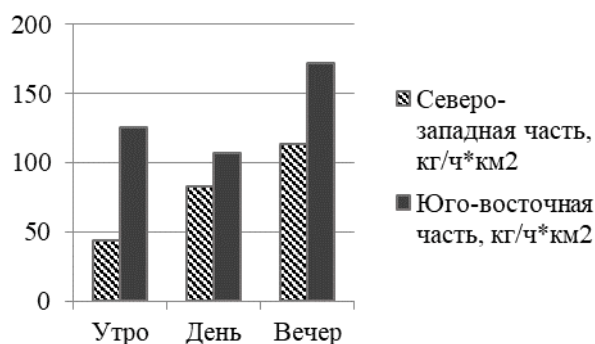


Рис. 2. Интенсивность перемещений птиц через ВПП в разное время суток весной, кг/час*км².

Заключение

В мае орнитологическая обстановка критическая, в конце лета – удовлетворительная, ближе к спокойной. В среднем за два сезона наблюдений орнитологическая обстановка на территории аэропорта характеризуется, как чрезвычайно напряженная.

Основной вклад в сложную орнитологическую обстановку вносят мигрирующие и останавливающиеся на территории аэропорта птицы – гуси, утки (шилохвость, чирок-свистунок), кулики (золотистая ржанка, чернозобик и др.), чайки (халей), воробьинообразные (рогатый жаворонок, свиристель и др.). В предоставленных сотрудниками аэропорта данных из журналов регистрации скоплений птиц на ВПП в 2017 и 2018 гг. [13] также следует, что наиболее массовыми птицами весной и в конце лета являются чайки и кулики.

Перемещения остановившихся на территории аэропорта мигрирующих птиц не носят направленного характера. Весной мигрирующие стаи птиц имели северное – северо-восточное направление движения. В конце лета направленного перемещения кочующих птиц не отмечено.

На прилегающей к аэропорту территории основные места массовой концентрации птиц находятся на полигоне ТБО (чайки, врановые), в пойме р. Енисей (утки, кулики, чайки, мелкие воробьинообразные) и в пос. Туруханск (вороны, сороки, мелкие воробьинообразные). Массовые перемещения ворон отмечались между полигоном ТБО и пос. Туруханск.

Основную опасность для воздушных судов представляют кулики (особенно золотистая ржанка и чернозобик), чайки (особенно халей), врановые (особенно черная ворона, серая ворона и сорока), рогатый жаворонок, свиристель.

Потенциально высокую опасность могут представлять крупные хищники, сизые голуби, массовые скопления мелких воробьинообразных птиц.

Рекомендации

Кроме системы мероприятий в соответствии с Воздушным кодексом РФ, Федеральными авиационными правилами, Руководством по орнитологическому обеспечению полетов в гражданской авиации (РООП ГА-89) [4] мы рекомендовали обратить внимание на несколько моментов.

Сведение древесно-кустарниковой растительности.

Авторы методики количественной характеристики основных параметров орнитологической обстановки на аэродроме [5] указывают, что высота растительного покрова на большей части территории аэропорта должна быть не менее 40 см.

Дополнительным фактором привлечения птиц могут стать участки с оголённой почвой (лишенные дернового слоя). Такие участки следует ликвидировать.

На аэродроме имеется система осушения и водоотведения, но требуется уделять особое внимание работоспособности системы осушения, особенно в весенний период. Временные водоемы и сырые участки на территории аэропорта могут стать причиной массовых скоплений куликов.

Следует проводить мониторинг численности и перемещений птиц на свалке ТБО.

Сбор сведений о случаях столкновений и регистрации погибших птиц в результате воздействий воздушных судов нужно производить с обязательной таксономической идентификацией объектов и детальным анализом случаев столкновений.

В журналах учета орнитологической обстановки на аэродроме при невозможности определить таксономическую принадлежность птиц следует, как минимум, описать размеры

птиц по отношению к общеизвестным видам (размером с ворону, крупную утку, дрозда, воробья и т.п.). По возможности нужно указывать направление мигрирующих стай.

Библиографический список

1. Ильичёв В.Д., Силаева О.Л., Золотарёв С.С. и др. Защита самолетов и других объектов от птиц. – М.: КМК, 2007. – 319 с.
2. Рогачев А.И., Лебедев А.М. Орнитологическое обеспечение безопасности полетов. – М.: Спорт, 1984. – 126 с.
3. Якоби В.Э. Биологические основы предотвращения столкновений самолетов с птицами. – М.: Наука, 1974. – 166 с.
4. Приказ Министерства Гражданской Авиации СССР от 26.12.1988 N 209 «Об утверждении Руководства по орнитологическому обеспечению полетов в гражданской авиации (РООП ГА-89)».
5. 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.
6. Новиков, Г.А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных / Г.А. Новиков. – М.: Сов. наука, 1953. – 503 с.
7. Благосклонов К.Н. Методы учета численности и географического распределения наземных позвоночных / К.Н. Благосклонов, В.И. Осмоловская, А.Н. Формозов. – М.: Изд-во АН СССР, 1952. – 316 с.
8. 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.
9. 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.
10. Гаврилов Э.И. Методика сбора и обработки материалов по количественной характеристике видимых миграций птиц // Методы изучения миграций птиц. М.: Наука, 1977. – С. 96–117.
11. Кузякин, А.П. Метод учета лесных птиц / А.П. Кузякин // География и экология наземных позвоночных Нечерноземья. Птицы. – Владимир, 1981. – С. 38 – 48.
12. Степанян Л.С. Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий (в границах СССР как исторической области). М.: Академкнига, 2003. – 808 с.
13. Журналы регистрации сведений о скоплении птиц на аэродроме Туруханск 2017 – 2018 гг.

ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ АККУМУЛЯЦИИ МИКРОПЛАСТИКА В РЫБАХ, НАСЕЛЯЮЩИХ ВОДНЫЕ ОБЪЕКТЫ ПЕРМСКОГО ПРИКАМЬЯ

Пепеляева А.Д.¹, Бакланов М.А.¹, Михеев П.Б.^{1,2}

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Хабаровский филиал ФГБНУ «ВНИРО», Хабаровск, Россия

Аннотация. Описана проверка методических подходов к выделению микропластика из органов и тканей свежих и фиксированных в формалине рыб. Представлены первичные данные по оценке содержания микропластика в желудочно-кишечных трактах двух видов рыб – обыкновенной плотвы *Rutilus rutilus* и речного окуня *Perca fluviatilis* из городского водоема.

Ключевые слова: микропластик, антропогенное загрязнение, рыбы, плотва, окунь

METHODOLOGICAL SOLUTIONS FOR THE ASSESSMENT OF THE ACCUMULATION OF MICROPLASTICS IN THE FISHES OF THE PERM KRAI

Pepeliaeva A.D.¹, Baklanov M.A.¹, Mikheev P.B.^{1,2}

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Khabarovsk Branch of the All-Russian Scientific Research Institute of Fisheries and Oceanography, Khabarovsk, Russia

Abstract. The testing of methodological solutions for the extraction of microplastics from organs and tissues of fresh and fish preserved in formalin is described. Primary data are presented to assess the content of microplastics in the gastrointestinal tracts of two species of fish – the common roach *Rutilus rutilus* and the Eurasian perch *Perca fluviatilis* from an urban waterbody.

Keywords: microplastic, anthropogenic pollution, fish, roach, perch

В настоящее время во всем мире активно проводятся исследования по накоплению микропластика в организмах разных систематических групп. Повышенный интерес к данной проблеме вызван активным загрязнением окружающей среды полимерными материалами, произведенными человечеством. Микропластик разделяют на первичный и вторичный. Первичный микропластик изначально поступает в среду в виде микрочастиц, а вторичный – это, как правило, обычный пластиковый мусор, разрушенный под воздействием внешней среды. Несмотря на значительную инертность к внешним воздействиям многих пластиков, в природных условиях, вследствие фотоокисления, механического и биологического разрушения, происходит их фрагментация до макро- (свыше 5 мм), микро- (от 5 мм до 1 мкм) и нано- (менее 1 мкм) частицы, попадающие в пищевые цепи водных и наземных сообществ.

В организме животных частицы пластика могут оказывать негативное воздействие через механическое раздражение стенок желудочно-кишечного тракта, а также в результате разложения полимерных цепочек под воздействием пищеварительных ферментов и микрофлоры кишечника. Кроме того, добавки, которые вводятся в состав полимеров при производстве для окраски, достижения долговечности, гибкости, зачастую являются токсичными. Также, показано, что микропластики могут адсорбировать из окружающей среды стойкие органические загрязнители, тяжелые металлы и другие поллютанты [1-4], таким образом, выступая их переносчиками.

В настоящее время пресноводные организмы, в плане накопления микропластика, являются менее исследованными, по сравнению с морскими [5]. В России эти исследования пока единичны и затрагивают лишь отдельные водные объекты и виды гидробионтов [6-8 и др.].

Для изучения процессов аккумуляции микропластика в водных экосистемах Прикамья в качестве модельного водоема выбрана протекающая в г. Перми р. Мотовилиха (длина – 8,5 км, площадь водосбора – 28,1 км²) и расположенный на ней Мотовилихинский пруд (площадь водоема – 0,076 км², объем воды – 165 тыс. м³, средняя глубина водоёма – 2,17 м). Наличие на реке каскада прудов ограничивает перемещение гидробионтов (в первую очередь рыб) позволяя анализировать процессы биоаккумуляции на разных участках. Также пруды обеспечивают большую численность и видовое разнообразие рыб, что позволяет осуществлять отбор проб без значительного влияния на структуру водных сообществ.

Имеется несколько подходов к определению наличия микропластика в организме животных. Одним из наиболее часто используемых является растворение органов и тканей животных в различных химических растворах (например, в щелочах, кислотах, органических растворах, концентрированной перекиси водорода) или ферментах (целлюлаза, протеиназа-К или хитиназа), для дальнейшего фильтрования [9].

В рамках начала работ по изучению содержания микропластика в рыбах в летний период 2023 г. была проведена оценка методов его выделения из органов и тканей рыб. Пробы желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), мускулатуры и печени рыб из Мотовилихинского пруда растворялись тремя способами: 1) в концентрированной азотной кислоте с добавлением концентрированной перекиси водорода в течение 10-20 минут при температуре 180°C; 2) в концентрированной перекиси водорода; 3) в 10%-ном растворе щелочи КОН. Два последних варианта проверялись при комнатной температуре и в сушильном шкафу при 60°C в течение 24 ч. Использовалось два варианта проб органов и тканей – от свежих замороженных рыб и от рыб, фиксированных в 4% формалине. Последний вариант был обусловлен облегчением сохранения фиксированных проб в полевых условиях и их транспортировки.

Эксперименты с азотной кислотой показали, что пробы растворяются, но в полученном растворе сохраняются жирные фракции, которые при дальнейшей фильтрации забивают фильтр. Концентрированная перекись водорода при комнатной температуре не полностью растворяет ткани (особенно ЖКТ), в сушильном шкафу при температуре 60°C растворение происходит лучше, но ткани после фиксации в формалине окончательно не растворяются. Наиболее подходящим способом оказалось растворение проб в 10%-ном растворе щелочи КОН – полное растворение происходило как тканей и органов от свежей рыбы, так и от особей после фиксации в формалине.

Дальнейшая фильтрация полученных растворов проводилась с помощью вакуумного мембранного насоса НВМ-0,33II (Россия) через фильтры с размером пор 82 мкм. После фильтрации фильтры просушивались и просматривались под бинокулярным микроскопом с переменным увеличением. Частицы микропластика выделялись по нетипичным для естественных объектов цвету (красный, синий, черный и т.д.) и форме (чаще всего – длинные волокна). При выявлении микропластика в анализируемых пробах учитывали форму, цвет и размер частиц, и осуществлялась фотофиксация.

После апробации разных методических подходов, как наиболее оптимальный был выбран способ растворения проб в 10%-ном растворе щелочи КОН. С помощью этого метода было обработано по 9 желудочно-кишечных трактов от 2 видов рыб из Мотовилихинского пруда – плотвы и окуня. Все особи перед обработкой были зафиксированы в 4% водном растворе формальдегида и находились в нем более 2 месяцев.

Особи окуня были представлены молодыми рыбами длиной от 90 до 130 мм и массой от 15,5 до 44,4 г. Их обследование показало наличие микропластика в ЖКТ у 5 особей из числа проанализированных рыб, при этом у одной особи отмечалось от 1 до 3 частиц микропластика, в среднем 1,8 шт./особь. Выборка плотвы включала неполовозрелых рыб длиной от 63 до 95 мм и массой от 3,4 до 15,1 г. Частицы микропластика встречались в ЖКТ у 8 из 9 проанализированных рыб. На одну особь приходилось от 1 до 6 частиц микропластика, в среднем 3,5 шт./особь. Таким образом, эти предварительные данные показывают различие между обследованными видами рыб как по встречаемости микропластика в ЖКТ, так и по числу частиц, приходящихся в среднем на одну особь. Скорее всего, эта разница обусловлена типом питания этих рыб: окунь эвризеофаг, активно ищущий и преследующий относительно крупных беспозвоночных и молодь рыб, плотва – эврифаг, потребляющий наряду с животной пищей растительную (водоросли), а также детрит.

Дальнейшие исследования, с анализом содержимого ЖКТ перед растворением проб, позволят точнее установить причины возможных расхождений у рыб с разным типом питания.

Библиографический список

1. Auta H.S., Emenike C.U., Fauziah S.H. Distribution and importance of microplastics in the marine environment. A review of the sources, fate, effects, and potential solutions // *Environment International*. 2017. 102. pp. 165–176
2. Brennecke D., Duarte B., Paiva F., Caçador I., Canning-Clode J. Microplastics as vector for heavy metal contamination from the marine environment // *Estuar Coast Shelf Sci*. 2016. 178. pp. 189–95.
3. Cole M., Lindeque P., Halsband C., Galloway T.S. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review // *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2011. 62(12):2588-97. doi: 10.1016/j.marpolbul.2011.09.025.
4. Shim W.J., Hong S.H., Eo S. Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition [Internet] // *Microplastic Contamination in Aquatic Environments*. Elsevier Inc. 2018. 1–26 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-813747-5.00001-1>.
5. Rochman C.M., Hoellein T. The global odyssey of plastic pollution. Thinking big about small particles reveals new features of the microplastic cycle // *Science*. 2020. V. 368. pp. 1184–1185.

6. Frank Yu. A., Vorobiev E.D., Babkina I.B. [et al.] Microplastics in fish gut, first records from the Tom River in West Siberia, Russia // Tomsk State University Journal of Biology. 2020. №52. pp. 130–139.
7. Рахматуллина С.Н., Лемешко Я.Р., Воробьев Е.Д. [и др.] Детекция микропластика в желудочно-кишечном тракте пресноводных рыб на примере обитателей речной системы Оби // Мат-лы I Всерос. конф. с междунар. уч. по загрязнению окружающей среды микропластиком. Томск. 2022. С. 24–28.
8. Рахматуллина С.Н. Микропластик в желудочно-кишечном тракте сибирского ельца в реке Нижняя Тунгуска // Молодёжная наука: сборник статей IX Междун. науч.-практ. конф. Пенза. 2023.С. 15–17.
9. Lusher A., Welden N., Sobral P. & Cole M. Sampling, isolating and identifying microplastics ingested by fish and invertebrates // Anal. Methods. 2017. 9: 1346–1360.

ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДНОГО ЗАСОЛЕНИЯ НА ХОД РАННЕГО РАЗВИТИЯ И СМЕРТНОСТЬ ИКРЫ И ПРЕДЛИЧИНОК ПРЕСНОВОДНЫХ ВИДОВ РЫБ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ НА ПРИМЕРЕ РЕЧНОГО ОКУНЯ *PERCA FLUVIATILIS*

Якубова К.С.¹, Михеев П.Б.^{1,2}, Вяткина Ю.С.¹, Бакланов М.А.¹

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия;

² Хабаровский филиал ВНИРО, Хабаровск, Россия

Аннотация. Засоление в результате использования в зимний период соледобывающих реагентов и разработок месторождений соли является серьезной экологической проблемой. Целью исследования явилась экспериментальная оценка влияния засоления хлоридом натрия и отходами соледобычи на икру и предличинок *Perca fluviatilis*. Границей толерантности (LC₅₀) при воздействии NaCl в течение 96 часов явилось значение минерализации равное 8,6 г/л, при экспозиции 15 сут. – 3,9 г/л. Результаты свидетельствуют о повышенной токсичности отходов соледобычи по сравнению с раствором NaCl. Наибольшая чувствительность к засолению у икринок характерна на последнем – 8-м этапе развития зародыша перед выклевом.

Ключевые слова: *Perca fluviatilis*, техногенное засоление, толерантность, LC₅₀, морфологические аномалии

INFLUENCE OF CHLORIDE SALINIZATION ON THE COURSE OF EARLY DEVELOPMENT AND MORTALITY OF EGG AND PRELARVALS OF FRESHWATER FISH SPECIES OF THE BOREAL ZONE BY THE EXAMPLE OF RIVER *PERCA FLUVIATILIS*

Yakubova K.S.¹, Mikheev P.B.^{1,2}, Vyatkina Y.S.¹, Baklanov M.A.¹

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia;

² Khabarovsk Branch of VNIRO, Khabarovsk, Russia

Abstract. Salinization of freshwaters as a result of deicing salts in winter and salt mining is a serious environmental problem. The aim of the study was an experimental assessment of the effect of chloride salinization on eggs and pre-larvae of *Perca fluviatilis*. The tolerance limit (96 h LC₅₀) for NaCl was a mineralization value of 8.6 g/l, after 15 days – 3.9 g/l. The results indicate increased toxicity of salt mining waste compared to NaCl solution. The greatest sensitivity to salinity in eggs is typical for the last 8th stage of development before hatching of the pre-larvae from the egg.

Keywords: *Perca fluviatilis*, техногенное засоление, толерантность, LC₅₀, морфологические аномалии

Введение

Разнообразие и количество загрязняющих веществ антропогенного происхождения достаточно велико. Негативное воздействие стресс-факторов антропогенной природы может ощущаться на всех этапах жизненного цикла, однако гидробионты зачастую более уязвимы, чем наземные животные. Кроме того, повышенная смертность на критических стадиях жизненного цикла, в частности в период раннего развития, может крайне негативно сказаться на структуре сообществ и сохранении биоразнообразия. Целью данного исследования явилась экспериментальная оценка выживаемости икринок и предличинок речного окуня *Perca fluviatilis*. Известно, что для стадии икринки характерна высокая смертность, однако в литературе отсутствуют сведения о различии стадий эмбрионального развития речного окуня по чувствительности к засолению. Нами было проведено тестирование толерантности икры окуня к засолению на 5-й стадии (органогенез) и 8-й (эмбрионы перед выклевом) стадиях развития. Кроме того, поскольку отходы соледобычи имеют большое количество примесей [Van Dam et al., 2014], второй целью нашего исследования являлся сравнительный анализ токсичности хлорида натрия и вещества солеотвалов с использованием икры окуня в качестве тест-объекта. Рабочей гипотезой исследования являлось предположение о большей токсичности отходов соледобычи по сравнению с хлоридом натрия, а также большая смертность эмбрионов на более ранней стадии развития [Michibata et al., 1987].

Материал и методы

В качестве материала для экспериментальной оценки использовали икру окуня. Икра была собрана на мелководных участках Мотовилихинского пруда (г. Пермь), который расположен в локации с координатами 58°02'20" с. ш. 56°19'23" в. д. Икру собирали в прибрежье. В целях обеззараживания, в лабораторных условиях икру обрабатывали 1% раствором формалина, после чего помещали по 30-35 икринок в чашки Петри с тестируемым раствором в трех повторностях. Эксперимент проходил при температурных условиях, оптимальных для нереста и развития икры окуня (8-15°C). Продолжительность эксперимента составила 16 дней для икры на 5 стадии и 10 дней для икры на 8 стадии. В эксперименте было задействовано два типа соли: хлорид натрия и вещество солеотвалов Верхнекамского месторождения солей. Концентрация соли для каждого типа соли составляла 4 г/л, 8 г/л, 12 г/л, 16 г/л, 20 г/л и 24 г/л. Для тестирования токсичности различных солей использовали икру на 4 стадии (образование гастролы по Е. Н. Смирновой, М. З. Владимирову и Р. С. Вольскису).

Проводили подготовку растворов с минерализацией 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 и 11 г/л. Затем проводили пересадку икринок в количестве 15-46 (в среднем 26,9) экз. в чашки Петри с тестируемым раствором. Для создания фоновых условий использовали водопроводную воду. Подсчет мертвых и живых икринок проводили каждый день, мертвая икра не изымалась. После окончания эксперимента выживших предличинок фиксировали формалином. Далее проводили измерения длины тела и желточного мешка, оценивали характер морфологических аномалий у фиксированных особей под биноклем МБС-12.

Результаты

В результате эксперимента было установлено, что при воздействии раствора хлорида натрия продолжительностью 96 часов значение LC_{50} для икринок, помещенных в условия засоления на 4 эмбриональном этапе, составило 8,6 г/л, при экспозиции 15 сут. – 3,9 г/л.

На 5 стадии развития гибель икринок наступала в течение первых суток при солёности 20 и 24 г/л. В условиях солёности 16 и 12 г/л икринки погибали на 4 и 8 сутки с начала эксперимента соответственно, развитие эмбрионов внутри оболочек не происходило. При концентрации 8 г/л предличинки характеризовались большой встречаемостью аномалий раз-

вития, выклеывались лишь единичные экземпляры. К концу эксперимента, в растворе хлорида натрия смертность составила от 100 до 53% икринок (для трех повторностей) и от 100 до 86% для икринок в растворе отходов соледобычи. В условиях солёности 4 г/л, смертность к концу эксперимента была близка фоновым значениям (43-24%) и составила 26-20% в растворе NaCl и 71-27% в растворе вещества солеотвалов.

Икринки, помещенные в условия повышенной минерализации на последнем – 8-м этапе развития зародыша перед выклевом из икринки, характеризовались большими темпами смертности. При концентрации солей свыше 12 г/л гибель предличинок происходила в течение первых суток с начала эксперимента. При концентрации 8 г/л все икринки гибли по прошествии 10 суток. Как в фоновых условиях, так и при минерализации 4 г/л массовый выклев свободных эмбрионов из икринок отмечался на 10 сутки с начала эксперимента, показатели смертности были близки.

Была выявлена большая токсичность вещества солеотвалов по сравнению с хлоридом натрия, проявившаяся в меньших значениях длины тела и объема желточного мешка у предличинок, помещенных на стадии органогенеза в раствор отходов соледобычи, по сравнению с особями, содержащимися в растворе NaCl концентрации 4 г/л. (рис. 1-4).

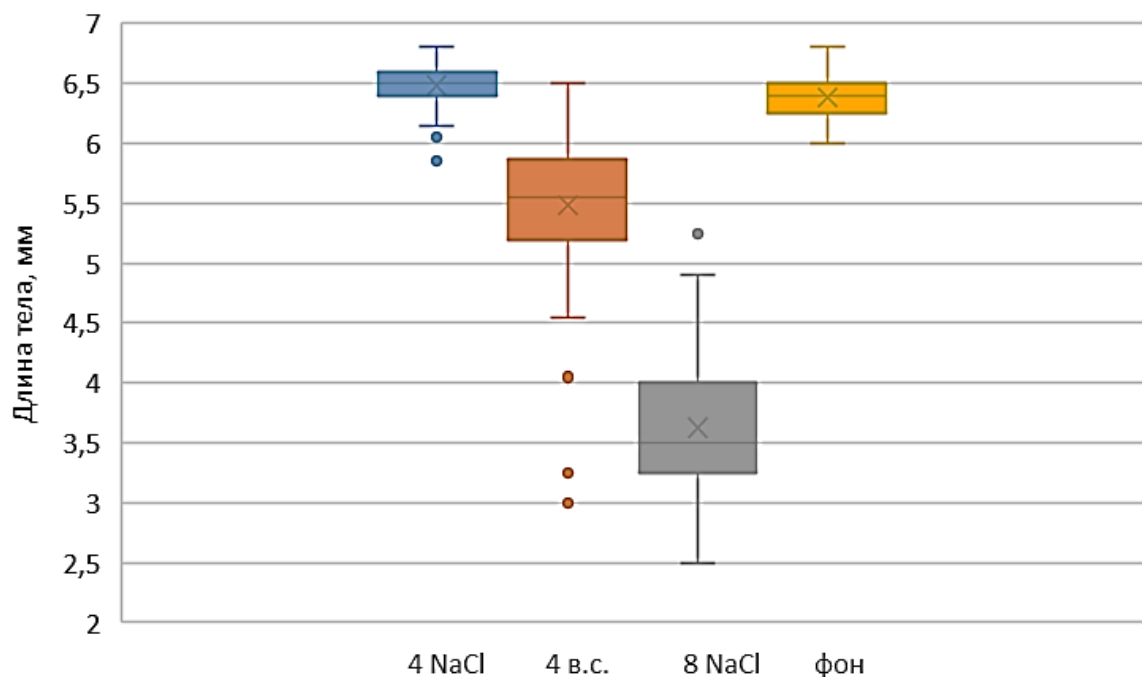


Рис. 1. Длина тела предличинок окуня, полученных из икры на 5-й стадии развития (органогенез), при воздействии NaCl (4г/л и 8г/л), вещества солеотвалов (в.с. 4г/л) и в фоновых условиях.

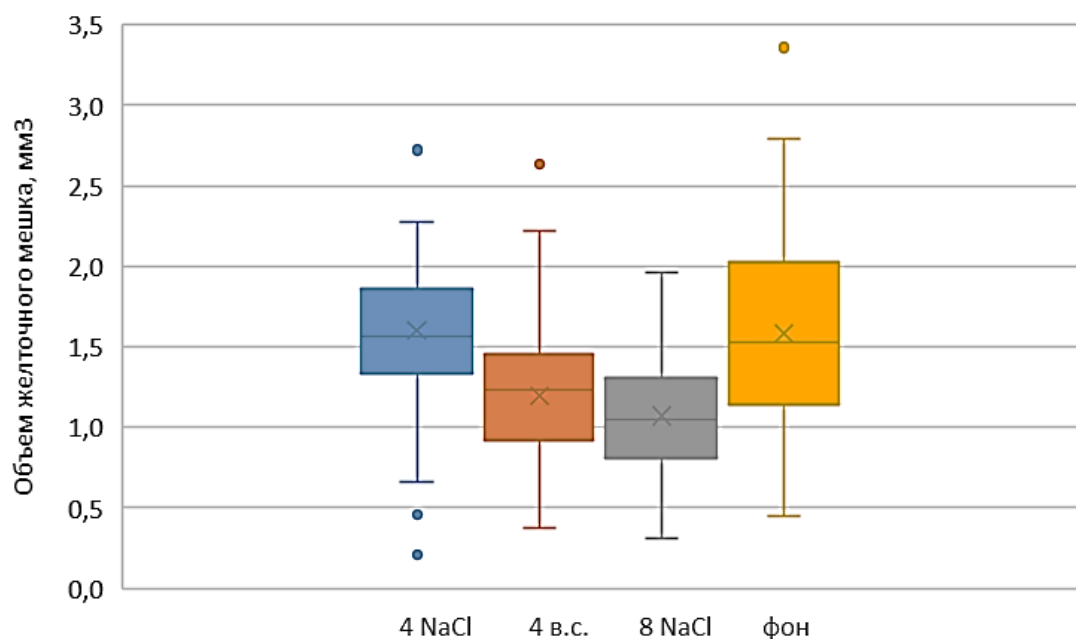


Рис. 2. Объем желточного мешка предличинки окуня, полученных из икры на 5-й стадии развития (органогенез), при воздействии NaCl (4г/л и 8г/л), вещества солеотвалов (в.с. 4г/л) и в фоновых условиях.

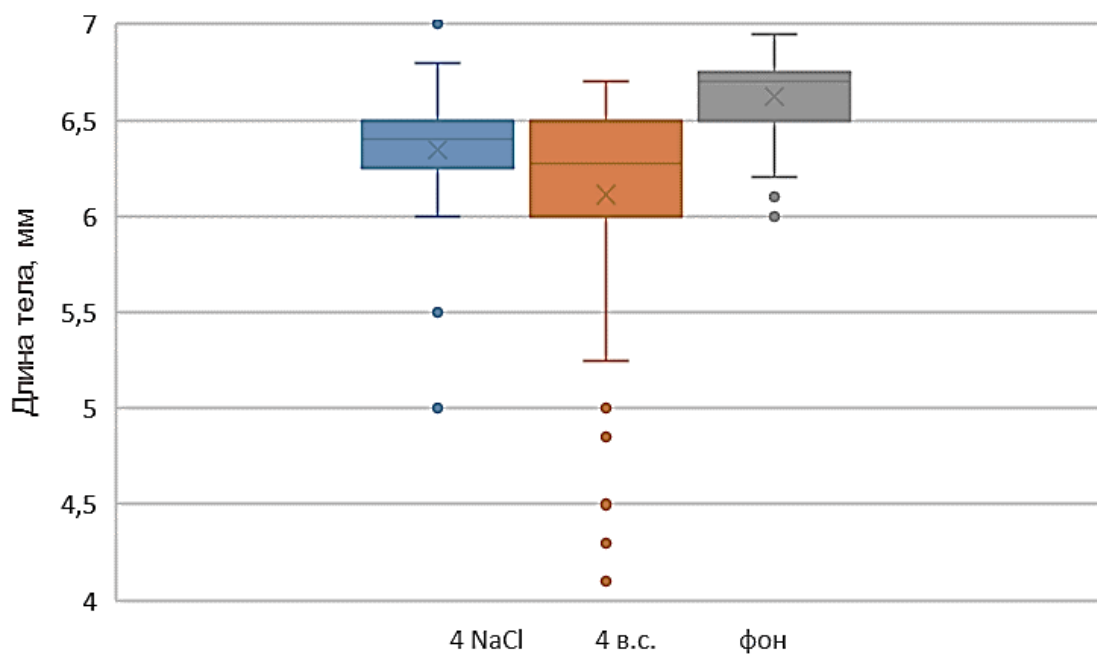


Рис. 3. Длина тела предличинки окуня, полученных из икры на 8-й стадии развития (предличинки перед выклевом из икры), при воздействии NaCl (4г/л), вещества солеотвалов (в.с. 4г/л) и в фоновых условиях.

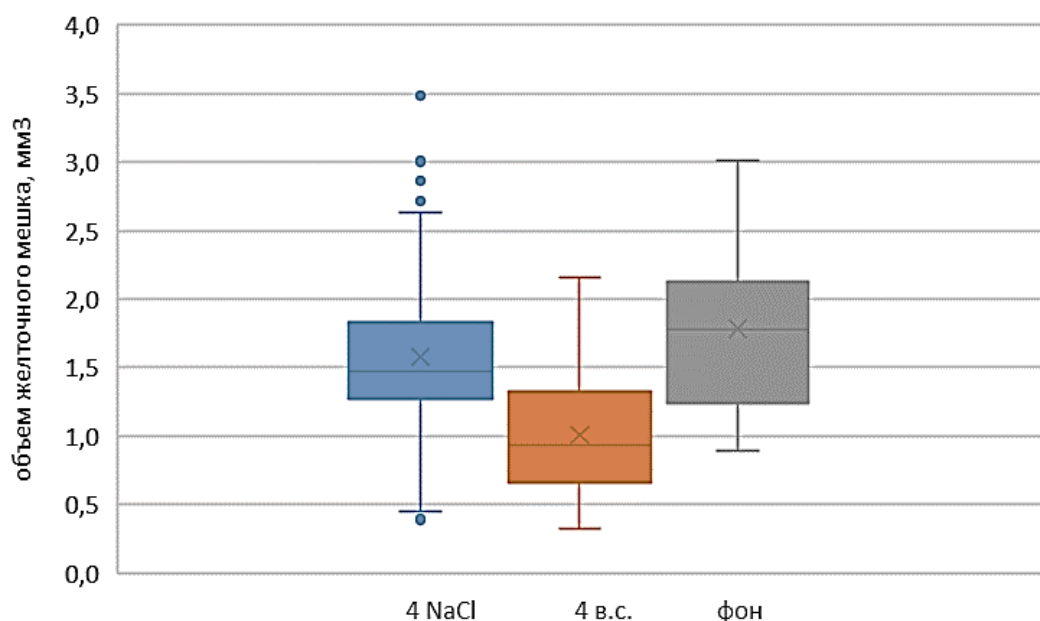


Рис. 4. Объем желточного мешка предличинки окуня, полученных из икры на 8-й стадии развития (предличинки перед выклевом из икры), при воздействии NaCl (4г/л), вещества солеотвалов (в.с. 4 г/л) и в фоновых условиях.

Среди предличинки, развившихся из икры, находящейся на 8 стадии развития, и помещенной в условия минерализации равной 4 г/л, число особей с аномалиями развития было выше. При этом большая часть аномалий имела тяжелую форму, в частности отек сердца. Меньшая чувствительность к засолению эмбрионов окуня, подверженных экспериментальным условиям на стадии органогенеза, подтверждается тем, что при концентрации 4 г/л, в растворе хлорида натрия морфологические аномалии у развившихся предличинки отсутствовали, а при воздействии вещества солеотвалов большая часть аномалий была представлена легкой формой, в частности искривлением позвоночника (табл. 1, 2).

Таблица 1 – Доля особей с различными аномалиями развития среди предличинки окуня, полученных из икры на 5-й стадии развития (органогенез), после воздействия двух типов соли с концентрацией 4 и 8 г/л

Тип аномалии	Хлорид натрия (4 г/л)	Вещество солеотвалов (4 г/л)	Хлорид натрия (8 г/л)	фон
Искривление позвоночника	—	24,2%	—	—
Отек желт. мешка	—	—	11,0%	—
Отёк сердца	—	11,3%	6,8%	—
Отёк сердца и искривление позвоночника	—	4,8%	—	—
Отёк сердца и ж. мешка	—	—	1,4%	—
Всего	—	40,3%	19,2%	—

Таблица 2 – Доля особей с различными аномалиями развития среди предличинок окуня, полученных из икры на 8-й стадии развития (предличинки перед выклевом из икры), после воздействия двух типов соли с концентрацией 4 и 8 г/л

Тип аномалии	Хлорид натрия (4 г/л)	Вещество солеотвалов (4 г/л)	фон
Искривление позвоночника	1,5%	8,9%	—
Отёк сердца	22,7%	28,6%	—
Отёк сердца и искривление позвоночника	1,5%	5,4%	—
Всего	25,8%	42,9%	—

Обсуждение

Результаты проведённого исследования подтверждают нашу первую гипотезу о большей токсичности отходов соледобычи. Основу отходов соледобычи составляют комплекс основных ионов, а именно Na, Ca, Mg, Cl, SO₄ и HCO₃, которые, как правило, считаются малотоксичными [Kunz et al., 2013]. Однако повышенное содержание таких микроэлементов и металлоидов, как Al, As, Cu, Cd, Ni и Zn, может являться дополнительным фактором повышения смертности, как ввиду прямого токсического эффекта, так и ввиду сложных взаимодействий между основными ионами и микроэлементами.

Икра на более поздней стадии развития характеризуется повышенной чувствительностью к засолению, что противоречило нашим ожиданиям. Объяснением может являться онтогенетическая динамика проницаемости хориона. На ранних стадиях развития, в частности стадии органогенеза, хорион обеспечивает большую степень защиты эмбриона. Однако перед выклевом происходит синтез определённых ферментов, которые приводят к рассасыванию зародышевых оболочек и повышают проницаемость оболочки икры для растворённых в воде соединений [Yamagami, 1988]. Сниженная проницаемость оболочек икры на ранней стадии развития могла выступать в качестве фактора, приведшего к снижению токсического воздействия и, одновременно, предварительной акклимации к нему эмбрионов и активации механизмов биохимической детоксикации, что позволило снизить токсический эффект засоления [Есин, 2015].

В дальнейшем планируется продолжение экспериментальной работы по влиянию множественных стрессоров на выживание и ход развития ранних стадий жизни рыб.

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. Есин Е.В. Обзор токсичности основных элементов-загрязнителей лососевых нерестовых рек Камчатки // Известия ТИНРО. 2015. №180(1) сс. 210-225.
2. Van Dam R.A., Harford A.J., Lunn S.A., Gagnon M.M. Identifying the cause of toxicity of a saline mine water // PLoS ONE. 2014. №9. e106857.

3. Kunz J.L., Conley J.M., Buchwalter D.B., Norberg-King T.J., Kemble N.E., et al. Use of re-constituted waters to evaluate effects of elevated major ions associated with mountaintop coal mining on freshwater invertebrates // *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2013. №32. P. 2826–2835.
4. Michibata H.Y., Nojima and M.K. Kojima Stage sensitivity of eggs of the teleost *Oryzias latipes* to cadmium exposure // *Environ. Res.* 1987. №42. pp. 321-327.
5. Yamagami K. Mechanisms of hatching in fish // *Fish Physiol.* 1988. №11 pp. 447–499.

МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ТКАНЕЙ СТЕРЛЯДИ *ACIPENSER RUTHENUS* ПРИРОДНОГО И ИСКУССТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Якубова К.С.¹, Михеев П.Б.^{1,2}, Вяткина Ю.С.¹, Комарова Л.В.³, Мерзляков И.Н.³,
Казаринов С.Н.³, Бакланов М.А.¹, Пузик А.Ю.¹

¹ Пермский государственный национальный исследовательский университет, Пермь, Россия

² Хабаровский филиал ВНИРО, Хабаровск, Россия

³ Пермский филиал ВНИРО, Пермь, Россия

Аннотация. Представлены результаты пилотного проекта по анализу содержания микроэлементов в различных тканях стерляди из естественных условий обитания (Камское водохранилище) и рыбоводных хозяйств Пермского края. Выявлены достоверно большие концентрации содержания Cu, Zn, As, Sr, Hg и Pb в костной ткани стерляди, выращиваемой на рыбоводных хозяйствах. По содержанию микроэлементов в печени и мышцах достоверных отличий выявлено не было. Рекомендуется не использовать костные ткани для приготовления блюд из стерляди рыбоводного происхождения.

Ключевые слова: микроэлементы, тяжелые металлы, рыбоводные хозяйства, стерлядь

TRACE ELEMENTS COMPOSITION OF TISSUES OF STERLET *ACIPENSER RUTHENUS* OF NATURAL AND HATCHERY ORIGIN

Mikheev P.B.^{1,2}, Kochkina E.Yu.¹, Komarova L.V.³, Merzlyakov I.N.³, Kazarinov S.N.³,
Baklanov M.A.¹, Puzik A.Yu.¹

¹ Perm State National Research University, Perm, Russia

² Khabarovsk Branch of VNIRO, Khabarovsk, Russia

³ Perm Branch of VNIRO, Perm, Russia

Abstract. The results of a pilot project of trace elements analysis of sterlet tissues from natural habitat conditions (Kama reservoir) and hatcheries of the Perm Krai are presented. Significantly high concentrations of Cu, Zn, As, Sr, Hg and Pb were found in the bone tissue of sterlet originated from hatcheries. There were no significant differences in the content of trace elements in the liver and muscles. It is recommended not to use bone tissue for cooking dishes from sterlet of fish-breeding origin.

Keywords: trace elements, heavy metals, hatcheries, sterlet

Введение

Проблема дифференциации рыб естественного и заводского происхождения связана с развитием товарной аквакультуры. Дикие объекты промысла продолжают истощаться во

всем мире, и они не способны прокормить растущее население Земли [Корнейко, Покорме-
нюк, 2017]. В развитых странах происходит замещение потребления выловленной рыбы про-
дукцией, выращенной искусственно [Бычков, 2008]. Например, жители Китая употребляют в
пищу 90% продукции рыбоводства, выращенной на специальных хозяйствах [Петушкова,
2022].

Осетровые также являются важными объектами пастбищной и товарной аквакульту-
ры. Сейчас искусственное разведение – это единственный способ, позволяющий увеличивать
количество осетровых рыб и поддерживать процесс их воспроизводства в естественных во-
доемах [Лобкова, Лобкова, 2017; Ходоревская и др., 2018].

Цель данной работы заключается в выявлении различий в микроэлементном составе
тканей рыб естественного и заводского происхождения с анализом возможных причин полу-
ченных результатов. Ранее исследований по данной теме не проводилось в России, наш про-
ект является пилотным, а полученные результаты в дальнейшем будут использоваться для
более детализированного анализа.

Теоретическая важность данной работы заключается в восполнении пробела в знани-
ях по микроэлементному составу различных тканей рыб, что в дальнейшем может использо-
ваться в качестве основы для идентификации рыб дикого и заводского происхождения, их-
тиотоксикологического мониторинга, а также при оценке степени опасности употребления
рыбы для человека. Результаты нашего исследования могут быть использованы в качестве
основы для планирования и реализации следующих проектов по этой тематике.

Материалы и методы

Материал для анализа микроэлементного состава стерляди был отобран в Камском
водохранилище и трех рыбоводных хозяйства Пермского края в 2022 г. (табл. 1). Образцы
были заморожены и доставлены в лабораторию. Для анализа микроэлементного состава от-
бирались пробы мышц, печени и костных лучей грудного плавника после разморозки мате-
риала. Также проводился микроэлементный анализ корма, используемого на рыбоводных
хозяйствах производства Sorpens и Limkorm, а также содержимое желудка четырех особей
стерляди, отловленной в Камском водохранилище.

Отбор образцов производили чистым ножом и скальпелем. Сначала проводилась экс-
тракция маргинального луча грудного плавника. Вскрытие стерляди осуществлялось чистым
скальпелем с вентральной стороны тела. Для взятия пробы мышечной ткани чистым скаль-
пелем, отделяли кожу от мышц, делали разрез по трансверсальной септе и отделяли мышеч-
ную ткань, расположенную выше трансверсальной септы, от позвоночного столба.

Пробы мышц и печени пинцетом помещали в эппендорф. У стерляди, отловленной в
естественных условиях, чистым скальпелем проводили забор образцов содержимого желуд-
ка. Пробы просушивали в течение 14 дней.

Вторым этапом подготовки проб к микроэлементному анализу являлась кислотная
минерализация. Из общего объема образца пробы отбиралась навеска массой 0,1 г, к навеске
добавляли 3 мл азотной кислоты (HNO_3). Контейнер помещали в микроволновую химиче-
скую станцию «EXCEL» (рис. 10). После проведения минерализации контейнер охлаждался
до комнатной температуры (Согласно ГОСТу 26929-94).

Таблица 1 – Данные по материалу стерляди, использованному в работе

Место сбора	Дата сбора	Кол-во образцов	Мышцы	Печень	Костная ткань	Содержимое желудка
Добрянский рыбо-водный центр	ноябрь, 2022	8	1	1	8	–
Яйвинское рыбное хозяйство	декабрь, 2022	3	1	1	3	–
ООО "ТОПОЛЬ" д. Горшки	ноябрь, 2022	12	1	1	1	–
Камское водохрани-лище р. Орел	октябрь, 2022	13	5	5	13	4

Микрохимический анализ проводили в Центре совместного использования исследовательского оборудования геологического факультета Пермского государственного национального исследовательского университета методом лазерной абляции масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (LA ICP-MS) с использованием квадрупольного ICP-MS Bruker Aurora M90.

Уровень значимости различий определяли с использованием критерия Манна – Уитни. Для визуализации использовали диаграммы размаха. Статистическая обработка проводилась в программе Rstudio для Windows. Использован уровень значимости 0,05.

Результаты исследования

Результаты анализа на содержание микроэлементов в тканях стерляди представлены в мг/кг сухой массы и показаны в таблице 2. Полученные результаты микроэлементного анализа показали более высокую концентрацию микроэлементов в костной ткани стерляди, собранной на рыбоводных хозяйствах. Выявлены достоверные различия концентрации Cu, Zn, As, Sr, Hg и Pb в костной ткани стерляди. По прочим тканям и Ba в составе костного луча стерляди из Камского водохранилища и рыбоводных хозяйств достоверных различий обнаружено не было.

Сопоставив средние значения микроэлементов, мы видим, что в тканях мышц среднее значение концентрации всех элементов выше у образцов, выловленных в Камском водохранилище, в костных тканях наоборот – собранных на рыбоводных хозяйствах. В тканях печени средние показатели Cu, Zn, Hg и Pb выше у диких особей, As, Sr и Ba – с рыбоводных хозяйств. Результаты сравнения микроэлементного состава корма, используемого на рыбоводных хозяйствах, и содержимого желудка стерляди, отловленной в естественных условиях обитания, показали отсутствие достоверных различий.

Для визуализации различий концентрации микроэлементов костной ткани стерляди, собранной на рыбоводных хозяйствах и отловленной в естественных условиях была использована диаграмма размаха (box-plot) (рис.).

Таблица 2 – Концентрация тяжелых металлов в различных тканях и объектах питания стерляди из Камского водохранилища и рыбоводных хозяйств Пермского края

Места сбора материала	Анализируемый образец (количество проб)	Cu	Zn	As	Sr	Ba	Hg	Pb
Камское водохранилище	мышцы (5)	<u>11,2±19,6</u> 1,6-46,3	<u>41,7±33,6</u> 21,2-99,8	<u>9,4±3,5</u> 6,5-13,8	<u>25,5±36,4</u> 1,3-83,3	<u>32,6±65,3</u> 2,1-149,4	<u>0,3±0,1</u> 0,2-0,4	<u>1,3±2,2</u> 0,1-5,1
	печень (5)	<u>44,8±29,1</u> 4,1-75,8	<u>112,5±42,1</u> 40,3-145,1	<u>8,9±6,7</u> 1,8-17,3	<u>3,4±0,5</u> 2,7-3,9	<u>4,4±1,1</u> 2,8-5,8	<u>0,6±0,3</u> 0,1-1,0	<u>0,6±0,4</u> 0,3-1,1
	костная ткань (13)	<u>1,8±2,2</u> 0,7-8,9	<u>75,9±16,9</u> 52,6-100,4	<u>7,0±9,7</u> 1,4-37,5	<u>152,0±90,3</u> 7,5-258,1	<u>14,0±6,3</u> 6,6-30,4	<u>0,2±0,4</u> 0,0-1,5	<u>0,3±0,2</u> 0,1-1,0
	содержимое желудка (4)	<u>40,7±7,8</u> 33,6-51,1	<u>92,8±15,1</u> 73,6-105,6	<u>19,5±33,1</u> 1,0-69,1	<u>32,5±27,8</u> 1,0-68,5	<u>61,3±53,9</u> 2,2-133,1	<u>0,6±0,4</u> 0,3-1,2	<u>2,0±1,4</u> 0,1-3,5
Рыбоводные хозяйства	мышцы (3)	<u>4,2±0,3</u> 3,9-4,5	<u>41,1±6,8</u> 36,0-48,8	<u>8,7±1,8</u> 7,5-10,8	<u>4,4±2,8</u> 1,8-7,3	<u>3,9±4,1</u> 0,8-8,6	<u>0,2±0,1</u> 0,2-0,3	<u>0,4±0,4</u> 0,1-0,9
	печень (3)	<u>30,7±32,6</u> 1,9-66,1	<u>73,9±53,1</u> 29,1-132,6	<u>13,8±6,5</u> 6,3-17,8	<u>17,5±24,4</u> 3,1-45,7	<u>5,8±3,2</u> 3,2-9,3	<u>0,3±0,2</u> 0,1-0,4	<u>0,5±0,5</u> 0,3-1,1
	костная ткань (12)	<u>15,3±16,3</u> 1,6-55,7	<u>162,0±152,7</u> 101,1-645,6	<u>42,3±27,9</u> 10,0-110,8	<u>279,7±154,7</u> 79,3-492,9	<u>26,0±17,7</u> 4,1-53,6	<u>0,4±0,3</u> 0,1-0,9	<u>4,8±6,2</u> 0,2-20,4
	корм (2)	<u>56,0±59,2</u> 14,1-97,8	<u>104,1±19,5</u> 90,3-117,9	<u>8,5±5,2</u> 4,8-12,2	<u>12,3±9,7</u> 5,5-19,2	<u>9,2±7,5</u> 3,9-14,6	<u>0,1±0,0</u> 0,1-0,1	<u>0,7±0,7</u> 0,2-1,2
Костная ткань. Уровень значимости различий по критерию Вилкоксона (Манна-Уитни)		0.0001946	0,00002493	0,00008031	0.02399	0.3412	0.003614	0.003033
Печень. Уровень значимости различий по критерию Вилкоксона (Манна-Уитни)		0.551	0.3711	0.3711	0.551	0.551	0.136	0.551
Мышцы. Уровень значимости различий по критерию Вилкоксона (Манна-Уитни)		0.233	0.551	0.7656	0.7656	0.551	1	0.3711
Питание. Уровень значимости различий по критерию Вилкоксона (Манна-Уитни)		1	0.4875	0.817	0.4875	0.4875	0.1052	0.4875

Примечание: в числителе приводится среднее значение ± ошибка среднего, в знаменателе – пределы варьирования признака; жирным шрифтом выделены достоверные различия

Обсуждение результатов

Полученные результаты показали более высокую концентрацию микроэлементов в костной ткани стерляди, собранной на рыбоводных хозяйствах. Анализ данных свидетельствует, что уровень накопления металлов в разных органах в той или иной степени различается. Изложенные результаты исследований говорят о сложном характере аккумуляции металлов в организме стерляди, что, в частности, проявляется в различиях уровнях содержания как одного и того же металла в разных тканях, так и разных металлов в одной и той же ткани.

В общих чертах характер аккумуляции металлов в организме стерляди схож с таковым у других представителей семейства осетровых, что подтверждают данные Соболева [2005] и Попова [2021].

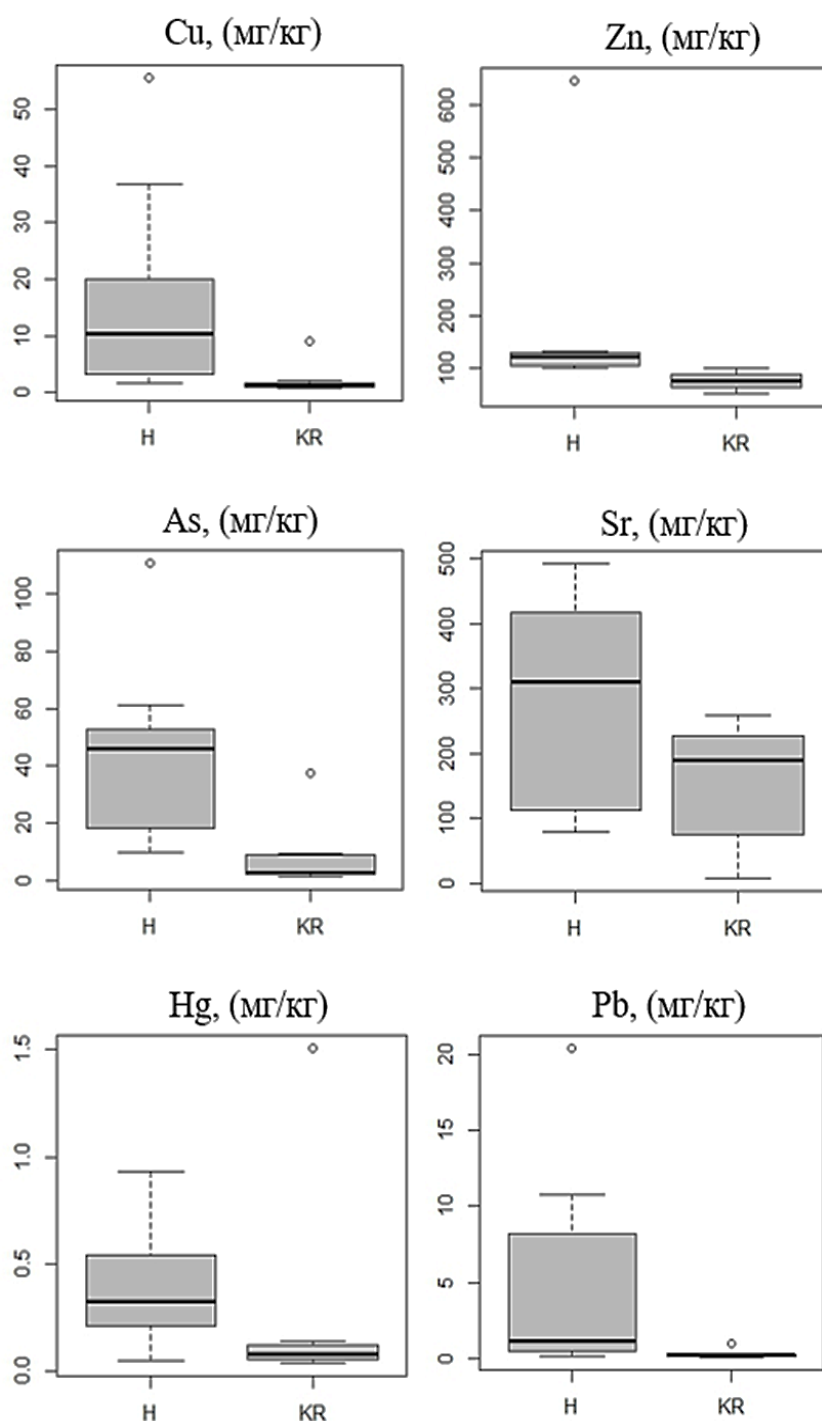


Рис. Диаграмма размаха концентрации микроэлементов костной ткани стерляди, собранной на рыбоводных хозяйствах (H) и отловленной в естественных условиях (KR) (мг/кг).

Выявленные повышенные концентрации микроэлементов в костной ткани в общих чертах совпадает с интенсивностью метаболизма в проанализированных тканях. Металлы могут депонироваться в костных тканях, при этом содержание этих элементов будет выше, чем в печени и мышцах [Попов, 2002; Гилева и др., 2014].

Результаты сравнения микроэлементного состава корма, используемого на рыбоводных хозяйствах, и содержимого желудка стерляди, отловленной в естественных условиях обитания, показали отсутствие достоверных различий. В качестве альтернативной теории, объясняющей выявленную разницу в микроэлементном составе костной ткани стерляди, может выступать разница в условиях развития. По данным А. Барабаша [2005] и Н. Сергеевой

[2010] при повышении отдельных микроэлементов в составе корма, концентрацию в тканях удастся повысить не во всех случаях. Известно, что интенсивность метаболизма и рост пойкилотермных животных, каковыми являются рыбы, во многом зависит от температуры окружающей среды. По данным Т. И. Моисеенко [2016], температурные условия и геохимические факторы влияют на степень проникновения микроэлементов в организм рыб. При повышении температуры проникающая способность в организм усиливается из-за повышения метаболизма. Вследствие этого происходит более интенсивная аккумуляция элементов. Подращивание молоди стерляди происходит при температурах 22-23°C, что существенно превосходит температурные значения в естественных условиях. В частности, в Камском водохранилище температура в период летнего нагула рыб, в который отмечается наибольшая скорость их роста, не превышает 18°C в пределах придонного слоя русловых участков пригодных для обитания стерляди [Матарзин, 1977]. Соответственно, полученные различия в содержании микроэлементов в костной ткани стерляди могут быть объяснены разницей в температурных условиях, в которых рыбы обитали.

Значительный интерес представляет вопрос о безопасности потребления рыб в пищу, для чего наши результаты по анализу микроэлементного состава мышц и костных лучей грудного плавника стерляди были сопоставлены с литературными данными. Для оценки опасности употребления рыбы человеком обратимся к СанПиНу 2.3.2.560-960 и к данным, опубликованным Продовольственной и сельскохозяйственной организацией ООН (англ. Food and Agriculture Organization, FAO). Содержание металлов в мышцах стерляди Камского водохранилища по Hg не превышает ПДК, по содержанию Cu, Zn, Pb имеется незначительное превышение принятых в России и других странах допустимых концентраций. Концентрация As превышена почти в 2 раза по сравнению с ПДК, принятыми в России и других странах.

В мышцах стерляди, собранной на рыбоводных заводах, содержание Cu, Hg, Pb не превышает ПДК, Zn, As – незначительно завышено (табл. 3). Более высокое значение мышьяка в мышцах стерляди, отловленной в Камском водохранилище, может объясняться местом расположения точки сбора материала. Рыбы были отловлены близ пос. Орел, расположенного в непосредственной близости от Березниковско-Соликамского промузла, осуществляющих сброс точных вод в Камское водохранилище выше по течению относительно мест сбора материала по стерляди, использованного в работе.

По сравнению с мышечной тканью, содержание микроэлементов в костной ткани особей рыбоводного происхождения значительно превышает ПДК по всем элементам, за исключением ртути и отчасти свинца. Для костной ткани рыб Камского происхождения отмечено превышение только по цинку и мышьяку. Следовательно, рыба, отловленная в Камском водохранилище, менее опасна для употребления в пищу, по сравнению с особями, выращиваемыми на рыбоводных хозяйствах. Поэтому использование костной ткани для приготовления блюд из стерляди рыбоводного происхождения не рекомендуется ввиду высокой концентрации тяжелых металлов.

Таблица 3 – Содержание металлов в мышцах стерляди, отловленной в Камском водохранилище (А) и на рыбоводных хозяйствах (Б)

Элементы, мг/кг	А	Б	ПДК для рыбы по СанПиН 2.3.2.560-960	ПДК для рыбы по FAO (Nauen, 1983)
Cu	11,2	4,2	10,0	10-70 (Австралия) 30 (Новая Зеландия)
Zn	41,7	41,1	40,0	50 (Великобритания) 40 (Новая Зеландия) 40-1000 (Австралия)
As	9,4	8,7	5,0	6,0 (Гонг-Конг), 5,0 (Финляндия), 4,0 (Польша)
Hg	0,3	0,2	0,5	1,0 (США) 0,5 (Швейцария) 0,5 (Швеция) 0,4 (Япония)
Pb	1,3	0,4	1,0	6,0 (Гонг-Конг) 1,0 (Швейцария) 2,0 (Дания)

Заключение

Полученные результаты показали более высокую концентрацию микроэлементов в костной ткани стерляди, собранной на рыбоводных хозяйствах. В качестве теории, объясняющей выявленную разницу в микроэлементном составе костной ткани стерляди, может выступать разница в температурных условиях обитания рыб. Содержание проанализированных металлов в мышцах стерляди Камского водохранилища ниже либо незначительно превышает ПДК, принятые в России и других странах. По сравнению с мышечной тканью, содержание микроэлементов в костной ткани стерляди рыбоводного происхождения значительно превышает ПДК по всем элементам, за исключением ртути и отчасти свинца. Рекомендуются не использовать костные ткани для приготовления блюд из стерляди рыбоводного происхождения ввиду высокой концентрации в них тяжелых металлов.

Библиографический список

1. Корнейко О.В., Покорменюк М.Д. Аквакультура в России: состояние и проблемы развития // Азимут научных исследований: экономика и управление. 2017. Т. 6, № 4(21). С. 202–204.
2. Бычков А.В. Развитие аквакультуры в России: исторический опыт и перспективы // Власть и управление на Востоке России. 2008. №4. С 180–185.
3. Петушкова В.В. Аквакультуры – "второй хлеб" Китая // Экономические и социальные проблемы России. 2022. № 2(50). С. 159–174.
4. ГОСТ 26929-94. «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов». М.: Стандартиформ, 2010.

5. Барабаш А.А., Мирошникова Е.П., Родионова Г.Б., Жарков А.Н., and Тетдоев В.В. Микроэлементный состав рыбы, выращенной в различных условиях // Вестник Оренбургского государственного университета. 2005. № 2. С. 14–15.
6. Гилева Т.А., Зиновьев Е.А., Костицына Н.В. Содержание тяжелых металлов в органах и тканях рыб, обитающих в разнотипных водоемах Пермского края // Аграрный вестник Урала. 2014. № 8(126). С. 73–77.
7. Лобкова А.А., Лобкова Г. В. К вопросу об искусственном разведении осетровых // Научные труды национального парка "Хвалынский": Сборник научных статей по материалам IV Международной научно-практической конференции. Хвалынский, 13–14 октября 2017 г. Выпуск 9. С. 220–222.
8. Матарзин Ю.М., Богословский Б.Б., Мацкевич И.К. Гидрологические процессы в водохранилищах. Пермь, 1977. 88 с.
9. Попов П.А., Андросова Н.В., Аношин Г.Н. Накопление и распределение тяжелых и переходных металлов в рыбах Новосибирского водохранилища // Вопр. ихтиол. 2002. Т. 42, № 2. С. 264–270.
10. Сергеева Н.Т. Влияние содержания марганца в комбикормах на концентрацию его в органах и тканях радужной форели / Н.Т. Сергеева, Е.В. Нижникова // Инновации в науке и образовании – 2010: Труды VIII Международной научной конференции, посвященной 80-летию образования университета. В 3-х частях, Калининград, 19–21 октября 2010 года. Том Часть 1. – Калининград: Калининградский государственный технический университет, 2010. – С. 326–328.
11. Соболев К.Д. Особенности накопления тяжелых металлов в органах и тканях рыб различных экологических групп // Современные проблемы водной токсикологии. Борок: ИБВВ РАН, 2005. С. 128–129.
12. Ходоревская Р.П., Некрасова С.О., Савинов А.В. Осетровые Волго-Каспийского бассейна – природное наследие прикаспийских государств // Экологические проблемы бассейнов крупных рек – 6: Материалы международной конференции, приуроченной к 35-летию Института экологии Волжского бассейна РАН и 65-летию Куйбышевской биостанции. Тольятти, 15–19 октября 2018 года. С. 318–320.

СОДЕРЖАНИЕ

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Аверина М.В., Ахова А.В., Ткаченко А.Г.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ПРИРОДНЫХ ИЗОЛЯТОВ *ESCHERICHIA COLI*
ПРОДУЦИРОВАТЬ ПУТРЕСЦИН.....5

Башкиров С.Д., Корсакова Е.С.

ШТАММ-ДЕСТРУКТОР ДИОКИЛТЕРЕФТАЛАТА *RHODOCOCCLUS* SP. AT5-2. 9

Белка М.В., Дёмин К.А., Горовцов А.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОРАЗНООБРАЗИЯ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ
АНТРОПОГЕННО ПРЕОБРАЗОВАННЫХ ПОЧВ.....14

Вожакова С.А., Нестерова Л.Ю., Елькин А.А., Кузнецова М.В.

ИЗУЧЕНИЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* ЛЭГМ-18 И ЖР 18

Габова А.О., Тюленев А.В., Смирнова Г.В.

ПРОДУКЦИЯ СУЛЬФИДА ВОДОРОДА ПРИ РАННЕМ ОТВЕТЕ БАКТЕРИЙ
ESCHERICHIA COLI НА ГИПЕРОСМОТИЧЕСКИЙ ШОК 24

Громова О.А., Максимов А.Ю., Елисеева А.Д.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ ШТАММА
PSEUDOMONAS FLUORESCENS N59 – ПРОДУЦЕНТА НИТРИЛАЗЫ 28

Егорова В.В., Ушаков В.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ПРОДУКЦИЮ
СЕРОВОДОРОДА У БАКТЕРИЙ *BACILLUS SUBTILIS* ПРИ ДЕЙСТВИИ
АНТИБИОТИКОВ 33

Елисеева А.Д., Протасова Е.М., Громова О.А.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРНЫХ
ГИДРОГЕЛЕЙ И КЛЕТОК БАКТЕРИЙ *PSEUDOMONAS PELI* – ПРОДУЦЕНТОВ
ГИДРОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА РОСТ МОДЕЛЬНЫХ РАСТЕНИЙ КРЕСС-
САЛАТА *LEPIDIUM SATIVUM*.....38

Ермолаева В.М., Цыганова М.И., Мелентьев Д.А., Лапин В.А., Новиков Д.В.

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *PICHA PASTORIS*, НЕСУЩЕГО ГЕНЕТИЧЕСКУЮ
КОНСТРУКЦИЮ, КОДИРУЮЩУЮ ХИМЕРНЫЙ БЕЛОК НОРОВИРУСА И
ECHOVIRUS 30.....42

Загайнов Е.А., Горовцов А.В., Козьменко С.В.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИНОКУЛЯЦИИ ШТАММОВ ПАУ-ДЕГРАДИРУЮЩИХ И
МЕТАЛЛОУСТОЙЧИВЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ПОЛУЧЕНИИ БИОСОРБЕНТА НА
ОСНОВЕ БИОУГЛЯ.....46

Соболева О.М., Калашникова К.В.

НАНОМАТЕРИАЛЫ В БОРЬБЕ С БАКТЕРИАЛЬНЫМИ БИОПЛЕНКАМИ В
ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА 51

Калашникова Т.В., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ ЖЕЛЕЗА И ЦИСТИНА НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
ESCHERICHIA COLI К ЦИПРОФЛОКСАЦИНУ 55

Краева А.В., Корсакова Е.С., Плотникова Е.Г.

КУЛЬТИВИРУЕМЫЕ БАКТЕРИИ ИЗ РИЗОСФЕРЫ РАСТЕНИЙ БЕСКИЛЬНИЦЫ
РАССТАВЛЕННОЙ (*PUCCINELLIA DISTANS* (JACQ.) PARL.),
ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ЗАСОЛЕННОЙ ПОЧВЕ 61

Макарова М.В., Куюкина М.С., Криворучко А.В.

ВНУТРИКЛЕТОЧНОЕ ВОССТАНОВЛЕНИЕ ИОНОВ НИКЕЛЯ И ВАНАДИЯ
АКТИНОБАКТЕРИЯМИ РОДА *RHODOCOCCLUS* 67

Минаева А.В., Вальцифер В.А., Нестерова Л.Ю., Кузнецова М.В.

СПОСОБ ОЦЕНКИ ПРОЛОНГИРОВАННОГО АНТИМИКРОБНОГО ДЕЙСТВИЯ
ДЕЗИНФЕКТАНТОВ 72

Михайленко Д.О., Горовцов А.В.

ВЛИЯНИЕ СМЕШАННЫХ СТАРТОВЫХ КУЛЬТУР ДРОЖЖЕЙ НА
СОДЕРЖАНИЕ ВИННОЙ КИСЛОТЫ В БЕЛЫХ ВИНАХ ДОЛИНЫ ДОНА 77

Мотько П.В., Горовцов А.В.

ОЦЕНКА ЧИСЛЕННОСТИ АЭРОБНЫХ СПОРООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В
ПОЧВАХ ООПТ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ 80

Мясникова М.А., Куюкина М.С.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОТРАБОТАННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО МАСЛА В КАЧЕСТВЕ
АЛЬТЕРНАТИВНОГО УГЛЕРОДНОГО СУБСТРАТА ДЛЯ РОСТА
АКТИНОБАКТЕРИЙ РОДА *RHODOCOCCLUS* 86

Плетнева С.К., Самойлова З.Ю., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.

ИССЛЕДОВАНИЕ МОДУЛЯЦИИ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ БАКТЕРИЙ
ESCHERICHIA COLI В ПРИСУТСТВИИ ЭКСТРАКТОВ КОРО-ДРЕВЕСНЫХ
ОТВАЛОВ 92

Протасова Е.М., Максимова Ю.Г.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТОК НА ТЕРМОРАСШИРЕННОМ
ГРАФИТЕ 97

Рахмонов М.Х.

МИКРОБИОЛОГИЯ КАРИЕСА ЗУБОВ И ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА 103

Рахмонов М.Х.

РАЗВИТИЕ ИММУНОЛОГИИ ПОЛОСТИ РТА ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ ЗДОРОВЬЯ
ПОЛОСТИ РТА: НА ПРИМЕРЕ ЗАБОЛЕВАНИЙ ПАРОДОНТА И ЭНДОДОНТИИ 106

Селиванова П.А., Михайловская В.С., Кочергина Д.А., Кузнецова М.В.	
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОФИЛИ СИДЕРОФОРОВ ШТАММОВ <i>ESCHERICHIA COLI</i> , ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ И ОРГАНИЧЕСКОГО УДОБРЕНИЯ.....	110
Семёнова К.Г., Максимова Ю.Г.	
РАЗРАБОТКА ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ МОБИЛИЗАЦИИ ФОСФОРА ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ	116
Сутормина Л.В., Музыка Н.Г., Смирнова Г.В., Октябрьский О.Н.	
НАРУШЕНИЕ ГОМЕОСТАЗА ЦИСТЕИНА И ИНДУКЦИЯ SOS-ОТВЕТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ЦИПРОФЛОКСАЦИНА НА <i>ESCHERICHIA COLI</i>	122
Сыровацкая Г.А., Максимова Ю.Г.	
ОПТИМИЗАЦИЯ МИНЕРАЛЬНОЙ СРЕДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ НИТРИЛГИДРОЛИЗУЮЩИХ АЛКАЛОТОЛЕРАНТНЫХ РОДОКОККОВ И ИХ ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА	126
Чайкина А.П., Горовцов А.В.	
УСТОЙЧИВОСТЬ АКТИНОМИЦЕТОВ ГОРОДСКИХ И ТЕХНОГЕННЫХ ПОЧВ К ТЯЖЕЛЫМ МЕТАЛЛАМ.....	132
Швеин А.В., Куюкина М.С.	
ОЦЕНКА РИСКА РАСПРОСТРАНЕНИЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ АКТИНОБАКТЕРИЙ- НЕФТЕДЕСТРУКТОРОВ С УЧЕТОМ ЭКОЛОГИЧЕСКОГО КРИТЕРИЯ.....	137
МЕДИЦИНА, ФИЗИОЛОГИЯ ЧЕЛОВЕКА, ИММУНОЛОГИЯ	
Волкова М.С., Матузин С.Ю., Соболева О.М.	
ДИАГНОСТИКА ХЛАМИДИЙНОЙ И МИКОПЛАЗМЕННОЙ ИНФЕКЦИЙ У НОВОРОЖДЕННЫХ	141
Гурская Д.А., Раззорова Е.А., Горшкова Е.Н.	
ВЛИЯНИЕ PH-МОДИФИКАЦИИ СЕКРЕТОРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНА А НА ЕГО АФФИННОСТЬ К БАКТЕРИАЛЬНЫМ И ВИРУСНЫМ АНТИГЕНАМ	145
Девятов С.О., Кропанева М.Д., Заморина С.А., Раев М.Б.	
ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ИММУНОФИЛЬТРАЦИОННЫХ ТЕСТ- СИСТЕМ	152
Орлова Е.Г., Логинова О.А., Горбунова О.Л., Кирьянова В.Ю., Баянгулова А.Р. Ширшев С.В.	
ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЕРА ГЛЮКОЗЫ GLUT-1 НК-КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ	157
Кравченко А.С., Соболева О.М.	
ОСОБЕННОСТИ ИЗОЛЯТОВ <i>SAMPYLOVASTER</i> С СИСТЕМОЙ СЕКРЕЦИИ VI ТИПА	163

Курасова Д.А., Кулакова Ю.С., Раззорова Е.А., Горшкова Е.Н. ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ В СОСТАВЕ КОМПЛЕКСНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО ПРЕПАРАТА, ИНДУЦИРОВАННАЯ КИСЛОЙ СРЕДОЙ.....	167
Некрасова И.В. РОЛЬ ВРОЖДЕННЫХ ЛИМФОИДНЫХ КЛЕТОК (ILC) В ПАТОГЕНЕЗЕ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА.....	171
Пономарева В.Н., Власова В.В., Сайдакова Е.В. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ	177
Сорокина А.В., Корякова А.С., Закиров Р.М., Грачев А.С., Низамова В.А. АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА <i>ADRB2</i> У ДЗЮДОИСТОВ С РАЗНОЙ СПОРТИВНОЙ КВАЛИФИКАЦИЕЙ.....	182
Усанина Д.И., Бочкова М.С., Тимганова В.П. ГРАФЕН-ИНДУЦИРОВАННАЯ ГИПЕРТЕРМИЯ КЛЕТОК ЛИНИЙ THP-1 И JURKAT	187
БОТАНИКА, ГЕНЕТИКА И ЭКОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ	
Багиров О.Р. СОРТИМЕНТ АБРИКОСА НАХИЧЕВАНСКОЙ АВТОНОМНОЙ РЕСПУБЛИКИ	193
Белоногова А.Г., Шибанова Н.Л. ВЫХОД СТЕРИЛЬНОЙ КУЛЬТУРЫ И ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ ЭКСПЛАНТОВ СЕНПОЛИИ ГИБРИДНОЙ В КУЛЬТУРЕ <i>IN VITRO</i>	199
Дробышева А.А., Останина М.В. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПОРТУЛАКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО (<i>PORTULACA GRANDIFLORA</i>), КАК ВОЗМОЖНАЯ ПРИМЕСЬ К ПОРТУЛАКУ ОГОРОДНОМУ (<i>PORTULACA OLERACEA</i> L.).....	204
Кокшарова А.Н., Данилова М.А. СЕМЕННАЯ ПРОДУКТИВНОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ <i>FRAGARIA</i> L. НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ.....	208
Кольчурина Д.Н. ИНВАЗИВНЫЕ ВИДЫ В РАСТИТЕЛЬНОМ ПОКРОВЕ В ОКЕСТНОСТЯХ ДЕРЕВНИ ОСИПОВА.....	212
Павлюченко И.И., Клименко Я.В., Куликова И.А., Рубан В.С. АЭРОПАЛИНОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ СПОР МИКРОМИЦЕТОВ В ОТДЕЛЬНО ВЗЯТОМ РЕГИОНЕ	215

Наговицына В.О., Шестиперстова А.С., Печенкина В.А.	
ЗАРАЖЕННОСТЬ ВИРУСОМ ЖЕЛТОЙ КАРЛИКОВОСТИ ЯЧМЕНЯ СОРТОВ ОЗИМОЙ РЖИ (<i>SECALE CEREALE</i> L.), ВЫРАЩИВАЕМЫХ В ПЕРМСКОМ КРАЕ И СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ.....	220
Орлова Е.М., Шумиловских Л.С.	
ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ПАЛИНОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА КУЛЬТУРНЫХ СЛОЁВ ГЛЯДЕНОВСКОГО ГОРОДИЩА	225
Пронина М.Д., Злоказов К.И., Селиванов А.Е., Печенкина К.О.	
БИОРАЗНООБРАЗИЕ СОСУДИСТЫХ РАСТЕНИЙ ООПТ «ВЕРХНЕКУРЬИНСКИЙ»	229
Сырвачева Д.Н., Данилова М.А.	
ВЫЯВЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ОЗИМЫХ СОРТОВ ТРИТИКАЛЕ	232
ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ И ЭКОЛОГИЯ ПОЧВ	
Жуланова Н.С., Бражкина Э.И., Четина О.А.	
НЕКОТОРЫЕ ОТВЕТНЫЕ РЕАКЦИИ <i>AVENA SATIVA</i> L. ПРИ РАЗДЕЛЬНОМ И КОМБИНИРОВАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НАСЛ-ЗАСОЛЕНИЯ И PH-УРОВНЯ ПОЧВЫ	237
Заякина А.Э., Коробейников И.А., Лыкасова Ю.П., Москвина Н.В.	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ПОДВИЖНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ФОСФОРА В СОВРЕМЕННЫХ И ПОГРЕБЕННЫХ ПОЧВАХ Г. ПЕРМИ ПО МЕТОДАМ ЧИРИКОВА И МАЧИГИНА	242
Коровина Е.А., Мальцева А.Д.	
РАЗНООБРАЗИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА ПОЧВ РАЙОНОВ МНОГОЭТАЖНОЙ ЗАСТРОЙКИ Г. ЧАЙКОВСКИЙ	246
Крохина В.А.	
СОДЕРЖАНИЕ ОБЩЕГО АЗОТА В ФИТОМАССЕ ДЕНДРОФЛОРЫ В УСЛОВИЯХ АЭРОЗАГРЯЗНЕНИЯ Г. БРЯНСКА.....	250
Пестренин В.В., Боталова К.И.	
ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ПЕРОКСИДАЗ И КАТАЛАЗЫ В ЛИСТЬЯХ <i>TRITICOSECALE</i> WITTM. & A.CAMUS.....	255
Сапцын Р.В., Лебедева Е.П.	
ВЛИЯНИЕ НЕФТЕЗАГРЯЗНЕНИЯ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ В ТЕМНОГУМУСОВОЙ ПОЧВЕ	260
Сапцын Р.В., Смирнова А.А.	
ОТВЕТНАЯ РЕАКЦИЯ КРЕСС-САЛАТА НА ЗАГРЯЗНЕНИЕ ПОЧВ НЕФТЕПРОДУКТАМИ	264

Семерикова Д.М., Кайгородов Р.В.	
КАЧЕСТВЕННЫЙ И КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ФЕНОЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОРМОВЫХ РАСТЕНИЯХ	268
Котикова М.И., Серебряная Ф.К.	
ЭКОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ВИДОВ РОДА ОПУНЦИЯ ФЛОРЫ ПОЛУОСТРОВА КРЫМ	272
ЗООЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ	
Вилкова Е.С.	
ЭПИМОРФНЫЕ ГУБОНОГИЕ МНОГОНОЖКИ (CHILORODA: GEORHILOMORPHA, SCOLOPENDROMORPHA) АЗИАТСКОЙ ЧАСТИ РОССИИ.....	280
Плакхина Е.В.	
ДЕТРИТНИЦЫ (DIPTERA, SCIARIDAE) В ОРАНЖЕРЕЯХ БОТАНИЧЕСКОГО САДА ПГНИУ	284
Телегина А.А., Ефимик В.Е., Славнова Е.А.	
ОЦЕНКА ВИДОВОГО СОСТАВА И ЗАРАЖЕННОСТИ ИКСОДОВЫХ КЛЕЩЕЙ В БОЛЬШЕСОСНОВСКОМ МУНИЦИПАЛЬНОМ ОКРУГЕ ПЕРМСКОГО КРАЯ	290
Григорьева Т.А., Тиунов А.В.	
К ИЗУЧЕНИЮ СТРОИТЕЛЬНОГО ИНСТИНКТА У ПАУКОВ-КРУГОПРЯДОВ <i>CYCLOSA CONICA</i> (PALLAS, 1772) И <i>MANGORA ACALYPHA</i> (WALCKENAER, 1802).....	295
Галиулин Д.М., Печенкина К.О., Четанов Н.А.	
О НАХОДКАХ ВОДЯНОГО УЖА <i>NATRIX TESSELLATA</i> (LAURENTI, 1768) НА ТЕРРИТОРИИ ПЕРМСКОГО КРАЯ	299
Князева Е.В., Четанов Н.А.	
НОВЫЕ ДАННЫЕ К ЭКОЛОГИИ РЕДКИХ ВИДОВ ОФИДИОФАУНЫ ЖИГУЛЁВСКОГО ЗАПОВЕДНИКА	304
Гречка Е.А.	
ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ ПРЕДПРИЯТИЙ НА ЭКОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ РЕКИ НИЖНИЙ ДОН	309
Гринчак О.А.	
ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЗАГРЯЗНЁННОСТИ РОДНИКОВЫХ ВОД НЕФТЕПРОДУКТАМИ В ЛАНДШАФТАХ С РАЗНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ ИНДЕКСА ГЕМЕРОБНОСТИ.....	315
Панчукова О. В.	
ГИДРОХИМИЯ ОЗЁР И ОЦЕНКА РЕКРЕАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В НЕЧЕРНОЗЕМЬЕ РФ (БРЯНСКАЯ ОБЛАСТЬ)	323
Заморин Д.Б., Тихонова Т.В.	
О ПРИМЕНЕНИИ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ОТПЕЧАТКА КУТИКУЛЯРНЫХ ЧЕШУЕК ВОЛОС СОБАКИ ДОМАШНЕЙ	326

Лобанова Н.Л., Омельченко Н.В.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ СПРЕЕВ ПРОТИВ КЛЕЩЕЙ	331
Корнилова Е.А., Отинов И.В.	
ОЦЕНКА КООРДИНАЦИОННЫХ СПОСОБНОСТЕЙ СЛУЖЕБНЫХ СОБАК НА НЕУСТОЙЧИВОЙ ПЛАТФОРМЕ.....	335
Крылова И.О., Якурнов А.С.	
ДИНАМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНОЙ ОБСЕМЕНЕННОСТИ РУК КУРСАНТОВ ВОЕННОГО ВУЗА	341
Харин Р.В.	
ЭКОЛОГО-ОРНИТОЛОГИЧЕСКОЕ ОБСЛЕДОВАНИЕ АЭРОДРОМА «АЭРОПОРТ ТУРУХАНСК»	346
Пепеляева А.Д., Бакланов М.А., Михеев П.Б.	
ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ АККУМУЛЯЦИИ МИКРОПЛАСТИКА В РЫБАХ, НАСЕЛЯЮЩИХ ВОДНЫЕ ОБЪЕКТЫ ПЕРМСКОГО ПРИКАМЬЯ.....	355
Якубова К.С., Михеев П.Б., Вяткина Ю.С., Бакланов М.А.	
ВЛИЯНИЕ ХЛОРИДНОГО ЗАСОЛЕНИЯ НА ХОД РАННЕГО РАЗВИТИЯ И СМЕРТНОСТЬ ИКРЫ И ПРЕДЛИЧИНОК ПРЕСНОВОДНЫХ ВИДОВ РЫБ БОРЕАЛЬНОЙ ЗОНЫ НА ПРИМЕРЕ РЕЧНОГО ОКУНЯ <i>PERCA FLUVIATILIS</i>	359
Якубова К.С., Михеев П.Б., Вяткина Ю.С., Комарова Л.В., Мерзляков И.Н., Казаринов С.Н., Бакланов М.А., Пузик А.Ю.	
МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ ТКАНЕЙ СТЕРЛЯДИ <i>ACIPENSER RUTHENUS</i> ПРИРОДНОГО И ИСКУССТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ	366

Научное издание

Фундаментальные и прикладные аспекты биологии

*Сборник статей Международной конференции ученых-биологов
(г. Пермь, ПГНИУ, 30 октября – 3 ноября 2023 г.)*

Издается в авторской редакции
Компьютерная верстка: *М. Я. Лямин*

Объем данных 15,66 Мб
Подписано к использованию 12.02.2024

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
614068, г. Пермь, ул. Букирева, 15